## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

#### **EDUARDO CAPODIFOGLIO**

Avaliação da qualidade microbiológica, contagem de *Pseudomonas* spp. e sua importância durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado no período de seca e chuva

#### **EDUARDO CAPODIFOGLIO**

Avaliação da qualidade microbiológica, contagem de *Pseudomonas* spp. e sua importância durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado no período de seca e chuva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências.

## Área de Concentração:

Qualidade e Produtividade Animal

#### **Orientador:**

Prof. Dr. Arlindo Saran Netto

Pirassununga

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Capodifoglio, Eduardo C245a Avaliação da quali

Animal.

Avaliação da qualidade microbiológica, contagem de Pseudomonas spp. e sua importância durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado no período de seca e chuva / Eduardo Capodifoglio. -- Pirassununga, 2015. 70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Zootencia. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Saran Netto.

- 1. Armazenamento 2. Leite 3. Lipases 4. Proteases
- 5. Pseudomonas spp. I. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor"

#### Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, em especial a minha esposa Kassia, meu filho Theo, minha mãe Maria Rosa, meu pai Mauri e meu irmão Lucas que foram e continuarão sendo as pessoas que me impulsionam a seguir neste caminho. Dedico também aos meus dois avôs Abílio e Antônio aos quais não se fazem presente em nosso meio, porém nos deixou um legado de honra, dignidade e respeito para com o próximo.

#### **Agradecimentos**

À Deus pela presença onipotente em todos os momentos da minha vida, principalmente pela família que me destes e pela realização dos meus sonhos;

À minha família que me ampara em todos os momentos da minha vida;

À minha esposa e meu filho que são engrenagens que me impulsionam as conquistas de meus ideais;

Ao meu orientador Prof. Dr. Arlindo Saran Netto, pela confiança dada a mim ao cumprimento deste trabalho e, sobretudo, algo muito maior que simplesmente orientador e sim um incontestável amigo que certamente foram fundamentais para a realização desta etapa;

À Prof. Dra. Ana Maria Vidal, que atuou não só como co-orientadora deste trabalho, mas também, como uma grande amiga onde sem seus esforços, paciência e o acolhimento como "filho", foram cruciais para finalização do trabalho;

À Dra. Andréia Vaz, técnica de laboratório, que não mediu esforços para a execução deste projeto;

Às colegas de pesquisa Fernanda, Joyce, Taís, Luciana, Karin (alunas da graduação em Engenharia de Alimentos e Medicina Veterinária) onde também por esforços ínfimos tiveram enorme parcelas nesta longa jornada.

A todos os funcionários, pós-graduandos e professores que indiretamente contribuíram para a minha experiência profissional e intelectual.

Aos produtores rurais pelos quais foram peças chave neste estudo, pois sem eles, não seria possível a execução dos mesmos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros aplicados na pesquisa.

Durante esta etapa construímos uma "Família" e desejo que esta união perdure por muitos anos.



CAPODIFOGLIO, E. Avaliação da qualidade microbiológica, contagem de *Pseudomonas* spp. e sua importância durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado no período de seca e chuva. 2015. 70 f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

#### **RESUMO**

Na propriedade rural, onde o leite cru refrigerado fica armazenado até a captação pelo caminhão tanque em coleta a granel, o mesmo é mantido a temperatura de refrigeração entre 1 a 4°C por longos períodos (até 96 horas), os microrganismos psicrotróficos encontram condições favoráveis para sua multiplicação, produzindo enzimas proteolíticas e lipolíticas termotolerantes, podendo provocar alterações indesejáveis no leite e nos seus derivados. Quando estes microrganismos estão presentes em elevadas populações, pode ser indicativo de baixa qualidade do leite e insatisfatória condições sanitárias para o processamento. Devido a necessidade da melhora da qualidade dos produtos lácteos, objetivou-se a execução desta pesquisa realizando levantamentos sobre o cumprimento dos padrões microbiológicos exigidos pela atual legislação brasileira IN 62 (BRASIL, 2011), pesquisas sobre os microrganismos psicrotróficos, Pseudomonas spp. e produção de enzimas proteolítica e lipolítica por *Pseudomonas* spp. As coletas foram realizadas em 10 propriedades do Estado de São Paulo na Regional Agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, sendo, 5 propriedades com ordenha manual e 5 propriedades com ordenha mecânica, nos períodos de chuva e seca e em vários pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado e também do leite com intervalo de 24 horas até a captação deste leite pelo caminhão. As médias das populações dos microrganismos mesófilos na ordenha manual, foi diferente estatisticamente significativo no leite recém ordenhado (1,52×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) para o leite com 24 horas de armazenamento (2,67×10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) no período chuvoso, e na ordenha mecânica, o encontrado foi uma diferença estatisticamente significativa no leite recém ordenhado (3,87×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) para o leite com 24 horas de armazenamento (9,82×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) também no período chuvoso. Nas populações dos microrganismos psicrotróficos, suas médias diferiram estatisticamente na ordenha manual no período da chuva no leite recém ordenhado (1,48×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) para o leite com 48 horas de armazenamento (1,49×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) e na ordenha mecânica, o leite recém ordenhado (8,74×103 UFC.mL-1), com 24 horas de

armazenamento (4,33×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) não diferiram entre si e foram diferentes estatisticamente do leite com 48 horas de armazenamento (3,46×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) apresentaram valor elevado, principalmente quando o leite cru refrigerado permanece por longos períodos de armazenamento na propriedade rural, que pode ser um sério fator de comprometimento pela produção de lipases ou proteases principalmente pelas *Pseudomonas* spp. onde em todos os pontos amostrados foram isolados este microrganismo produzindo enzimas (lipase e/ou protease). A maior porcentagem de atividade lipolítica foi verificada no período seco, já a maior porcentagem de atividade proteolítica foi verificada no período chuvoso. Contudo, deve-se intensificar as medidas de autocontrole para minimizar os efeitos dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos sobre a qualidade do leite cru refrigerado e, consequentemente, de seus derivados.

Palavras-chave: armazenamento, leite, lipases, proteases, *Pseudomonas* spp.

CAPODIFOGLIO, E. Microbiological quality evaluation, *Pseudomonas* spp. count and its importance during the collection and storage of refrigerated raw milk in the dry and rain periods. 2015. 70 f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

#### **ABSTRACT**

On the farm, where the cold raw milk is stored until the tank truck collects it in bulk, it is kept at refrigeration temperature between 1 and 4°C for extended periods (96 hours), the psychrotrophic microorganisms find favorable conditions for their multiplication, producing proteolytic and lipolytic thermotolerant enzymes, it may cause undesirable changes in milk and its derivatives. When these microorganisms are present in a large population, it can be an indicative of low quality milk and unsatisfactory sanitary conditions for its processing. Due to the need of improving the quality of dairy products, this research was carried out with surveys about fullfilment of microbiological standards required by current Brazilian law IN 62 (BRAZIL, 2011), researches on psychrotrophic microorganisms, Pseudomonas spp. and production of proteolytic and lipolytic enzymes by Pseudomonas spp. Samples were collected in 10 farms in the state of São Paulo in the Regional Agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR in Limeira – SP, 5 farms with manual milking and 5 farms with mechanical milking; during the rainy and dry periods and in several points during the obtaining of refrigerated raw milk and also milk with a 24-hour-interval before the collection of this milk by the truck. The averages of the mesophilic population in the manual milking were different, statistically significant between the newly expressed milk (1.52×106 UFC.mL-1) and 24 hour-storage milk (2.67×107 UFC.mL-1) in the rainy season, and during mechanical milking, what was found was a statistically significant difference between the newly expressed milk (3,87×106 UFC.mL-1) and 24-hour-storage milk (9,82×108 UFC.mL-1, also in the rainy season. In the populations of psychrotropic microorganisms, the averages statistically differed in manual milking during the period of rain between the newly expressed milk (1,48×104 UFC.mL-1) and 48-hour-storage milk (1,49×105 UFC.mL-1); and during the mechanical milking, newly expressed milk (8,74×103 UFC.mL-1) and 24-hourstorage (4,33×104 UFC.mL-1); were not different and were statistically different from 48-hour-storage milk (3,46×105 UFC.mL-1), they present high value, especially when refrigerated raw milk remains for long storage periods on the farm, which can be a

serious impairment factor for the production of lipases and proteases mainly by *Pseudomonas* spp. where in all the sampling sites these microorganisms were isolated producing enzymes (lipase and/or protease). The highest percentage of lipolytic activity was observed in the dry season; the highest percentage of proteolytic activity was observed during the rainy season. However, the self-control measurements should be intensified to minimize the effects of mesophilic and psychrotrophic microorganisms on the quality of refrigerated raw milk and, consequently, its derivatives.

Keywords: storage, milk, lipases, proteases, Pseudomonas spp.

# SUMÁRIO

1.	. REVISÃO	. 12
	1.1 Produção de leite no Brasil	. 12
	1.2 A obtenção, armazenamento e qualidade microbiológica do Leite	. 14
	1.3 Psicrotróficos no leite	. 18
	1.4 Pseudomonas spp. no leite	. 20
	1.4.1 Produção de proteases e lipases por <i>Pseudomonas</i> spp	. 21
2	OBJETIVOS	. 25
3.	. MATERIAL E MÉTODOS	. 26
	3.1 Colheita de amostras	. 26
	3.2 Pontos de colheita de materiais	. 26
	3.2.1 Amostras de água utilizada no manejo de ordenha	. 26
	3.2.2 Suabe da mão do ordenhador antes e após a ordenha (pool)	. 26
	3.2.3 Suabe da Superfície dos tetos (pool)	. 26
	3.2.4 Suabe da superfície interna das teteiras (ordenha mecânica) ou	do
	balde (ordenha manual) antes e após a ordenha	. 27
	3.2.5 Suabe da superfície interna do tanque de expansão antes da orde	nha
		. 27
	3.2.6 Amostras de leite do tanque de expansão no momento do comp	leto
	enchimento e imediatamente antes do carregamento para o laticínio	. 27
	3.3 Contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos	. 28
	3.4 Contagem padrão em placas de microrganismos psicrotróficos viáveis	. 28
	3.5 Enumeração de <i>Pseudomonas</i> spp.	. 29
	3.6 Avaliação da atividade lipolítica e proteolítica de <i>Pseudomonas</i> spp	. 29
	3.7 Análises estatísticas	. 29
	3.8 Dados meteorológicos	. 31
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.	CONCLUSÃO	. 60
6.	. REFERÊNCIAS	. 61
7	Anexo I (Comitê de ética)	70

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Médias das populações dos microrganismos mesófilos em amostras de leite cru refrigerado, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.
<b>Tabela 2.</b> Médias das populações dos microrganismos mesófilos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período com o tipo de ordenha. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014
<b>Tabela 3.</b> Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014
<b>Tabela 4.</b> Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 96 horas oriundas de propriedades com ordenha manual comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014
<b>Tabela 5.</b> Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca e ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014
<b>Tabela 6.</b> Médias das populações de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado comparando o período da chuva e seca com ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de

<b>Tabela 7.</b> Médias das populações de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 96 horas de armazenamento comparando o período da chuva e seca com ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014					
<b>Tabela 8.</b> Porcentagens de atividade lipolítica de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com atividade lipolítica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014					
<b>Tabela 9.</b> Porcentagens de atividade lipolítica de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 48 horas de armazenamento, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com atividade lipolítica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014					
<b>Tabela 10.</b> Porcentagens de atividade proteolítica de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com período da chuva e seca. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014					
<b>Tabela 11.</b> Porcentagens de atividade proteolítica de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 48 horas de armazenamento, comparando ordenha manual e mecânica com o período da chuva e seca. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014					

#### 1. REVISÃO

## 1.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

No Brasil, o leite e seus derivados possuem grande impacto no setor do agronegócio, sendo uma forte e importante fonte geradora de renda, tributos e empregos (FONSECA; SANTOS, 2000; GOMES, 2001).

Segundo Almeida (2012), a atividade da pecuária leiteira é exercida em todo o território nacional. Presente em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, gera cerca de três milhões de empregos. Em 2013, o Brasil ocupou a posição do quarto maior produtor de leite no mundo, com um incremento de produção leiteira de 4,6% ao ano no período 2008 a 2012, alcançando 34,1 milhões de toneladas em 2012, um aumento de 3,0% em relação ao ano anterior Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), a região Sudeste, foi a responsável pela maior captação de leite inspecionado com 41,4% da produção nacional seguido pela região sul com 33,8%, Centro-oeste com 14,7% e as regiões Norte e Nordeste, totalizando um volume de 5% cada.

O conceito para o termo "qualidade" engloba um conjunto de características que tornam diferentes as unidades individuais de um produto e que tem importância na determinação do grau de aceitabilidade daquela unidade pelo consumidor (ROSA, 2014). Um crônico problema, de difícil solução, no Brasil a qualidade é insatisfatória do leite produzido, sendo esta recorrente de fatores de ordem social, econômica e cultural, isolados ou associados. A obtenção de um leite de qualidade não é um desafio exclusivo do produtor e sim de toda cadeia produtiva para garantir que o leite chegue com qualidade à mesa do consumidor (ROSA, 2014).

Segundo Almeida et al. (1999) e Freitas Filho et al. (2009) cerca de 40% da produção de leite no Brasil é comercializada sem inspeção sanitária, ou tratamento térmico adequado, a este produto é dado o nome de "leite informal", sendo comercializado sem qualquer tipo de refrigeração e, em utensílios plásticos ou de vidro aos quais não são apropriados para a comercialização do leite, e elaborados originalmente para o comércio de outros produtos, como refrigerantes.

Segundo o (IBGE, 2006), calcula-se que 35 a 42% do leite produzido no país, entre 1998 e 2001, não passou por nenhuma inspeção de órgão de controle sendo:

federal, estadual ou municipal. Estima-se que o mercado para o consumo de leite informal, ou clandestino, tem aumentado também em classe social com maior poder aquisitivo, tal justificativa se dá pelo apelo destes consumidores em acreditar que seja um produto "mais natural", íntegro, com seus constituintes em proporções brutas íntegras e ausentes de produtos químicos ou conservantes (FREITAS FILHO et al., 2009).

Tendo conhecimento destes fatos e em busca novos parceiros comerciais internacionais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) resolveu normatizar o setor criando o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1952) cujo decreto N° 30.691 foi publicado em 29 de Março de 1952. Porém, a partir do ano de 2002 foi publicada a Instrução Normativa 51 de 18 de Setembro de 2002 (IN 51) e revogada posteriormente pela Instrução Normativa 62 de 29 de Dezembro de 2011 (IN 62) trazendo novos padrões para qualidade do leite.

A natureza complexa e interligada para se obter alimentos e produzi-los de forma segura tem sido amplamente reconhecida. A aproximação integrada para controlar a segurança dos alimentos por toda a cadeia produtiva se tornou um importante aspecto para garantir alimentos seguros. Assim, vários países elaboraram e introduziram regulamentações para garantir a segurança dos alimentos em diferentes estágios na cadeia de produção. No Brasil a partir de 2002, gradativamente, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), que visava garantir a melhoria da qualidade do leite produzido no país, preconizando a utilização de sistema de refrigeração do leite das propriedades rurais, da coleta e transporte a granel até a usina de beneficiamento, implantando novos padrões microbiológicos e físico-químicos além de outras modificações (BERSOTI et al., 2010).

O principal desafio proposto foi a melhoria das condições higiênico-sanitárias de obtenção do leite, visando ofertar produtos de melhor qualidade aos consumidores (SANTOS, 2010).

Tendo uma curva ascendente de produção de leite no Brasil, este segmento vem ganhando destaque em evitar o êxodo rural, geração de empregos, dinamização de bens e serviços. Para aumentar o volume de leite produzido e com isso elevar a outros patamares a exportação de produtos lácteos é necessário que o segmento se adeque as exigências dos países importadores, tornando-se

necessária a adequação nos padrões de qualidade do leite cru refrigerado (MULLER, 2002).

O leite cru refrigerado segundo a Instrução Normativa 62 (IN 62) (BRASIL, 2011a) é aquele obtido em propriedades rurais, podendo ser armazenado em tanque de refrigeração por expansão direta, dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até a temperatura igual ou inferior a 4°C no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha ou através do uso coletivo de tanques de refrigeração denominado "tanque comunitário" desde que baseados no princípio de operação por expansão direta onde a localização do equipamento de refrigeração deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local onde o mesmo estiver instalado.

A IN 62 (BRASIL, 2011a) altera os prazos e limites da Contagem Bacteriana Total (CBT) e da Contagem de Células Somáticas (CCS), as quais passam a ter como limite máximo  $6.0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, ao invés de  $7.5 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para os produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a partir de 1 de janeiro de 2012, e para os do Norte e Nordeste apenas em janeiro de 2013. Há um escalonamento de prazos e limites para a redução de CBT e CCS até 2016, para que cheguem a  $1.0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> (CBT) e  $4.0 \times 10^5$  cél/mL<sup>-1</sup> (CCS).

Segundo Brito et al. (2004) e Moreira (2010), as características da produção leiteira no Brasil são os principais fatores que bloqueiam um desenvolvimento mais acentuado da atividade. De certa forma, a maior parte destes produtores, são classificados como sendo de pequeno ou médio porte, com produção diária de 50 a 100 litros e de caráter familiar. Consequentemente, há pouco investimento na atividade, resultando em problemas em toda a cadeia produtiva, como baixa tecnologia, falta de controle sanitário dos animais e condições higiênicas inadequadas durante a ordenha, conservação e o transporte (SANTOS; FONSECA, 2007; VALEEVA et al., 2005).

# 1.2 A OBTENÇÃO, ARMAZENAMENTO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

A insatisfatória qualidade do leite cru é notoriamente conhecida em todas as regiões do Brasil, consequentemente resulta em produtos lácteos industrializados de qualidade insatisfatória (SILVEIRA et al., 1989; BELOTI et al.,1999; SILVA et al.,

2001; GUIMARÃES, 2002; NERO et al., 2004, 2005; ARCURI et al., 2006; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006).

Segundo Oliveira (2005) por ser o leite um alimento com elevada quantidade de nutrientes, pode ser considerado como um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos, devendo assim ser processado com cuidado pelos estabelecimentos produtores e pelas usinas de beneficiamento. Os fatores que podem influenciar tais alterações são as condições higiênicas de obtenção do leite, a higiene dos utensílios e equipamentos envolvidos na estocagem, a sanidade do rebanho, as condições climáticas, o tempo e a temperatura de estocagem nos tanques de expansão, o transporte e as condições de estocagem na indústria, dentre outros fatores (SILVA et al., 2010).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação dos microrganismos mesófilos que causam a acidificação. Entretanto, isso favorecerá os microrganismos psicrotróficos que, se estiverem presente na matéria prima, provocam diversas alterações no leite e seus derivados (FAGUNDES et al., 2006).

Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que não impede a multiplicação de microrganismos psicrotróficos. Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura, um resfriamento marginal do leite. Os níveis de contaminação por microrganismos psicrotróficos têm-se tornado uma séria preocupação do ponto de vista da qualidade e em relação à segurança alimentar, visto que, algumas espécies psicrotróficas são patogênicas (SHIRAI, 2010).

Outras espécies são consideradas deteriorantes, pois a ação bacteriana, ou de enzimas produzidas por elas, induzem a alterações físico-químicas no leite, que levam a perdas econômicas ao longo de toda a cadeia produtiva, destacando a queda no rendimento industrial, o aparecimento de problemas de processamento e a produção de derivados lácteos mais instáveis, de qualidade inferior e com menor vida de prateleira (VINHOLIS; BRANDÃO, 2009).

O conhecimento do comportamento e fisiologia dos microrganismos é importante no controle da multiplicação bacteriana em alimentos. Para que esse

controle ocorra de forma ideal, é necessária uma sistemática compilação de dados relativos ao comportamento dos microrganismos nos alimentos (ALMEIDA, 2010).

Os microrganismos mesófilos aeróbios são considerados um importante grupo de indicadores de qualidade do leite, os quais predominam em situações de condições básicas de higiene deficitária e também inadequada refrigeração do leite (LANGONI et al., 2011).

Os microrganismos mesófilos são pertencentes ao grupo de microrganismos capazes de se multiplicarem numa faixa de temperatura entre 20 e 45°C, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32°C e, portanto, encontrado nas temperaturas ambientes de países de clima tropical, condições estas, ótimas para o seu metabolismo. Contagens microbianas elevadas de mesófilos no leite pasteurizado podem indicar uma matéria prima excessivamente contaminada ou permanência em temperatura ambiente, manipulação inadequada, equipamentos da planta de processamento não adequadamente sanitizado e/ ou pasteurização deficiente (OLIVEIRA, 2005).

Estes microrganismos são capazes de começar um processo de deterioração do leite seja pela fermentação da lactose, processo resultante do metabolismo de gêneros de bactérias lácticas, como Lactococcus, Leuconostoc e Lactobacillus, ou então pela quebra da glicose recém-formada, processo este, realizado por uma ampla de bactérias, especialmente gama as pertencentes Enterobacteriaceae, (JAY, 2005). Estes processos fermentativos reduzem o pH do leite, pois têm como etapa final a produção e deposição de ácido láctico (BRAVERMAN, 1980). De certa forma, a acidez do leite, seria o resultado de um sinergismo entre as bactérias naturalmente presentes no leite e bactérias contaminantes. Além de comprometer a qualidade do leite e derivados, a acidez elevada altera as propriedades físico-químicas como: o índice crioscópico, redução da porcentagem de lactose, instabilidade térmica, baixo pH, elevada populações de microrganismos mesófilos. Quanto mais alta for a acidez do leite, menor será seu ponto de congelamento (MITCHELL, 1989; PRATA, 2001).

Um parâmetro bastante utilizado, para mensurar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) de microrganismos aeróbios mesófilos no leite é a Contagem Bacteriana Total (CBT) (BRASIL, 2002; SANTOS, 2005). A estimativa da CBT é bastante empregada no controle da qualidade do leite, bem como a eficácia das práticas de sanitização de equipamentos de ordenha e demais

utensílios utilizados durante a produção e beneficiamento do produto (KITCHEN, 1981; FREITAS FILHO et al., 2009).

A CBT expressa à qualidade microbiológica deste produto a qual será de extrema importância para a indústria láctea já que produtos com baixas CBT apresentam maior rendimento assim como maior tempo de prateleira. A contaminação por bactérias altera a qualidade do alimento e reduz seu valor nutricional. O leite de boa qualidade do ponto de vista microbiológico é fundamental para obtenção de produtos lácteos de excelente qualidade. Em alguns casos, como por exemplo, em leites ácidos e queijos, esta característica tem maior relevância (SARAN NETTO et al., 2009)

Segundo Santos (2001), as principais origens de contaminação do leite cru nas propriedades leiteiras, são os tetos, o úbere, a ordenhadeira mecânica, as mãos do ordenhador, os tanques de expansão e a água utilizada em várias as situações do manejo de ordenha. Além disso, são necessários critérios de qualidade para a água consumida ou para as diferentes finalidades nas instalações onde se produz alimentos para que possam ser evitados os riscos à saúde e também para que indesejados efeitos tanto nas instalações quanto equipamentos aconteçam, como corrosão ou formação de biofilmes, (PORETTI, 1990).

Sabe-se que a qualidade microbiológica da água utilizada para as diversas finalidades na obtenção do leite cru refrigerado, também pode influenciar na contagem bacteriana do leite (FONSECA; SANTOS, 2000; PHILPHOT; NICKERSON, 2002; POLEGATO; RUDGE, 2003; FREITAS et al., 2009). Dentre os microrganismos veiculados pela água, pode ser citado, por exemplo, a *Pseudomonas* spp. sendo um microrganismo psicrotrófico, com potencial para a contaminação do leite (CERQUEIRA et al., 2007).

Este tipo de contaminação do leite pode ser ocasionada pela ação direta da água contaminada no leite ou por meio do enxágue dos equipamentos de ordenha, quando utilizada água sem tratamento (SILVA, 2014).

Quando se utiliza água não potável na higienização dos tetos, limpeza e sanitização dos equipamentos, sempre a última etapa desse processo será o enxágue. Assim, a qualidade da água é fundamental para eficiência da higienização dos equipamentos de ordenha e de resfriadores (SILVA, 2014).

Ordenhadeiras com circuito fechado e que não possuem boa drenagem podem acumular resíduos nas tubulações aumentando as chances de

contaminação. Segundo Silva (2014) cerca de 40% das bactérias psicrotróficas (*Pseudomonas, Acinetobacter, Achromobacter, Flavobacterium*) isoladas em amostras de leite coincidem com os microrganismos predominantes na água. Portanto, a utilização de água com baixa qualidade microbiológica, predispõe um aumento das populações desses microrganismos no leite cru refrigerado.

A higiene dos tetos é o principal fator no momento da ordenha, pois, expõe o leite a contaminações por microrganismos e sujidades, quer sejam estas ambientais ou provenientes do ordenhador (SARAN NETTO et al., 2009) e pode elevar a níveis críticos a CBT (FONSECA; SANTOS, 2000; BRASIL, 2002). Um correto e adequado manejo de ordenha, com enfoque na preparação antecipada dos tetos (limpeza, prédipping e secagem completa), associado a um eficiente gerenciamento no controle de mastite, são cruciais para a obtenção de leite com baixa CBT (SANTOS; FONSECA, 2007; BRASIL, 2002; FREITAS et al., 2009).

Aproximadamente, 95% dos problemas com alta CBT são originários de falhas na lavagem e sanitização de utensílios e sistema de ordenha, deficiências na higiene da ordenha, e no sistema de resfriamento do leite. Nestas propriedades, ocasionalmente os tetos sujos destas vacas, é um veiculador de microrganismos ambientais para proporcionar um aumento da CBT (MACHADO et al., 2000; SANTOS; FONSECA, 2007; REIS et al., 2007; QUIST et al., 2008). A correta higiene da ordenha tem grande importância, pois mesmo um leite produzido com baixas contagens bacterianas, será contaminado em um sistema canalizado quando não forem adotadas as medidas de higiene na lavagem dos equipamentos assim como a troca periódica de alguns componentes do sistema (SARAN NETTO et al., 2009).

A velocidade de multiplicação bacteriana está diretamente relacionada com a temperatura de estocagem do leite e o tempo que o produto permanece na propriedade até ser coletado pela indústria de laticínios (BRASIL, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007).

#### 1.3 PSICROTRÓFICOS NO LEITE

O resfriamento logo após a ordenha, o transporte em caminhões-tanque isotérmicos e a manutenção nos postos de refrigeração ou estabelecimentos industriais na temperatura máxima de 10°C favorece o desenvolvimento dos psicrotróficos (ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006).

Ainda não se tem uma exata definição para os microrganismos psicrotróficos sendo este um ponto que divide opiniões entre os pesquisadores. Não há consenso no que diz respeito de qual seria a faixa de temperatura mais característica à multiplicação dos psicrotróficos, tampouco está claro e definido qual seria a taxa, ou velocidade mínima dessa multiplicação para que uma bactéria possa ser inserida neste grupo (CHAMPAGNE et al., 1994; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; SANTANA; BELOTI; BARROS, 2001).

Normalmente a temperatura mais comum encontrada em referências embasase nas normas da International Dairy Federation, pela qual os psicrotróficos foram classificados como sendo os microrganismos que podem se desenvolver a 7° C ou menos, indiferente da temperatura ótima de multiplicação (ISIDORO, 2008). Já Sorhaug e Stepaniak (1997) diferem ao incluírem os bacilos formadores de esporos neste grupo, aumentando esta temperatura para 10°C, enquanto Santana, Beloti e Barros (2001) retorna a um conceito da década de 60, considerando a faixa ideal de multiplicação entre 0°C até 20°C como sendo típica para microrganismos psicrotróficos.

Ao adentrarmos neste assunto, surge uma nova controvérsia no que diz respeito do próprio termo "psicrotróficos" que usualmente é tratado como sinônimo de psicrófilos, psicrófilos facultativos e psicrotolerantes (GOUNOT, 1986; SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 1998b).

A manutenção do leite refrigerado por tempo prolongado, nas fazendas e usinas de beneficiamento facilita a proliferação deste grupo de microrganismos. A legislação brasileira (BRASIL, 2002), não estabelece parâmetros em relação a contagem de bactérias psicrotróficas em leite cru, entretanto com base em estudos já realizados, é imprudente a fabricação de produtos a partir do leite cru com contagem de bactérias psicrotróficas superior a 5,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (MARTINS et al., 2005). Portanto, se o leite cru é submetido a períodos de estocagem prolongados sob-refrigeração, o controle de psicrotróficos na matéria prima pode ser mais importante do que o realizado após o processamento (COSTA, 2006).

Um estudo realizado por Pinto, Martins e Vanetti (2006) constatou que a refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer a sua qualidade, considerando a possibilidade de seleção dos microrganismos psicrotróficos proteolíticos.

Na propriedade rural, a refrigeração imediata do leite cru é universalmente recomendada para prolongar seu tempo de armazenamento e inibir a deterioração do leite por microrganismos mesofílicos. Por outro lado, salienta-se que, quanto mais longo for o tempo de estocagem com baixas temperaturas (7°C) de um leite apresentando alta contagem inicial de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final (MARTINS et al., 2005).

Os microrganismos psicrotróficos mesmo em temperaturas abaixo de 10°C encontram um ambiente favorável para sua multiplicação, independente da temperatura ótima de crescimento. Além disso, possuem uma ampla faixa de temperatura de crescimento, que varia de 2°C até, aproximadamente, 30°C, sendo 25°C a temperatura ótima para a maioria das espécies (FERREIRA et al., 2012). Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas restritamente mesófilas, já estão sendo incluídas também entre os psicrotróficos (SHIRAI, 2010).

A presença dos microrganismos psicrotróficos está relacionada diretamente com condições adequadas de higiene na produção; portanto o leite produzido com boas condições, normalmente não apresentam altas populações dos microrganismos psicrotróficos quando refrigerado a temperaturas iguais ou inferiores a 4°C, enquanto que sob condições de higiene não adequadas, o leite apresenta uma alta contagem destes microrganismos (SANTANA; BELOTI; BARROS, 2001).

A manutenção do leite a uma temperatura de estocagem baixa e ao seu prolongado tempo de armazenamento proporciona uma seletiva vantagem para as bactérias psicrotróficas, principalmente o grupo das *Pseudomonas* spp. (DUFOUR et al., 2008; MARCHAND et al., 2009), que colonizam e multiplicam-se no leite cru por meio da formação de biofilmes nos próprios tanques de expansão, por água contaminada e por fragmentos de solo (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2009).

#### 1.4 PSEUDOMONAS spp. NO LEITE

As *Pseudomonas* spp. são bastonetes Gram-negativos, móveis, geralmente aeróbicos, não fermentadores, isto é, não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degradam por outras vias metabólicas que não a fermentação (MUIR, 1996).

O gênero *Pseudomonas* apresenta necessidade nutricional bastante simples e crescem quimiorganotroficamente em pH neutro e em temperatura na faixa

mesofílica. Uma das propriedades notáveis de muitas espécies de *Pseudomonas* corresponde a variedade de compostos orgânicos empregados como fonte de carbono, sendo que algumas espécies utilizam mais de 100 compostos diferentes, enquanto apenas poucas utilizam menos de 20 (CAIXETA et al., 2012).

Consequentemente, eles estão distribuídos nos diferentes ambientes como solo e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos, mas com estirpes relacionadas à promoção de crescimento de planta e biocontrole de fitopatogenos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Segundo os estudos que utilizam métodos convencionais de cultivo para monitorar a comunidade bacteriana do leite cru, os principais microrganismos psicrotróficos encontrados são representados pelos gêneros gram-negativos Pseudomonas, Achromobacter, Aeromonas, Hafnia, Enterobacter, Serratia, Alcaligenes, Burkholderia, Chromobacterium e Flavobacterium e pelos grampositivos Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Streptococcus, Lactobacillus e Micrococcus spp. (MACHADO, 2011).

Entretanto, em leite cru mantido sob refrigeração, o mesmo tem predominância sobre as demais espécies presentes, tanto no leite cru quanto no leite beneficiado, chegando a constituir mais de 75% da população total (CASSAROTTI et al., 2009).

## 1.4.1 PRODUÇÃO DE PROTEASES E LIPASES POR *PSEUDOMONAS* spp.

As *Pseudomonas* spp. podem sintetizar diferentes enzimas como proteases e lipases. Muitas possuem capacidade de excretar pigmentos solúveis em água, que se difundem no ambiente. Na indústria de produtos lactéos, as *Pseudomonas* spp. psicrotróficas são as bactérias mais frequentemente associadas a deterioração de leite cru armazenado em temperatura de refrigeração, onde *P. Fluorescens* é especialmente importante (ATTITALLA et al., 2006).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido isoladas mais frequentemente em leite e produtos lácteos refrigerados embora possuam uma baixa representatividade sendo 10% da microbiota do leite cru recém-ordenhado (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Podendo chegar a 90,0 % da microbiota quando a higiene é precária (SAMARZIJA; ZAMBERLIN; POGACIC, 2012). Esse gênero possui espécies que apresentam um curto tempo para multiplicação, a uma

temperatura entre 0 e 7°C, e uma temperatura mínima para multiplicação baixa, de até - 10°C (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), com destaque para espécies como *P. fluorescens, P. fragi, P. synxantha e P. putida*. O que as torna, naturalmente, as bactérias com maiores populações em leites armazenados dentro deste intervalo de temperatura (IZIDORO, 2008). Essas bactérias têm em comum seu metabolismo no qual, em temperaturas inferiores a 10°C predominam lipo-proteolítico, expressandose pela produção enzimática intracelular e principalmente extracelulares, muitas das quais termotolerantes, tendo certo impasse no controle do sabor e da qualidade geral do leite refrigerado durante seu armazenamento (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996).

Estas enzimas microbianas podem estar dispostas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem excretadas para o meio (extracelulares) (SANTOS; FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e as associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite no momento da destruição dos microrganismos após a pasteurização (KOHLMANN et al., 1991).

Uma importante caracterisitica dos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase lag, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por tais microrganimos (NORNBERG, 2009).

Entre as enzimas extracelulares termorresistentes produzidas pelos microrganismos psicrotróficos, proteases e lipases são as que possuem maior impacto na qualidade do leite e derivados, recebendo atenção especial por parte das indústrias de laticínio (CARDOSO, 2006). Dentre os principais problemas decorrente do alto número de bactérias psicrotróficas podem ser destacados: geleificação do leite UAT, modificações consistência e textura, sabores e odores desagradáveis nos produtos lácteos durante a estocagem e maturação, rancificação e diminuição no rendimento industrial na produção de queijos e redução da vida de prateleira dos produtos (CASAROTTI et al., 2009).

Adams, Barach e Speck (1975) realizaram um estudo sobre a resistência térmica de proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas* spp. para atingir a destruição de 90% das proteases a temperatura deve ser de 72°C por 4 a 5 horas, tratamento este considerado altamente prejudicial ao leite. Griffiths, Philips e Muir

(1981) isolando microrganismos psicrotróficos de produtos lácteos, observaram a resistência térmica de suas proteases e lipases ao tratamento térmico que era de 77°C por 17 segundos e 140°C por 5 segundos.

Segundo Datta e Deeth (2001) as proteases agem sobre a caseína liberando o caseionomacropeptideo (CMP) ação esta, muito semelhante a quimosina (coalho) no processo de fabricação de queijos. E, estas proteases possuem maior ação sobre a kappa-caseína(SORHAUG; STEPANIAK ,1997).

Por estar disposta na camada externa da micela de caseína, a kappa-caseína é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas* (COUSIN, 1982). Essa proteína, ao ser quebrada provoca desestabilização da micela, levando à coagulação do leite, e esta alteração bioquímica está relacionada com a gelatinização do leite longa vida ou UAT (LAW; ANDREWS; SHARPE, 1977; MUIR, 1996).

Cardoso (2006) verificou que durante o crescimento em leite a 4°C, muitas especies de *Pseudomonas* podem produzir proteases suficientes para hidrolisar toda a caseína disponíveis em peptídeos solúveis.

Arcuri et al. (2008) em um estudo constataram que dentre uma diversidade de gêneros bacterianos psicrotróficos isolados de leite cru refrigerado, houve um predominância de *Pseudomonas* spp., e que em sua maioria produziam proteases e/ ou lipases a temperatura de refrigeração.

A lipólise resulta da ação de lipases (naturais e ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. A lipase natural presente no leite é uma enzima termosensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos aos lipídeos de um leite manuseado e processado adequadamente (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003). Entretanto, as lipases de origem microbianas, podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes a temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988; TERNSTRON; LINDBERG; MOLIN, 1993).

A Pseudomonas fragi é evidenciada como produtora de enzima lipolítica, sendo que consegue se multiplicar em baixas temperaturas. As lipases produzidas pelos psicrotróficos são resistentes à temperatura empregada no tratamento térmico

da pasteurização (72-75°C por 15-20 segundos) e no tratamento com ultra alta temperatura (142-146°C por 4-6 segundos). Entretanto, essas enzimas possuem grande relevância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos como queijos, leite UAT e creme de leite (SWAISGOOD; BOSOGLU, 1984).

No atual desenvolvimento da cadeia agroindustrial do leite, é prudente que se faça uma análise dos pontos críticos que podem elevar o risco de contaminação do leite com microrganismos psicrotróficos (SANTOS; FONSECA, 2003)

Tendo em vista as considerações apresentadas, idealizou-se para o presente estudo avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado no tanque de expansão individual, obtido por ordenha manual e mecânica, nos períodos de chuva e seca, através da contagem de microrganismos mesófilos (BRASIL, 2011a) e psicrotróficos, e também realizar, durante a obtenção e armazenamento do leite, o isolamento e contagem de *Pseudomonas* spp. e avaliar sua capacidade lipolítica e proteolítica.

#### 2. OBJETIVOS

Idealizou-se o presente estudo tendo os seguintes objetivos:

- Observação do cumprimento do padrão microbiológico do leite cru refrigerado obtido por ordenha mecânica e manual, em período de seca e chuva, estabelecido por lei, no momento que é coletado a granel na propriedade rural, através da contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos;
- Utilização da contagem padrão em placas de microrganismos psicrotróficos viáveis para verificação da qualidade do leite cru refrigerado obtido por ordenha mecânica ou manual, em período de seca e chuva, no momento do enchimento do tanque de expansão individual e a cada 24 horas até o momento da coleta à granel;
- Enumeração de Pseudomonas spp. durante a obtenção manual e mecânica e armazenamento em tanque de expansão individual na propriedade rural produtora de leite cru refrigerado durante o período de seca e chuva,
- Verificação da atividade lipolítica e proteolítica de Pseudomonas spp. isoladas durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado.

#### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLHEITA DE AMOSTRAS

No presente trabalho, foram realizadas colheitas de amostras em 10 propriedades produtoras de leite cru refrigerado pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural, EDR Limeira - SP, sendo 05 propriedades com ordenha mecânica e 05 propriedades com ordenha manual que eram providas de tanque de expansão individual. As colheitas foram realizadas em dois períodos do ano; período seco e chuvoso, sendo colhidos em 3 diferentes momentos, em cada propriedade e em cada período do ano.

#### 3.2 PONTOS DE COLHEITA DE MATERIAL

#### 3.2.1 Amostra de água utilizada no manejo da ordenha

Foram colhidas em frascos esterilizados com capacidade para 500 mL e preenchidos em 2/3 de seu volume. As mesmas foram colhidas após escoamento da água por 3 minutos da torneira escoando água, tomando-se cuidados para que a colheita seja realizada de maneira asséptica. Os frascos, depois de identificados, foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

#### 3.2.2 Suabe da mão do ordenhador antes e após a ordenha (pool)

Foram passados suabes na superfície da palma e dorso das mãos e entre os dedos de cada ordenhador através de movimentos giratórios. Imediatamente após a colheita, os suabes foram colocados em tubos contendo 5 mL de água peptonada a 0,1% identificados e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

#### 3.2.3 Suabe da superfície dos tetos (pool)

Foram passados suabes em toda superfície dos 4 tetos, através de movimentos giratórios, e acondicionados na forma de "pool" a cada 10 animais. Imediatamente após a colheita, os suabes foram colocados em tubos contendo 5 mL

de água peptonada a 0,1% identificados e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

3.2.4 Suabe da superfície interna de teteiras (ordenha mecânica) ou suabe do balde (ordenha manual) antes e após a ordenha (pool)

Foram passados suabes na superfície interna das 4 teteiras, de todos os conjuntos de ordenha, ou na face interna de todos os baldes através de movimentos giratórios. Imediatamente após a colheita, os suabes foram colocados em tubos contendo 5 mL de água peptonada a 0,1% identificados e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

3.2.5 Suabe da superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha

Foram passados suabes na superfície interna dos tanques ainda vazios através de movimentos giratórios. Imediatamente após a colheita, os suabes foram colocados em tubos contendo 5 mL de água peptonada a 0,1% identificados e acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

3.2.6 Amostra de leite do tanque de expansão no momento do completo enchimento e imediatamente antes do carregamento para o laticínio

Foram colhidas de torneiras localizadas na extremidade inferior do tanque, com os devidos cuidados de assepsia, e acondicionados em frascos de vidro esterilizados em quantidade aproximada de 500 mL. Os frascos, depois de identificados, foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo.

Para a realização das análises microbiológicas as amostras foram levadas ao Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar (LMSAPSA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

3.3 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, 1991)

Primeiramente foram preparadas as diluições das amostras de leite; pipetando-se assepticamente 25 mL da amostra, e transferindo para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de agua peptonada a 0,1% esterilizada (diluição 10<sup>-1</sup>), a partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até 10<sup>-5</sup>, empregando-se o mesmo diluente.

Posteriormente 1 mL de cada diluição será depositado no fundo de placas de Petri esterilizadas em duplicata. Em seguida, foram adicionadas de 15 a 17 mL de ágar padrão fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após a homogeneização e solidificação do agar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos. As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo técnica padrão, em placas com 25 a 250 colônias. A média do número das colônias contadas nas placas em duplicata, multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes, fornecerá o número de microrganismos heterotróficos mesófilos por mililitro da amostra.

3.4 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS VIÁVEIS (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 2001)

Para contagem de microrganismos psicrotróficos, foram adicionados de 15 a 17 mL de ágar padrão fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C nas placas de Petri. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, foram adicionados e espalhados, com o auxílio de uma alça de Drigalski, 0,1 mL de cada diluição. Em seguida as placas foram incubadas a 7°C por 10 dias. Essas determinações foram realizadas em duplicata.

As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo técnica padrão, preferencialmente em placas com 25 a 250 unidades formadoras de colônias. A média do número das colônias contadas nas placas em duplicata foi

multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e posteriormente multiplicados por 10, pois foi utilizado apenas 0,1 mL de cada diluição.

## 3.5 ENUMERAÇÃO DE *PSEUDOMONAS* spp. (COUSIN; BRAMLEY, 1981)

Para enumeração de *Pseudomonas* spp, será utilizado o meio de cultura *Pseudomonas* Agar Base (CM 559- Oxoid), com adição de suplemento (CFC-SR103-Oxoid). Para tal, 0,1mL de cada amostra, após diluições decimais (até 10 <sup>-3</sup>) em água peptonada a 0,1%, será semeada em superfície no meio de cultura com o auxílio de alça de Drigalski, e incubadas a 28°C durante 48 horas e posteriormente contadas em contador de colônias e multiplicado pelo fator de diluição da placa.

## 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA E PROTEOLÍTICA DE PSEUDOMONAS spp. (BEERENS; LUQUET, 1990)

As colônias isoladas na enumeração de *Pseudomonas* spp. foram submetidas à avaliação da atividade lipolítica utilizando-se o ágar Tributirina (ágar padrão para contagem suplementado com 1% de tributirina). Após a semeadura, os meios foram incubados a 28°C por 5 dias.

Para atividade proteolítica os isolados foram semeados em Ágar Leite (ágar padrão para contagem suplementado com 1% de leite em pó desnatado), com posterior incubação do meio a 28°C por 24-48 horas. Nos dois ensaios realizados, a interpretação dos testes positivos será verificada por meio de formação de halos transparentes ao redor das colônias formadas.

#### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliação das populações de *Pseudomonas* spp., mesófilos e psicotróficos, segundo os diferentes tipos de ordenha e períodos do ano, foi utilizada a metodologia de Modelo Linear Geral. Conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006), para avaliação das populações destes microrganismos nas amostras, utilizou-se a transformação de escala "logaritmo natural do número de UFC+1" (LN UFC), procedendo-se à análise de variância. As análises foram

realizadas por meio do procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3. (SAS, 2005). Nestas análises foi adotado o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_i + TE_{ij} + P_k + e_{ijk}$$

Em que,

 $Y_{ijk}$  = valor observado para o número de unidades formadoras de colônia em escala transformada na propriedade  $\underline{k}$ , no período do ano  $\underline{j}$ , e com tipo de ordenha  $\underline{i}$ ;

 $\mu$  = constante inerente à todas observações;

 $T_i$  = efeito fixo do i-ésimo Tipo de Ordenha, sendo i = 1(mecânica) ou 2 (manual);

E<sub>j</sub> = efeito fixo da j-ésima Período do Ano, sendo j = 1 (Seca) ou 2(Chuva);

 $TE_{ij}$  = efeito da interação dupla entre o Tipo de Ordenha i com o Período do Ano j;

 $P_k$  = efeito aleatório da Propriedade de avaliação, suposto NIID (0,  $\sigma^2_P$ );

 $e_{ijk}$  = efeito aleatório residual associado ao número de unidades formadoras de colônia em escala transformada na propriedade  $\underline{k}$ , no Período do Ano  $\underline{j}$ , e com tipo de ordenha  $\underline{i}$ , suposto NIID (0,  $\sigma^2_P$ ).

Quando a população de microrganismos ocorreu apenas em um período, foi retirado este efeito do modelo estatístico acima descrito. O mesmo ocorreu quando foram detectados apenas de microrganismos presentes em um único período do ano.

Para avaliação da presença ou ausência de microrganismos com atividade Lipolítica ou Proteolítica, segundo os diferentes tipos de ordenha e período do ano, foi utilizada a metodologia de Modelo Linear Generalizados pressupondo distribuição Binomial e função de ligação logística. As análises foram realizadas por meio do procedimento PROC GLIMMIX do mesmo programa acima descrito, adotando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \eta(x) + \mu + T_i + E_i + TE_{ij} + P_k + e_{ijk}$$

Em que,

 $Y_{ijkl}$  = porcentagem de incidência de microrganismos com atividade Lipolítica ou Proteolítica na propriedade  $\underline{k}$ , no Período do Ano  $\underline{j}$ , e com tipo de ordenha  $\underline{i}$ ;

 $\eta$  = função de ligação logística que relaciona a variável binomial ao componente sistemático do modelo;

 $\mu$  = constante inerente a todas observações;

 $T_i$  = efeito fixo do i-ésimo Tipo de Ordenha, sendo i = 1(mecânica) ou 2 (manual);

E<sub>i</sub> = efeito fixo da j-ésima Período do Ano, sendo j = 1 (Seco) ou 2 (Chuvoso);

 $TE_{ij}$  = efeito da interação dupla entre o Tipo de Ordenha i com o Período do Ano j;

 $P_k$  = efeito aleatório da Propriedade de avaliação, suposto NIID (0,  $\sigma^2_P$ );

 $e_{ijk}$  = efeito aleatório residual associado à propriedade  $\underline{k}$  , no Período do Ano j, e com tipo de ordenha i.

Quando a atividade lipolítica ou proteolítica ocorreria apenas em um período, foi retirado este efeito do modelo estatístico acima descrito. O mesmo ocorreu quando foram detectados apenas de atividade presente em um único período do ano.

#### 3.8 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados foram obtidos na estação meteorológica do Campus de Pirassununga da USP, durante o período experimental. No período da chuva, a temperatura mínima foi de 11,4°C, máxima 36,3°C e a temperatura média de 24,12°C com uma precipitação pluviométrica de 727,8mm e 74,15% de umidade relativa no ar. No período da seca, a temperatura mínima foi de 4,7°C, máxima 35,1°C e a temperatura média de 20,09°C com uma precipitação pluviométrica de 132,2mm e 71,39% de umidade relativa no ar.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias das populações dos microrganismos mesófilos das amostras oriundas de propriedades com ordenha manual ou mecânica nos distintos períodos, sendo chuva e seca e em diferentes horas de armazenamento 0, 24, 48, 72 e 96 horas para a ordenha manual e 0, 24 e 48 horas para a ordenha mecânica. Foi observada uma população inicial de 1,52×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 1,55×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva e seca respectivamente e após 96 horas de armazenamento 2,21×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva e de 6,96×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da seca para a ordenha manual e, para o tipo de ordenha mecânica, as médias das populações no período da chuva, iniciaram em 3,87×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e no momento da colheita do leite pelo laticínio, após 48 horas de armazenamento, estava com 5,31×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Já no período da seca, a população inicial foi de 1,14×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e também após 48 horas de armazenamento foi de 1,27×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Médias das populações dos microrganismos mesófilos em amostras de leite cru refrigerado, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

	Mesófilos UFC.mL <sup>-1</sup>				
Horas de	Manual		Mecânica		
armazenamento	Chuva	Seca	Chuva	Seca	
0	1,52×10 <sup>6</sup> Ab	1,55×10⁵ Ba	3,87×10 <sup>6</sup> Ab	1,14×10⁵ Ba	
24	2,67×10 <sup>7</sup> Aa	2,05×10 <sup>5</sup> Ba	9,82×10 <sup>8</sup> Aa	1,77×10⁵ Ba	
48	2,98×10 <sup>7</sup> Aa	1,64×10⁵ Ba	5,31×10 <sup>8</sup> Aa	1,27×10⁵ Ba	
72	1,19×10 <sup>8</sup> Aa	3,86×10⁵ Ba			
96	2,21×10 <sup>8</sup> Aa	6,96×10⁵ Ba			

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca por ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando as diferentes horas de armazenamento. Se diferentes, são significativos a P<0,05.

Através dos resultados demonstrados na Tabela 1, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações dos microrganismos mesófilos apenas entre o leite recém-ordenhado para 24 horas de armazenamento no período da chuva na ordenha manual; não havendo diferença entre as demais horas de armazenamento do leite cru refrigerado, porém, houve

<sup>-</sup> Dados inexistentes. Fonte: Própria autoria.

diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações dos microrganismos mesófilos entre o período da chuva e da seca em todas as horas de armazenamento, sendo verificada a maior média das populações dos microrganismos mesófilos (2,21×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) no período da chuva. Com 96 horas de armazenamento também ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações dos microrganismos mesófilos nas diferentes horas de armazenamento entre o período da chuva e seca nas amostras de leite de propriedades providas de ordenha mecânica, e, igualmente a ordenha manual, as maiores médias (5,31×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) foram observadas na ordenha mecânica no período da chuva após 48 horas de armazenamento.

A IN 62 (BRASIL, 2011a) atual legislação brasileira regulamenta a qualidade do leite cru refrigerado, e estabelece um limite para populações dos microrganismos mesófilos de 3,0×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, e no máximo 48 horas de armazenamento deste leite na propriedade rural, assim sendo, até este tempo de estocagem, a população verificada no período da seca na ordenha manual (Tabela 1) encontra-se de acordo com o estabelecido, porém quando ultrapassa as 48 horas de armazenamento, a população de microrganismos mesófilos vai além dos padrões estabelecidos (IN 62) tanto no período da chuva quanto da seca. Tal fato, reafirma o constatado por Ribeiro Neto et al. (2012), pois os autores verificaram uma relação inversamente proporcional entre o tempo de estocagem e a qualidade do leite.

No período da chuva ainda na ordenha manual, as médias das populações dos microrganismos mesófilos apresentaram-se superiores (1,52×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) ao limite máximo estabelecido pela IN 62 (3,0×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) logo após sua obtenção, demostrando falhas nas condições higiênicas.

As maiores médias de populações de microrganismos mesófilos, foram evidenciadas no período da chuva aumentando em dois ciclos logs a população, provavelmente em virtude dos elevados índices pluviométricos que ocorrem no período com um acumulado de 727,8mm de água. Em trabalho semelhante, Ribeiro Neto et al. (2012), ao avaliarem leite após 48 horas de armazenamento oriundos de propriedades na região Nordeste do país, encontraram populações dos microrganismos mesófilos no período da chuva de 1,33×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e no período da seca de 9,12×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, valores estes que apesar de estarem altos, ainda são menores que os encontrados no presente trabalho, pois, na ordenha manual, a população já iniciava-se com médias das populações de 1,52×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (chuva)

e 1,55×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (seca) sendo um indicativo das condições inadequadas de higiene na obtenção do leite.

Ainda, sobre o leite no período chuvoso, Bueno et al. (2008) verificaram que 86,49% das variações da contagem bacteriana total tem relação com as variações na precipitação pluviométrica total considerando-se o volume acumulado de 238,7mm no período da chuva e 17,4mm no período da seca, e relata que contagem bacteriana total acima de 1.0×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> indica falhas de higiene no processo produtivo, enquanto resultados inferiores a 2.0×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> são decorrentes de boas práticas de higiene, e, afirmam ainda que todo produtor deveria se esforçar para produzir leite com contagens inferiores a 1,0×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Logo, no presente trabalho, populações superiores ao estabelecido na legislação, já foram verificadas no leite logo após a obtenção (0 hora) no período da chuva para a ordenha mecânica o que pode sugerir que boas práticas de higiene na obtenção do leite estão sendo omitidas, e que com o passar das horas de armazenamento, a qualidade tende somente ao declínio. Apesar da ordenha ser mecânica, as médias das populações dos microrganismos mesófilos verificadas foram maiores que as verificadas na ordenha manual, demonstrando que o manejo de ordenha é muito importante, independentemente do tipo.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) e Bueno et al. (2008) relataram que a contaminação elevada em leite cru refrigerado pode originar-se também dos resíduos de leite presentes nas superfícies dos equipamentos que constituem nutrientes para a multiplicação bacteriana que contaminam o produto em etapas subsequentes do processamento. Além do mais, o contato do leite com os tetos, animais sujos, ambientes inadequados de produção, falhas na velocidade de resfriamento do leite e leite proveniente de animais com mastite também podem resultar em contagens microbianas elevadas.

No presente estudo, foi possível a identificação de falhas na obtenção do leite nas propriedades providas de ordenha mecânica, falhas estas que podem elevar a população de microrganismos mesófilos a níveis críticos comprometendo a qualidade microbiológica do leite e seus derivados. Uma falha encontrada com grande impacto sobre a contaminação do leite foi a ausência de filtro de linha para a retenção de contaminantes físicos e consequentemente a redução de contaminantes biológicos.

Em todas as propriedades com ordenha mecânica, o sistema de produção das vacas leiteiras era confinado e por si só, devido alta taxa de lotação que o sistema possibilita, acaba aumentando o acúmulo de dejetos e sujidades nos animais, se o mesmo não for bem manejado. Quando se faz uso deste tipo de instalação, o recomendado é realizar a remoção destes dejetos diariamente e o mesmo não era praticado conforme o recomendado, ficando os animais em áreas sujas e desta maneira, o animal chegava à sala de ordenha para ser ordenhado em condições desfavoráveis quanto a higiene do úbere e tetos. No período da chuva, a complexidade da situação ainda aumenta porque os animais ficam sem alternativa para deitar e descansar, pois na área externa das instalações existia muito barro. Bueno et al. (2008) validaram esta informação ao afirmarem que o período das chuvas favorece o aumento da contaminação ambiental, o acúmulo de lama nas instalações e a maior ocorrência de tetos sujos no momento da ordenha.

Em algumas propriedades, a instalação onde as vacas em lactação permaneciam era do tipo *Freestall*, esta, por sua vez, quando manejada da forma correta, proporciona bem estar aos animais tendo como consequência um incremento de produção de leite, e, os animais permaneciam mais limpos e com um menor desafio para obtenção do leite com reduzida carga microbiana. Contudo, verificou-se também que as camas, estavam abaixo do nível necessário permitindo desta maneira que as vacas realizassem as necessidades fisiológicas no interior da mesma tornando a cama um potencial ponto para elevação da contagem bacteriana total e maior incidência de mastite no rebanho.

A forma que algumas propriedades realizavam *pré-dipping* era ineficiente, pois os animais já chegavam na sala de ordenha com os tetos sujos e simplesmente lavavam os tetos com jatos de água corrente e sem tratamento, que também respingava no úbere da vaca, após o ato de lavar o teto o ordenhador secava somente o teto do animal, e o úbere ainda continuava molhado. Em alguns momentos, escorria água do úbere para o interior da teteira carreando desta maneira grande quantidade de microrganismos podendo colaborar com o aumento da população de mesófilos.

Outro motivo que pode elevar a contagem bacteriana total do leite é a realização inadequada da limpeza do sistema de ordenha onde circulavam as soluções de limpeza em concentrações muito abaixo do recomendado, solução em temperatura ambiente e com um tempo reduzido de circulação da mesma. Também

antes de realizar uma nova ordenha, não era realizada a sanitização do equipamento.

Comparando-se as médias das populações dos microrganismos mesófilos obtidas entre as diferentes horas de armazenamento no período da chuva, existe apenas uma diferença entre o leite logo após a obtenção para 24 horas de armazenamento, podendo ser sugestivo de alta população inicial e refrigeração marginal do leite e favorecendo os microrganismos mesófilos.

Durante o período de colheita das amostras, no período seco, as médias das populações dos mesófilos estavam dentro do estabelecido pela IN 62 (BRASIL, 2011a), porém no limite máximo, tal fato é favorecido não pela adoção de boas práticas de manejo e sim pelo período seco onde teve baixa umidade com um acumulado de apenas 132mm de chuva, condição está desfavorável ao desenvolvimento microbiano.

Na tabela 2, estão apresentadas as médias das populações dos microrganismos mesófilos, comparando os dois tipos de ordenha (manual e mecânica) nos períodos (chuva e seca) tendo como populações mínimas no período da chuva para a ordenha manual de 1,52×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e máxima de 2,98×10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, já na ordenha mecânica, as populações mínimas foram de 3,87×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e máxima de 5,31×10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. No período da seca as médias das populações dos microrganismos mesófilos para a ordenha manual foram com mínima de 1,55×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e máxima de 1,64×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Já o verificado na ordenha mecânica foi população mínima de 1,14×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e máxima de 1,27×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.** Médias das populações dos microrganismos mesófilos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período com o tipo de ordenha. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Horas de armazenamento		Mesófilos U	JFC.mL <sup>-1</sup>	
	Chuva		Seca	1
	MANUAL	MECÂNICA	MANUAL	MECÂNICA
0	1,52×10 <sup>6</sup> A	3,87×10 <sup>6</sup> A	1,55×10 <sup>5</sup> A	1,14×10 <sup>5</sup> A
24	$2,67 \times 10^7$ B	9,82×10 <sup>8</sup> A	2,05×10 <sup>5</sup> A	1,77×10 <sup>5</sup> A
48	$2,98 \times 10^7$ A	5,31×10 <sup>8</sup> A	1,64×10 <sup>5</sup> A	1,27×10 <sup>5</sup> A

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando ordenha manual e mecânica por período. Se diferentes, são significativos a P<0,05; Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 2, onde é comparado os dois tipos de ordenha (manual e mecânica) nos períodos (chuva e seca), foi encontrado apenas diferença estatisticamente significativa no leite com 24 horas de armazenamento no período da chuva.

Tal fato, difere dos relatados por Simoni et al. (2013) que verificaram em seus estudos realizados em 12 municípios da região Oeste do Estado de Santa Catarina – SC, envolvendo propriedades especializadas (ordenha mecânica), semi–especializada e não especializadas que apresentaram significativa redução da contagem bacteriana total, tendo uma população de 3,33×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no nível não especializado, 9,67×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no semi–especializado e 7,77×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para o nível especializado. Logo, nas propriedades especializadas, a atividade leiteira apresenta maior importância econômica, inferindo maiores estímulos ao produtor a adotar melhores práticas de higiene na ordenha.

Analisando os dados deste trabalho a ordenha manual no período da chuva 100% das amostras estavam acima do limite estabelecido (3,0×10<sup>5</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>) pela IN 62. Já a ordenha mecânica no mesmo período, 13,33% estavam de acordo e 86,67% das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente.

Na ordenha manual, o manejo de manter o bezerro junto à vaca nos momentos que antecedem a ordenha, pode favorecer a menor população destes microrganismos e, também ao término da ordenha para que proceda com o repasse no leite residual, promovendo desta maneira, pequena probabilidade da vaca ser acometida com mastite.

Sabe-se que os agentes etiológicos *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* comumente isolados em casos de mastite podem elevar exponencialmente a contagem bacteriana total do leite no tanque de expansão Martins et al. (2008); ainda que os animais menos especializados para a produção leiteira empregado neste sistema de ordenha, são menos sensíveis a tal entidade nosológica.

O sistema extensivo de criação destes animais, utilizado nas propriedades com ordenha manual, favorece as menores populações bacterianas no período da chuva por possuir maiores áreas para descanso e menos lama, deixando-os mais limpos e descansados para o momento da ordenha.

No período da seca, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações dos microrganismos mesófilos obtidos no leite obtidos através dois diferentes tipos de ordenha. Observa-se que as médias das

populações dos microrganismos mesófilos obtido no período da seca, são inferiores a um ciclo log entre as médias das populações dos microrganismos mesófilos no período da chuva, características sugestivas de redução da umidade relativa do ambiente (chuva 93% e na seca 16%), redução da temperatura máxima (chuva 36,3°C e seca 35,1°C) e a temperatura mínima (chuva 11,4°C e seca 4,7°C).

Na ordenha mecânica ainda no período da chuva, comparando o leite recémordenhado com o leite após 24 horas de armazenamento, verificou-se um incremento nas populações destes microrganismos, e de 24 para 48 horas de armazenamento, foi verificado um pequeno decréscimo nestas populações.

No período seco, houve um aumento nas porcentagens de amostras que estavam de acordo com a IN 62, onde, na ordenha manual foi de 33,33% das amostras com populações de acordo e 66,67% das amostras em desacordo com o estabelecido pela IN 62; enquanto que na ordenha mecânica, 53,33% das amostras estavam de acordo e 46,67% das amostras em desacordo com o estabelecido.

Quando se computa os dados por período, sem diferenciar o tipo de ordenha, observa-se que na chuva 6,67% das amostras analisadas estavam de acordo e 93,33% das amostras estavam em desacordo com o estabelecido enquanto que na seca 43,33 % das amostras estavam de acordo e 56,67% das amostras estavam em desacordo com o estabelecido. É evidente que nos dois períodos (chuva e seca) tinham amostras fora do estabelecido, pois no período da chuva, esta porcentagem foi bem superior.

Na Tabela 3, estão apresentadas as médias das populações de microrganismos psicrotróficos, verificadas nos dois períodos (chuva e seca) em diferentes horas de armazenamento e leite oriundos de propriedades com ordenha manual ou mecânica. As maiores médias de microrganismos psicrotróficos para a ordenha manual, ocorreram no período da chuva com 48 horas de armazenamento com população de 1,49×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e a menor média verificada foi também no mesmo período logo após a obtenção com uma população de 1,48×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Na ordenha mecânica as menores médias das populações de microrganismos psicrotróficos foram de 8,74×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e máxima de 3,46×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para o período da chuva. Já no período da seca, foram encontradas as maiores médias das populações de microrganismos psicrotróficos de 1,66×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e menores médias das populações de 7,67×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.** Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas, oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

		Psicrotróficos	UFC.mL <sup>-1</sup>	
Horas de	Manual		Mecânica	
armazenamento	Chuva	Seca	Chuva	Seca
0	1,48×10 <sup>4</sup> Ab	1,49×10⁴ Aa	8,74×10 <sup>3</sup> Ab	8,32×10 <sup>3</sup> Aa
24	6,05×10 <sup>4</sup> Aab	2,86×10 <sup>4</sup> Aa	4,33×10 <sup>4</sup> Ab	1,66×10 <sup>4</sup> Aa
48	1,49×10 <sup>5</sup> Aa	4,24×10 <sup>4</sup> Aa	3,46×10 <sup>5</sup> Aa	7,67×10 <sup>3</sup> Ba

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca por ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando as diferentes horas de armazenamentos. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Conforme o verificado na Tabela 3, ocorreram apenas diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de microrganismos psicrotróficos verificadas nas amostras oriundas da ordenha manual no período da chuva entre 0 e 48 horas de armazenamento do leite cru refrigerado, não ocorrendo o mesmo no período da seca. Quando as comparações são realizadas entre as médias das populações obtidas nos períodos (chuva e seca), ainda na ordenha manual com 0, 24 e 48 horas de armazenamento do leite cru refrigerado, não ocorreu nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Na ordenha mecânica, pôde-se verificar que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações obtidas entre períodos (chuva e seca), apenas após 48 horas de armazenamento e, no período da chuva entre 0 e 24 horas de armazenamento não diferem entre si, mas possuem diferença estatisticamente significativa com 48 horas de armazenamento, onde teve um aumento na população destes microrganismos.

Ainda podemos observar nesta tabela que em ambas as ordenhas e períodos, as médias das populações iniciais de microrganismos psicrotróficos foram inferiores quando comparadas com os microrganismos mesófilos (Tabela 1). Segundo Vidal-Martins et al. (2005), as populações encontradas, estão intimamente relacionadas como grau de contaminação inicial e com o binômio tempo x temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento. Existe influência dos períodos do ano na carga microbiana presente no leite cru, também com relação às boas práticas de produção, manejo na propriedade rural, localização geográfica,

temperatura de armazenamento do leite e distância do transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento.

O ambiente exerce grande influência sobre a contaminação do leite podendo favorecer mais um grupo de bactérias ou outro. Com o advento da refrigeração do leite nas propriedades rurais e com o objetivo de melhorar a qualidade microbiológica do leite, ocorreu uma pressão de seleção favorecendo os microrganismos psicrotróficos. Estes microrganismos produzem enzimas lipolítica e/ou proteolítica que desenvolvem defeitos a longo prazo na produção de leite UAT, sabores indesejáveis e queda do rendimento de queijos conforme descrito por Vidal-Martins et al. (2005).

Na Tabela 4 estão apresentadas as médias das populações de microrganismos psicrotróficos nos dois períodos (chuva e seca) na ordenha manual, onde se verificou as menores médias das populações de microrganismos psicrotróficos de 1,45×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva logo após a obtenção e máxima de 1,27×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> com 96 horas de armazenamento. Para o tempo máximo de armazenamento do leite cru refrigerado na propriedade rural (48 horas) segundo a IN 62 (BRASIL, 2011a) foi verificada média destas populações de 1,57×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, no período da chuva, e, para o período da seca verificou-se a menor média das populações de microrganismos psicrotróficos sendo 1,49×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> logo após a obtenção e, máxima de 2,83×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> após 96 horas de armazenamento. Para o tempo máximo de armazenamento do leite cru refrigerado na propriedade rural (48 horas) segundo a IN 62 (BRASIL, 2011a) foi verificada uma média de 4,91×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para população de microrganismos psicrotróficos.

**Tabela 4.** Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 96 horas oriundas de propriedades com ordenha manual comparando período da chuva e seca com horas de armazenamento. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Horas de	Psicrotróficos	UFC.mL <sup>-1</sup>
Armazenamento	Chuva	Seca
0	1,45×10 <sup>4</sup> Ac	1,49×10 <sup>4</sup> Ab
24	5,92×10 <sup>4</sup> Abc	2,86×10 <sup>4</sup> Aab
48	1,57×10 <sup>5</sup> Aab	4,91×10 <sup>4</sup> Aab
72	8,63×10⁵ Aa	9,00×10 <sup>4</sup> Bab
96	1,27×10 <sup>6</sup> Aa	2,83×10 <sup>5</sup> Aa

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando as diferentes horas de armazenamentos. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 4, pode-se verificar que no período da chuva houve diferença estatisticamente significativa entre a hora 0 em relação a 48, 72 e 96 horas de armazenamento e o leite após 24 horas de armazenamento foi diferente estatisticamente do leite após 72 e 96 horas de armazenamento.

No período seco, pode-se verificar que ocorreram diferenças estatisticamente significativas no leite após a obtenção para o leite com 96 horas de armazenamento, não inferindo nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as demais horas de armazenamento.

Observa-se que as amostras de leite logo no início já apresentaram elevadas médias das populações de microrganismos psicrotróficos tanto no período da chuva quanto no período da seca. No período da chuva, pode—se observar que este tipo de microrganismo foi favorecido pela maior dificuldade higienização dos tetos dos animais. Somando-se a este fator, as instalações são mais precárias e proporcionam menor controle higiênico. Em várias propriedades, não havia água tratada e nem em volume suficiente para higienização correta dos tetos dos animais, utensílios e tanque de expansão.

O Ministério da Saúde publicou a Portaria Nº 2.914 de 12 de Dezembro de 2011 (BRASIL, 2011b) onde determina que água para o consumo, produção e elaboração de alimentos, deve ser clorada e atender os requisitos de potabilidade. E é considerado como um ponto crítico perante IN 62 (BRASIL, 2011a) a qualidade microbiológica da água utilizada na limpeza e sanitização de equipamentos e

utensílios em geral de ordenha a obtenção do leite, exigindo desta maneira a cloração da mesma.

As médias das populações de microrganismos psicrotróficos encontradas no presente estudo para a ordenha manual no período da chuva após 48 horas de armazenamento, foram de 1,57×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e populações semelhantes foram encontradas por Silva et al. (2010) onde realizaram seus estudos no Sudoeste Goiano no período da chuva verificando populações médias de 3,0×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Quando o leite permanece refrigerado na propriedade rural por mais de 48 horas, esta população chega a limites onde a produção de enzimas microbianas (proteases e lipases) podem comprometer a qualidade dos derivados lácteos, Vidal-Martins et al. (2005) descreveram que as atividades enzimáticas das bactérias psicrotróficas passam a ter grande importância quando a contagem ultrapassa 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) e Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) contextualizaram ser imprudente a utilização de leite com populações acima de 5,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Arcuri et al. (2008) e Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) afirmaram que a atividade metabólica (produção de enzimas termo resistentes) destas bactérias resultam em alterações como a alteração do sabor e odor do leite, gelatinização do leite UAT, perda de consistência na formação do coágulo para a fabricação de queijo, limitando desta maneira a vida de prateleira dos produtos lácteos.

Na Tabela 5, estão apresentadas as médias das populações dos microrganismos psicrotróficos verificando a comparação entre as ordenhas mecânica e manual com os períodos da chuva e seca. Foram verificadas populações máximas de 3,46×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na ordenha mecânica e 1,49×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na manual e, mínima de 8,74×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 1,48×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, para o período da chuva. Já no período da seca, as populações mínima verificada na ordenha manual, foram de 1,49×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 8,32×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na mecânica e, máximas de 4,24×10 <sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na manual e 7,67×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na mecânica.

**Tabela 5.** Médias das populações de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado durante 48 horas oriundo de propriedades com ordenha manual ou mecânica comparando período da chuva e seca e ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Horas de	Tipo de	Psicrotróficos UFC.mL <sup>-1</sup>			1
armazenamento	ordenha	Chuva		Seca	
0	Manual	1,48×10 <sup>4</sup>	Aa	1,49×10 <sup>4</sup>	Aa
U	Mecânica	$8,74 \times 10^3$	Aa	$8,32 \times 10^3$	Aa
24	Manual	6,05×10 <sup>4</sup>	Aa	2,86×10 <sup>4</sup>	Aa
24	Mecânica	$4,33 \times 10^4$	Aa	$1,66 \times 10^4$	Aa
48	Manual	1,49×10 <sup>5</sup>	Aa	4,24×10 <sup>4</sup>	Aa
70	Mecânica	$3,46 \times 10^{5}$	Aa	$7,67 \times 10^3$	Ab

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa apenas no período seco e, também apenas entre as médias das populações de microrganismos psicrotróficos das amostras oriundas na ordenha mecânica com 48 horas de armazenamento.

Provavelmente, com 48 horas de armazenamento do leite obtido por ordenha mecânica, que diferiu da ordenha manual, pode estar relacionado com a boa qualidade microbiológica da água de abastecimento das propriedades leiteiras com sistema de ordenha mecanizado, sanitização do sistema antes do início da ordenha e com a realização do *pré-dipping*.

Não se pode descartar também o fato que na ordenha mecânica, realizava duas ordenhas por dia, aumentando a sobreposição de ordenha, mantendo a temperatura de armazenamento do leite mais oscilante desfavorecendo os microrganismos psicrotróficos.

No presente trabalho, as médias das populações de microrganismos psicrotróficos, ficaram entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> muitas das amostras apresentaram populações iguais ou inferiores a 1,0×10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, o que corrobora com as populações encontradas por Arcuri et al. (2008) que realizaram colheitas em 23 tanques individuais e 20 tanques comunitários localizados na Zona da Mata, Minas Gerais (MG) e na região sudeste do Rio de Janeiro (RJ) durante um período de 15 meses e também por Pinto, Martins e Vanetti (2006) em colheitas de amostras de fornecedores de leite de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata

Mineira, onde das 33 amostras de leite colhidas de tanques individuais, as médias das populações de microrganismos psicrotróficos também variaram entre 2,0×10<sup>2</sup> a 1.0×10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Quando se calcula a porcentagem de amostras com populações iguais ou superiores a 1,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, observa-se para o período da chuva uma porcentagem de 35,71% da amostras oriundas das ordenhas mecânica somadas com a manual acima do referido anteriormente e quando trata-se do período seco, este valor fica menor, perfazendo um total de 3,33% das amostras com populações iguais ou superiores de 1,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Logo, quando procede-se com o total de amostras no período da chuva e seca, obtém-se um valor de 18,97% das amostras com populações iguais ou superiores a 1,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Santos et al. (2009) encontraram em seus estudos 14% das amostras com populações de microrganismos psicrotróficos na ordem de 1,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Segundo Santos et al. (2009), as populações de microrganismos psicrotróficos necessário para causar mudanças indesejáveis no leite, varia de acordo com os diferentes gêneros e espécies. Amostras com populações iniciais de microrganismos psicrotróficos 1,0×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> podem exceder os valores de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> quando armazenada a uma temperatura de 7°C por dois dias ou a 5°C por três dias. Quando comparado estes dados com o presente trabalho, verifica-se que o mesmo já possui populações semelhantes a 1,0×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> logo após a obtenção tanto na ordenha manual quanto na mecânica, no período da chuva ou seca. Apesar destas populações, estarem próximas a 1,0×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, conforme descrito por Santos et al. (2009) como provável problema para atingir altas populações em poucos dias, o encontrado neste trabalho, foi relativamente inferior permanecendo o leite na propriedade rural por 2 dias e não ultrapassando os valores de 1,0×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) afirmaram existir controvérsia entre número de bactérias contaminantes e os possíveis defeitos de qualidade no leite e derivados após o processamento e discute os dados de Adams, Barach e Speck (1975), que observaram que altas populações de microrganismos psicrotróficos não são necessárias para uma significativa produção de proteases termorresistentes. Já Kocak e Zadow (1985) verificaram efeito da população dos microrganismos psicrotróficos sobre a geleificação em leite UAT integral, estocado a 25°C, e a

extensão da proteólise, também constataram que amostras de leite UAT processadas com altas e baixas populações bacterianas, geleificaram na mesma proporção independendo da quantidade. Porém, Pinto, Martins e Vanetti (2006) concluíram que o tempo de geleificação não pareceu estar associado somente com a qualidade microbiológica do leite.

Na Tabela 6, estão demonstradas as médias das populações de *Pseudomonas* spp. Isoladas de amostras colhidas de diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado nos períodos da chuva e seca na ordenha manual e mecânica. Para o período da chuva, foram verificadas médias de populações mínimas de 1,09×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na água de abastecimento da sala de ordenha e demais anexos e máxima de 5,40×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no ponto de colheita "Superfície dos tetos após o pré-*dipping*" na ordenha manual. Já no período da seca, as populações mínimas, foram de 1,3×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> do ponto de colheita "Mãos do(s) ordenhador(es) antes da ordenha" e máxima de 1,03×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no ponto de colheita "Latão após a ordenha" ambos os pontos da ordenha manual.

**Tabela 6.** Médias das populações de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado comparando o período da chuva e seca com ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

	Tipo de _	Pseudomonas spp. UFC.mL <sup>-1</sup>	
Ponto de colheita	ordenha	Chuva	Seca
Água	Manual	1,92×10 <sup>2</sup> Aa	3,25×10 <sup>1</sup> Aa
Agua	Mecânica	1,09×10 <sup>1</sup> Aa	2,33×10 <sup>1</sup> Aa
Mãos do ordenhador antes da ordenha	Manual	8,44×10 <sup>2</sup> Aa	1,30×10 <sup>1</sup> Ba
	Mecânica	1,19×10 <sup>2</sup> Aa	2,61×10 <sup>1</sup> Aa
Mãos do ordenhador após a ordenha	Manual	2,48×10 <sup>3</sup> Aa	3,07×10 <sup>1</sup> Ba
	Mecânica	1,10×10 <sup>2</sup> Aa	1,06×10 <sup>2</sup> Aa
Superfície dos tetos antes do pré-	Manual	1,08×10⁴ Aa	4,05×10 <sup>2</sup> Ba
dipping	Mecânica	1,19×10 <sup>2</sup> Ab	4,11×10 <sup>2</sup> Aa
Superfície dos tetos após o pré-dipping	Manual	5,40×10 <sup>4</sup> Aa	1,97×10 <sup>1</sup> Ba
	Mecânica	1,65×10 <sup>2</sup> Aa	1,11×10 <sup>3</sup> Aa
Superfície interna dos baldes/teteiras	Manual	5,86×10 <sup>3</sup> Aa	$3,84 \times 10^{1}$ Bb
antes da ordenha	Mecânica	1,22×10 <sup>3</sup> Aa	1,19×10 <sup>3</sup> Aa
Superfície interna dos baldes/teteiras	Manual	1,28×10 <sup>3</sup> Aa	1,70×10 <sup>1</sup> Bb
após a ordenha	Mecânica	3,67×10 <sup>2</sup> Aa	1,50×10 <sup>3</sup> Aa
Superfície interna do tanque de	Manual	4,10×10⁴ Aa	3,01×10 <sup>3</sup> Aa
expansão antes da ordenha	Mecânica	9,24×10 <sup>2</sup> Ab	8,50×10 <sup>3</sup> Aa
Peneira antes da ordenha	Manual	1,79×10 <sup>3</sup> A	7,27×10 <sup>2</sup> A
Peneira após a ordenha	Manual	5,99×10 <sup>3</sup> A	5,78×10 <sup>2</sup> A
Latão antes da ordenha	Manual	$4,12\times10^3$ A	1,17×10 <sup>3</sup> A
Latão após a ordenha	Manual	6,05×10 <sup>3</sup> A	1,03×10 <sup>4</sup> A

Letras Maiúsculas, fixadas no tipo de ordenha, comparando período da chuva e seca por ponto de colheita. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp. isoladas nos seguintes pontos amostrados: "Mãos do ordenhador antes da ordenha", na ordenha manual, com menores populações no período seco 1,30×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. "Mãos do ordenhador após a ordenha" na ordenha manual, com menores populações no período seco 3,07×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Na "Superfície dos tetos antes do *pré-dipping*" na ordenha manual as menores médias das populações foram no período seco 4,05×10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em comparação com o período da chuva 1,08×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, e também conferido entre a ordenha manual e a mecânica no período chuvoso com menores populações na ordenha mecânica 1,19×10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Na "superfície dos tetos após o *pré-dipping*", as médias das populações de *Pseudomonas* spp. foram estatisticamente diferentes quando comparada a ordenha manual nos períodos de chuva e seca, onde foram verificadas menores médias das populações 1,97×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da seca.

No ponto "Superfície interna dos baldes/teteiras antes da ordenha", as médias das populações de *Pseudomonas* spp. foram estatisticamente diferentes quando se compara os períodos de chuva e seca para a ordenha manual, e entre as ordenha manual e mecânica para o período seco, sendo as menores médias das populações na ordenha manual no período da seca 3,84×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, o mesmo acontece na "Superfície interna dos baldes/teteiras após a ordenha" com as menores médias das populações na ordenha manual no período da seca 1,70×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Na "Superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha" foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp. entre a ordenha manual e a mecânica no período da chuva com populações inferiores na ordenha mecânica (9,24×10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>).

Nos pontos peneira antes e após e latão antes e após a ordenha, não foram verificadas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp.

Na maioria das propriedades onde foram realizadas as colheitas, a fonte de fornecimento de água para tais dependências eram de mananciais subterrâneos e não possuíam nenhum tipo de tratamento. Apesar da qualidade microbiológica da água no que diz respeito a população de *Pseudomonas* spp. serem equivalentes nos tipos manual e mecânica (Tabela 6), existe a probabilidade das populações de microrganismos psicrotróficos no leite de propriedades com sistemas de ordenha mecânica serem maiores devido ao intenso uso da água no sistema por completo.

Quando se trata de água para o consumo, produção e elaboração de alimentos a Portaria Nº 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b) determina que a água deve ser clorada e atender os requisitos de potabilidade. Além disto, a IN 62 (BRASIL, 2011a) descreve que a água utilizada na limpeza e sanitização de equipamentos e utensílios de ordenha torna-se um ponto crítico, exigindo a cloração.

Microrganismos do gênero *Pseudomonas* foram isolados de todos os pontos amostrados, tornando-se necessária a intensificação de ações que promovam a correção desta falha, visto que esta bactéria é bastante prejudicial à qualidade do leite e seus derivados pela produção das enzimas proteolíticas e lipolíticas

termoestáveis. No período da seca, as populações de *Pseudomonas* spp. reduziram, indicando que esta bactéria pode ser de origem ambiental e que depende de umidade elevada para multiplicação.

Fagundes et al. (2006) verificaram populações de 1,49×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na água utilizada em propriedades consideradas como tendo higiene inadequada, populações estas, muito superiores do que as mais altas encontradas no presente trabalho, que foi na ordenha manual no período da chuva com uma população de 1,92×10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> referente ao mesmo ponto de colheita.

Nas Mãos do ordenhador antes e após a ordenha, as populações foram superiores na ordenha manual no período da chuva, sendo mãos antes (8,44×10² UFC.mL-¹) e após (2,48×10³ UFC.mL-¹), podendo ser explicado pelo fato da *Pseudomonas* spp. ser um contaminante ambiental, no período da chuva, os desafios com higienização de modo geral aumentam e, também é muito utilizado neste tipo de ordenha manual, cordas para a contenção dos animais à serem ordenhados e dos bezerros junto as vacas no momento da ordenha e o contato do ordenhador com os animais é maior.

Nos dois pontos de colheita "Superfície dos tetos antes e após o *pré-dipping*" ocorram diferenças estatisticamente significativas entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp. isoladas no período da chuva e da seca da ordenha manual e também entre a ordenha manual e mecânica no período da chuva do ponto de colheita "Superfície dos tetos antes do *pré-dipping*", é justificável pelo fato de na ordenha manual a população inicial de *Pseudomonas* spp. ser superior que a da ordenha mecânica, e como não se realizava nenhum tipo de procedimento de *pré-dipping*, as populações eram mantidas. Com a redução da umidade e temperatura ambiente, por se tratar de bactérias ambientais também ocorreram reduções das populações.

Houve um incremento na população de *Pseudomonas* spp. Isoladas da "Superfície dos tetos após o *pré-dipping*" na ordenha mecânica no período da seca, onde, era apenas utilizado como prática de *pré-dipping* água corrente sem cloração e em duas propriedades realizavam o *pré-dipping* com solução desinfetante comercial a base de iodo em concentração de 4.000 ppm.

Em algumas propriedades onde realizava-se o *pré-dipping*, constatou-se que esta prática não estava surtindo o efeito esperado para a eliminação desta bactéria. Segundo Oliveira et al. (2010) o *pré-dipping* promove a prevenção da contaminação

dos equipamentos de ordenha por microrganismos ambientais. Fernandes et al. (2009) descreveram a ocorrência de multiplicação de *Pseudomonas* spp. na solução de *pré-dipping* e a transmissão desta bactéria para outros animais e afirmaram que nas propriedades pesquisadas as médias das populações de *Pseudomonas* spp. antes do *pré-dipping* eram de 3,55×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na primeira repetição, na segunda repetição 1×10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e na terceira repetição 1×10<sup>0</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e após a aplicação da solução comercial de iodo como *pré-dipping*, as médias das populações foram na primeira repetição 4,00×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, na segunda repetição 5,00×10<sup>0</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e na terceira repetição 1,76×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> demostrando a ineficiência do uso da solução comercial de iodo com 4.000 ppm na eliminação da *Pseudomonas* spp.

Na superfície interna dos baldes/teteiras antes e após a ordenha, o que se tem que levar em consideração é que não estava ocorrendo uma efetiva limpeza dos equipamentos e utensílios utilizados para a obtenção do leite e, consequentemente esta contaminação estava sendo transferida ao leite.

Foi observado nas propriedades providas de ordenha manual que os baldes que o ordenhador utilizava, tinham ferrugem no metal tornando mais difícil sua correta higienização. Também foi notada a ausência de fonte de água quente para melhor higienização e remoção de resíduos de gorduras, reduzindo desta maneira a contaminação e formação de biofilme.

Quando comparada a ordenha manual com a mecânica no período da seca, pode-se verificar que as médias das populações iniciais de *Pseudomonas* spp. nos baldes da ordenha manual, foram menores que nas teteiras da ordenha mecânica e, também foi constatado que algumas propriedades ao realizarem a limpeza do equipamento de ordenha, somente circulavam água quente sem nenhum produto apropriado para remoção de gordura, proteína e minerais do leite e por aproximadamente 3 a 4 minutos, visto que o recomendado pela maioria dos fabricantes de produtos para higienização de ordenhadeiras o tempo hábil para uma eficiente higienização, seria de aproximadamente 15 minutos com cada solução alcalina e ácida, esporadicamente, realizava-se a circulação de solução alcalina e posteriormente solução ácida.

Foi constatado também que 9 das 10 propriedades estudadas não eram empregadas as práticas de sanitização dos equipamentos antes do início da ordenha, colaborando com uma maior contaminação do leite.

Ainda, pode ser descrito que em uma das propriedades estudadas (ordenha mecânica), ocorria flutuação da pressão do vácuo no sistema de ordenha fazendo com que as teteiras caíssem algumas vezes sobre o piso do corredor onde as vacas permaneciam para serem ordenhadas, aumentando desta forma a contaminação do conjunto de teteiras.

Na "Superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha" onde não se realizava uma correta higienização quando o leite era coletado pelo caminhão e também pelo fato de não existir fonte de água tratada, quente (70-75°C) e nem água em volume suficiente em propriedades que realizavam a ordenha manual, ocorria uma limpeza ineficiente e também favorecia a formação de biofilme.

Deve-se levar em consideração que outros equipamentos empregados na obtenção do leite, podem elevar sua contaminação, porém, o leite possui um curto período de tempo de contato, já no tanque de expansão o mesmo permanece por mais tempo, e desta forma, pode ser um dos principais pontos de contaminação. No presente estudo, altas médias de populações de *Pseudomonas* spp. foram isoladas no tanque de expansão antes mesmo de ser colocado leite, verificando desta maneira a falta de limpeza/sanitização adequada.

Na "Peneira antes e após a ordenha" e também o ponto "Latão antes e após a ordenha" não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp. Porém, foram encontradas altas populações desta bactéria podendo colaborar para maior contaminação do leite.

Na Tabela 7, estão descritas as médias das populações de *Pseudomonas* spp. em leite cru refrigerado com a maior média das populações 1,89×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> na ordenha manual no período da chuva após 96 horas de armazenamento e a menor média das populações foi de 3,48×10<sup>3</sup>UFC.mL<sup>-1</sup> no leite cru refrigerado após 48 horas de armazenamento na ordenha mecânica no período da seca.

**Tabela 7.** Médias das populações de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 96 horas de armazenamento comparando o período da chuva e seca com ordenha manual e mecânica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Horas de	Tipo de	Pseudomonas s	Pseudomonas spp. UFC.mL <sup>-1</sup>			
armazenamento	ordenha	Chuva	Seca			
0	Manual	1,46×10 <sup>4</sup> Aa	5,56×10 <sup>3</sup> Aa			
U	Mecânica	6,25×10 <sup>3</sup> Aa	4,25×10 <sup>3</sup> Aa			
24	Manual	1,69×10 <sup>4</sup> Aa	4,15×10 <sup>3</sup> Aa			
	Mecânica	1,72×10 <sup>4</sup> Aa	6,21×10 <sup>3</sup> Aa			
48	Manual	4,67×10 <sup>4</sup> Aa	9,16×10 <sup>3</sup> Aa			
40	Mecânica	3,57×10⁴ Aa	3,48×10 <sup>3</sup> Aa			
72	Manual	8,15×10 <sup>4</sup> A	1,93×10 <sup>4</sup> A			
96	Manual	1,89×10 <sup>6</sup> A	5,78×10 <sup>4</sup> B			

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Após 0, 24, 48, 72 horas de armazenamento, não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações de *Pseudomonas* spp. já, após 96 horas de armazenamento, ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as médias das populações no período da seca comparado com o período da chuva sendo verificadas menores populações no período da seca 5,78×10<sup>4</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>, com cerca de dois ciclos logs a menos.

Deve-se atentar para as altas médias das populações de *Pseudomonas* spp. do leite após a obtenção, não sendo distinto entre as ordenhas e período, o que torna-se um forte indicador da não adoção de boas práticas de higiene, logo, o leite com as populações iniciais elevadas, tende a ser uma matéria prima de baixa qualidade microbiológica.

No caso da ordenha manual onde o leite permanece por mais tempo a baixas temperaturas por ser realizada apenas uma ordenha por dia, e por longas 96 horas de armazenamento, favoreceram a multiplicação destes microrganismos psicrotróficos.

Gargouri, Hamed e Elfeki (2013) reportaram um limite máximo de 4,5×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de bactérias psicrotróficas lipolíticas sendo este um limite de risco para a transformação do leite em derivados lácteos de elaborado processo tecnológico; logo, no presente trabalho, as médias das populações iniciais de *Pseudomonas* spp. no leite rescém ordenhado, foram de 1,46×10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva e

5,56×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> da ordenha manual e 6,25×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva e 4,25×10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da seca da ordenha mecânica. Até 72 horas de armazenamento, o leite ainda se manteve com populações próximas ao limite máximo e quando o leite permane por 96 horas de armazenamento, esta população estrapolava para 1,89×10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> no período da chuva na ordenha manual, podendo desta maneira acarretar defeitos de fabricação em derivados lácteos assim como redução de vida de prateleira do produto.

Segundo Arcuri et al. (2008) realizando um estudo de isolamento e caracterização de psicrotróficos em leite na região da Zona da Mata (MG) e sudeste do Rio de Janeiro (RJ) durante 15 meses, encontraram o gênero *Pseudomonas* como o mais frequente em leite cru refrigerado com 43% do total de amostras colhidas de tanques de expansão individual e coletivo, o que difere do presente trabalho onde 100% das amostras de leite colhidas continham bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Na Tabela 8, pode-se verificar maiores porcentagens *Pseudomonas* spp. apresentando atividade lipolítica no período da seca com diferença estatisticamente significativa entre os pontos de colheita "Água" com 7% de atividade lipolítica das amostras da ordenha manual e 36% para a ordenha mecânica.

**Tabela 8.** Porcentagens de atividade lipolítica de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com atividade lipolítica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

	Período da seca			
Ponto de colheita	Tipo de ordenha	Atividade Lipolítica de Pseudomonas spp. (%)		
Água	Manual	7 b		
Agua	Mecânica	36 a		
Mãos do ordenhador antes da ordenha	Manual	21 a		
maos do ordermador antes da orderma	Mecânica	24 a		
Mãos do ordenhador após a ordenha	Manual	12 a		
maos do ordermador apos a orderma	Mecânica	24 a		
Superfície dos tetos antes do pré-dipping	Manual	10 a		
Superficie dos tetos antes do pre-dipping	Mecânica	16 a		
Superfície interna dos baldes/teteiras antes	Manual	13 a		
da ordenha	Mecânica	32 a		
Superfície interna dos baldes/teteiras após	Manual	10 a		
a ordenha	Mecânica	17 a		
Superfície interna do tanque de expansão	Manual	11 a		
antes da ordenha	Mecânica	24 a		

Letras Minúsculas, fixadas no período da seca, comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 8, está sendo realizada a comparação entre tipo de ordenha (manual/mecânica) no período da seca pelo motivo de não ter ocorrido presença da atividade lipolítica no período da chuva. O único ponto de colheita que diferiu estatisticamente para porcentagem de atividade lipolítica, foi a Água, com menor porcentagem para a ordenha manual frente à mecânica.

Também ocorreu atividade lipolítica, porém sem diferença estatisticamente significativa nos demais pontos amostrados.

Para os pontos não descritos nesta tabela, não foram verificadas atividade lipolítica em nenhum dos períodos. No período da chuva, não ocorreu atividade lipolítica produzida por *Pseudomonas* spp. em 14 dos 17 pontos amostrados.

As maiores ocorrências desta atividade foram no período da seca conforme apresentado na Tabela 8, tal situação também foi descrita por Moreira e Montanhini (2014) onde realizaram estudos no Estado do Paraná no período da seca e encontraram 64 (44,1%) de um total de 145 amostras com *Pseudomonas* spp. apresentando atividade lipolítica.

Por não haver diferença estatisticamente significativa entre os demais pontos amostrados, todos podem contribuir igualmente para maior contaminação do leite cru refrigerado.

Na superfície interna do tanque de expansão, foi encontrada maior atividade lipolítica produzida por *Pseudomonas* spp. na ordenha mecânica (24%), sendo encontrado apenas no período seco. No trabalho de Moreira e Montanhini (2014), realizado em propriedades leiteiras do Estado do Paraná, no período seco do ano de 2013, relata a ocorrência de atividade lipolítica (50% das amostras) na superfície interna do tanque de expansão. No presente trabalho, verificou-se 44% das amostras (ordenha manual com a mecânica) também no período da seca.

Na tabela 9, pode-se observar que as porcentagens de atividade lipolítica produzidas por *Pseudomonas* spp. foi no leite após a obtenção com 10% das amostras da ordenha manual e 32% para a ordenha mecânica, no leite após 24 horas de armazenamento, obteve-se 10% das amostras da ordenha manual apresentando atividade lipolítica e 33% para a ordenha mecânica, no leite e no leite após 48 horas de armazenamento, também na ordenha mecânica, 39% das amostras coletadas apresentaram atividade lipolítica.

**Tabela 9.** Porcentagens de atividade lipolítica de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 48 horas de armazenamento, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com atividade lipolítica. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

	Período da seca			
Horas de armazenamento —	Tipo de ordenha	Atividade Lipolítica de Pseudomonas spp. (%)		
	Manual	10 b		
0	Mecânica	32 a		
24	Manual	10 b		
24	Mecânica	33 a		
48	Manual	12 a		
	Mecânica	39 a		

Letras Minúsculas comparando tipos de ordenha e atividade lipolítica no período da seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05. Fonte: Própria autoria.

Na tabela 9, é possível observar que houve diferença estatisticamente significativa no leite cru refrigerado após a obtenção (0 hora) e após 24 horas de

armazenamento. Nas duas situações, as menores porcentagens de atividade lipolítica foram na ordenha manual.

Quando se observa o comportamento de bactérias produtoras de enzimas lipolíticas, pôde-se verificar que no leite cru refrigerado nas diferentes horas de armazenamento (0, 24 e 48 horas) as porcentagens de atividade lipolítica produzida pelas *Pseudomonas* spp., foram superiores também na ordenha mecânica, possivelmente devido a quantidade de sobre ordenha realizada neste tipo de ordenha e consequentemente a temperatura do leite fica um pouco mais elevada onde, segundo Arcuri et al. (2008) as *Pseudomonas* spp. apresentam maior atividade lipolítica em temperatura de estocagem de 7°C (90,9% das amostras produziram esta enzima) e 81,81% das amostras produziram esta enzima a temperatura de 10 e 21°C. Ainda é possível verificar em seu trabalho que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* possui a produção da enzima lipolítica a 4, 7, 10 e 21°C (onde 100% das amostras apresentaram atividade lipolítica).

Na Tabela 10 estão apresentadas as porcentagens de atividade proteolítica das *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras de diferentes pontos de colheita, sendo que as maiores porcentagens de atividade proteolítica foi no período da chuva com exceção do ponto de colheita "Mãos do(s) ordenhador(es) antes da ordenha" no tipo de ordenha mecânica na período seca que apresentou 72% das amostras positivas para esta atividade, seguido do ponto "Superfície interna dos baldes/teteiras após a ordenha" no período da chuva para a ordenha manual com 71% das amostras com a produção de protease e posteriormente com "Superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha" na ordenha mecânica com 67% das amostras produzindo tal enzima, também no período da chuva.

**Tabela 10.** Porcentagens de atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras colhidas em diversos pontos durante a obtenção do leite cru refrigerado, comparando tipo de ordenha manual e mecânica com período da chuva e seca. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Donto do Calhaita	Tipo de	Atividade proteolítica de Pseudomonas spp. (%)		
Ponto de Colheita	ordenha .	Chuva	Seca	
Água	Manual	27 Aa	7 Ab	
Agua	Mecânica	33 Aa	50 Aa	
Mãos do ordenhador antes da ordenha	Manual	43 Aa	19 Aa	
maos do ordermador antes da orderma	Mecânica	51 Aa	72 Aa	
Mãos do ordenhador após a ordenha	Manual	20 a		
	Mecânica	48 a		
Superfície do teto antes do pré-dipping	Manual	40 Aa	6 Ba	
	Mecânica	14 Aa	18 Aa	
Superfície do teto após o pré-dipping	Manual		24 a	
	Mecânica		34 a	
Superfície interna da teteira/balde antes	Manual	46 Aa	20 Aa	
da ordenha	Mecânica	33 Aa	10 Aa	
Superfície interna da teteira/balde após	Manual	71 Aa	6 Ba	
a ordenha	Mecânica	23 Aa	56 Aa	
Superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha	Manual	33 Aa	23 Aa	
	Mecânica	67 Aa	29 Ba	

Letras Maiúsculas, fixadas no ponto de colheita, comparando período da chuva e seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0,05.

Conforme exposto na Tabela 10, as maiores porcentagens de *Pseudomonas* spp. apresentando atividade proteolítica, foram isoladas no período da chuva. Corroborando com Moreira e Montanhini (2014) onde realizaram estudos no Estado do Paraná no período seco do ano e encontraram apenas 16 (11,03%) de um total de 145 amostras com *Pseudomonas* spp. apresentando atividade proteolítica.

Uma hipótese em que podemos proceder com o raciocínio, seriam diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* influenciadas pela temperatura e umidade do ambiente. Um fator de risco para propiciar a contaminação do leite, é que em quase todos os pontos amostrados apresentaram atividade proteolítica evidenciando ainda mais a necessidade de ações conjuntas para controle deste microrganismo.

<sup>-</sup> Sem atividade. Fonte: Própria autoria.

Como apresentado na Tabela 8 (atividade lipolítica) no ponto de colheita "Água" no período da seca, na ordenha mecânica, repetiu a situação na Tabela 10, onde a água da ordenha mecânica no período da seca, a porcentagem de amostras com atividade proteolítica foi superior (50%) quando comparada com a ordenha manual (7%) diferindo entre si estatisticamente. Resultados estes demonstram a baixa qualidade da água de suprimento de todo o sistema de ordenha, podendo proporcionar maiores riscos e comprometimento da qualidade de derivados lácteos devido a elevadas concentrações enzimáticas e comprometimento da vida de prateleira do produto.

Nas "Mãos do ordenhador antes e após a ordenha" não foi observada diferença estatisticamente significativa na atividade proteolítica das *Pseudomonas* spp. isoladas nos tipos de ordenha (manual e mecânica) e período (chuva e seca), porém, não se pode ignorar a situação de que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, na ordenha mecânica durante a seca verificou-se 72% das *Pseudomonas* spp. isoladas nas amostras apresentando atividade proteolítica, sendo preocupante pelo fato de trazer risco de comprometimento da qualidade do leite.

Durante as colheitas das amostras nas propriedades rurais, foi observado que das dez propriedades amostradas, apenas uma propriedade o ordenhador realizava a lavagem das mãos antes do início das atividades de ordenha.

No ponto de colheita "Superfície do teto antes do *pré-dipping*" verificou-se diferença estatisticamente significativa entre a atividade proteolítica das *Pseudomonas* spp. isoladas em leite oriundo de ordenha manual no período da chuva (40%) para a período seca (6%) com menores porcentagens de *Pseudomonas* spp. apresentando a enzima proteolítica conforme o verificado em pontos de colheita anteriores, onde, todos foram superiores no período da chuva.

Logo, na "Superfície do teto após o *pré-dipping*", não foi observado a expressão da atividade proteolítica, fator que pode ser levado em consideração, com relação à ação eficiente da solução de *pré-dipping* sobre estas bactérias.

Nos pontos "Superfície interna dos baldes/teteiras antes e após a ordenha" e "Superfície interna do tanque de expansão antes da ordenha", foram encontradas altas porcentagens de *Pseudomonas* spp. com atividade proteolítica no período da chuva e pode-se presumir que limpeza ineficiente destes utensílios pode favorecer a formação de biofilme onde, segundo Teh et al. (2012), a fixação bacteriana no aço

inoxidável aparentemente eleva a proteólise. Como exemplo, a *Pseudomonas fluorescens* foi capaz de produzir proteólise a 20, 30 e 37°C em biofilmes (TEH et al. 2012).

Na Tabela 11, pode-se verificar as maiores porcentagens de *Pseudomonas* spp. apresentando atividade proteolítica no período chuvoso nos dois tipos de ordenha. Foi verificado a menor porcentagem (16%) de *Pseudomonas* spp. apresentando atividade proteolítica na ordenha manual no período da seca no leite após 48 horas de armazenamento e a maior porcentagem (45%) também foi da ordenha mecânica no período da chuva no leite após 48 horas de armazenamento.

**Tabela 11.** Porcentagens de atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras de leite cru refrigerado durante 48 horas de armazenamento, comparando ordenha manual e mecânica com o período da chuva e seca. As colheitas foram realizadas em propriedades rurais pertencentes a Regional agrícola do Escritório de Desenvolvimento Rural – EDR Limeira – SP, no período de novembro de 2013 a agosto de 2014.

Horas de armazenamento	Tipo de	Atividade Proteolítica (%)	
noras de armazenamento	ordenha _	Chuva	Seca
	Manual	33 Aa	27 Aa
U	Mecânica	43 Aa	27 Aa
48	Manual	29 Aa	16 Aa
40	Mecânica	45 Aa	17 Aa

Letras Maiúsculas, fixadas na(s) hora(s) de armazenamento, comparando período da chuva e seca. Se diferentes, são significativos a P<0,05;

Letras Minúsculas, fixadas nos períodos (chuva ou seca), comparando tipos de ordenha. Se diferentes, são significativos a P<0.05. Fonte: Própria autoria.

Os resultados apresentados na Tabela 11 demonstram que não houve diferença significativa para atividade proteolítica de *Pseudomonas* spp. Quando comparado horas de armazenamento, períodos (chuva e seca) e tipo de ordenha. No entanto, no período da chuva, ocorreu uma tendência ao aumento da atividade proteolítica na ordenha mecânica. No trabalho desenvolvido por Moreira e Montanhini (2014) foram verificadas maior atividade proteolítica das *Pseudomonas* spp. em uma das propriedades pesquisadas, onde, na mesma era feito o uso de água clorada antes da ordenha e não era desprezado os três primeiros jatos de leite. Nas propriedades onde ocorreram as colheitas das amostras com ordenha mecânica nenhuma realizava o descarte dos três primeiros jatos. Nas propriedades com ordenha manual, o correspondente a este volume de descarte dos três primeiros jatos, era consumido pelo bezerro no ato de estimular a ejecão do leite, sendo desta

maneira uma justificativa de ter encontrado esta porcentagem superior de *Pseudomonas* spp. na ordenha mecânica frente a manual.

### 5. Conclusão

Foi observado um descumprimento dos padrões microbiológicos no leite cru refrigerado oriundo dos dois tipos de ordenha e também nos dois períodos (chuva e seca) nas contagens padrão em placas para os microrganismos aeróbios mesófilos.

Elevadas populações dos microrganismos psicrotróficos viáveis foram evidenciadas no leite cru refrigerado coletado nas propriedades rurais com ordenha manual ou mecânica podendo comprometer a qualidade deste leite.

Em todos os pontos de colheitas realizados nas propriedades rurais e também no leite cru refrigerado colhido a cada 24 horas de armazenamento, foi isolado *Pseudomonas* spp. sendo um fator de risco para a qualidade, rendimento e tempo de prateleira dos derivados lácteos produzidos a partir deste leite.

A atividade lipolítica, produzida por *Pseudomonas* spp. foi verificada praticamente somente no período seco do ano, não sendo muito evidenciado no período da chuva.

Foi verificada atividade proteolítica produzida por *Pseudomonas* spp. nos dois períodos do ano em vários pontos amostrados e também no leite crú refrigerado, com maior ênfase no leite cru refrigerado obtido por ordenha mecânica.

## 6. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS - ABNT. **NBR12121**: microrganismos viáveis aeróbios e anaeróbios em alimentos: contagem padrão em placa. Rio de Janeiro, 1991. 2 p.

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

ALATOSSAVA, P. M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bactéria. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 161, p. 334-346, 2006.

ALMEIDA, G. M. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, no município de ouro preto do oeste – rondônia – brasil. 2010. 130f. Tese (Doutorado) Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

ALMEIDA, A. C. et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **Revista Unifenas**, Alfenas, v. 5, p.165-168, 1999.

ALMEIDA, E. S. **Diagnóstico da pecuária leiteira dos municípios de batalha, major izidoro e craíbas, do estado de alagoas**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: APHA, 2001, 676 p.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ATTITALLA, I. H. et al. 16S Rdna analysis for characterization of *Pseudomonas* sp. Strain MF30 isolated from Rumex acetocella roots in northern Sweden. **Arab Journal of Biotechnology**, Egypt, v. 10, n. 1, Jan. 2006.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal/SP: FUNEP, 2006. 237 p.

BEERENS, H.; LUQUET, F. M. Guía practica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A, 1990.

- BELOTI, V. et al. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 20, n. 1, p. 12-15, 1999.
- BERSOT, L. S. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná Brasil. **Semina. Ciências Agrárias,** Londrina, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de Dezembro de 2011. Aprova os regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado, a coleta do leite cru refrigerado e o transporte. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011a. Seção I, p. 6-11
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 2.914, de 12 de dezembro 2011. Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 12 dez. 2011. Brasília, DF, 2011b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 172, 20 set. 2002. Seção I., p. 8-13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).** Pescados e Derivados. Brasília, DF, 29 mar. 1952. Seção 1, C.7.
- BRAVERMAN, J. B. S. Introduccion a la bioquímica de los alimentos. Cidade do México: Editorial El Manual Moderno, 1980. 359 p.
- BRITO, J. R. F. et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.
- BUENO, V. F. F. et al. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 15, p. 40-44, 2008.
- CARDOSO, R. R. Influencia da microbiota psicrotrofica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- CAIXETA, D. S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 142-150, 2012.
- CASAROTTI, S. N. et al. Enumeração de bactérias psicotrópicas em leite cru bovino com a utilização de metodologia tradicional e do sistema Compact Dry. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, p. 19-25, jul./ago. 2009.

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

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. **Revista Leite Integral**, Piracicaba, 2007.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Psycrhrotrops in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 34, p. 1-30, 1994.

CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Perspectivas para a agropecuária – Safra 2013-2014.** Brasília, v. 1, p. 1-154, 2013.

COSTA, F. F. Interferência de práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzidos em propriedades rurais familiares. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119-163.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk - a review. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 79, p. 197-210, 2001.

DUFOUR, D. et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, p. 188-196, 2008.

FAGUNDES, C. M. et al. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FERNANDES, M. C. et al. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.

FERREIRA, A. A. et al. Influencia da atividade enzimática de *Pseudomonas Fluorescens* 041 em Labneh. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 385, p. 17-24, mar./abr. 2012.

- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FREITAS FILHO, J. F. et al. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 2, p. 38-46, 2009.
- GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 78, n. 9, p. 1405-1411, 2013.
- GOMES, S. T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A. S. **Cadeia de lácteos no Brasil**: restrições ao seu desenvolvimento. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2001. p. 21-37.
- GOMES, M. I. F. V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. 1988. 85 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Experientia**, Basel, v. 42, n. 11-12, p. 1192-1197, 1986.
- GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origem. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 50, p. 289-303, 1981.
- GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 16, n. 102-103, p. 25-34, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA IBGE. **Estatística da produção pecuária.** Brasília: IBGE, 2014. p.1-49.
- \_\_\_\_\_. **Produção pecuária municipal.** Brasília: IBGE, 2006. p. 1-62. Disponível em: <a href="http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2006/ppm2006.pdf">http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2006/ppm2006.pdf</a>. Acesso em: 30 jun. 2015.
- IZIDORO, T. B. Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.
- JAY, J. M. Microbiologia dos alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.
- KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n. p. 167-188, 1981.

- KOCAK, H. R.; ZADOW, J. G. Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, n. 1, p. 14-21, 1985.
- KOHLMANN, K. L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microrganisms. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, p. 3275-3283, 1991.
- LANGONI, H. et al. Contagem de células somáticas e de microrganismos mesófilos aeróbios em leite cru orgânico produzido em Botucatu (SP). **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 18, n. 4, p. 653-660, 2011.
- LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 44, p. 145-148, 1977.
- MACHADO, S. G. **Detecção de Pseudomonas fluorescens em leite cru pela reação em cadeia da polimerase**. 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- MACHADO, P. F. et al. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 359-361, 2000.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.
- MARCHAND, S. et al. Heterogeneity of heatresistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, p. 68-77, 2009.
- MARTINS, M. E. P. et al. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.
- MARTINS, M. L. et al. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 102, p. 203-211, 2005.
- MITCHELL, G. E. The contribution of lactose, chloride, citrate, and lactic acid to the freezing point of milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 44, p. 61-64, 1989.
- MOREIRA, G. I. P. Caracterização de bactérias gram positivas psicrotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos. Tese (Doutorado) Universidade de Lavras, Lavras-MG, 2010.
- MOREIRA, N. V.; MONTANHINI, M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por microorganismos proteolíticos e lipolíticos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 8, n. 2, p. 29-38, 2014.

- MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **International Journal of Dairy Technology**, Chichester, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.
- MULLER, E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: Nupel, 2002. p. 206-217.
- NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NERO, L. A. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., Listeria monocytogenes and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 211-215, 2004.
- NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Maringá, v.37, n. 2, p. 157-163, 2009.
- OLIVEIRA, R. P. S. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.
- OLIVEIRA, U. V. et al. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e produção Animal,** Salvador, v. 11, n. 3, p.630-640, 2010.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília São Paulo/Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandopolis, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.
- PORETTI, M. Quality controlo of water as raw material in the food industry. **Food Control**, Kidlington, v. 1, n. 2, p. 79-83, 1990.
- PRATA, L. F. Fundamentos de ciência do leite. São Paulo: FUNEP, 2001. 287 p.
- QUIST, M. A. et al. Milking-to-milking variability for milk yeld, fat and protein percentage, and somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, p. 3412-3423, 2008.
- REIS, G. L. et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1134-1138, 2007.

- RIBEIRO NETO, A. C. et al. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.
- ROSA, A. F. Ocorrência natural de aflatoxina m1 e parâmetros de qualidade do leite em propriedades do estado de São Paulo. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP, 2014.
- SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, Zagred, v. 62, v. 2, p. 77-95, 2012.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandopolis, v. 15, p. 27-33, 2001.
- SANTOS, J. M. **Leite cru refrigerado**: características físico-quimicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicrotroficos. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.
- SANTOS, P. A. et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, 2009.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, [Pirassununga], v.19, p. 12-15, 2003.
- SANTOS, M. V. CCS E CBT siglas fundamentais para avaliar qualidade. **Balde Branco**, São Paulo, v. 15, n. 490, p. 48-51, ago. 2005.
- SANTOS, M. V. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 5., 2001; ENCONTRO ANUAL DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p, 115-127.
- SARAN NETTO, A. et al. Estudo comparativo da qualidade do leite em ordenha manual e mecânica. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 345-349, 2009.
- SAS Institute Inc. SAS OnlineDoc. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2005. v. 9.1.3,

- SHIRAI, M. A. Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- SILVA, C. G. Tratamento da água e práticas de manejo na ordenha e sua interferência na qualidade do leite. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.
- SILVA, M. A. P. et al. Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 112-118, 2010.
- SILVA, Z.N. et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.
- SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Importância de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandopolis, v.12, p 21-25, 1998b.
- SILVEIRA, N. V. V. et al. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 49, n. 1, p. 19-25, 1989.
- SIMONI, F. J. et al. Qualidade do leite proveniente de propriedades com diferentes níveis de especialização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1901-1912, 2013.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, London, v. 43, p. 229-237, 2009.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 8, p. 35-41, 1997.
- SWAISGOOD, H. E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracelular lipase from Pseudomonas fluorescens MC 50. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 32, p. 7-10, 1984.
- TEH, K. H. et al. Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 157 p. 28-34, 2012.
- TERNSTRON, A.; LINDBERG, A. M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Chichester, v. 75, p. 25-34, 1993.

VALEEVA, N. I. et al. Improving food safety at the dairy farm level: farmers' and expert's perceptions. **Review of Agricultural Economics**, Lexington, v. 27, n. 4, p. 574-592, 2005.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite uat/uht. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

VINHOLIS M. M. B.; BRANDÃO H. M. Economia de escala no processo de resfriamento do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, jan./fev. 2009. Disponivel em:<a href="http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000100034">http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000100034</a>>. Acesso em: 23 set. 2015.

## 7. ANEXO I



Data:

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Comitê de Ética em Pesquisa

#### CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.778.74.0 **Projeto:** Avaliação da qualidade microbiológica, contagem de Pseudomonas spp. E sua importância durante a obtenção e armazenamento de leite cru refrigerado no período de seca e chuva. Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado. Recomendação do Comitê de Ética: Aprovação. Não aprovado. Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados. Retirado de pauta. Pirassununga, 18 de setembro de 2014. Notifique-se o interessado. Profa. Dra. Paniele dos Santos Martins - Presidente do CEP/FZEA Via do Parecer retirada pelo interessado: Nome/Assinatura: \_