UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

RAFAELA TORREZAN PRIVATTI

Efeitos da contagem bacteriana total do leite cru
refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos,
microbiológicos e rendimento durante a vida útil do
queijo Minas Frescal

Pirassununga
2017

RAFAELA TORREZAN PRIVATTI

Efeitos da contagem bacteriana total do leite cru
refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos,
microbiológicos e rendimento durante a vida útil do
queijo Minas Frescal

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
a obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Saran
Netto

Pirassununga
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP961 Privatti, Rafaela Torrezan
Efeitos da contagem bacteriana total do leite
cru refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos,
microbiológicos e rendimento durante a vida útil do
queijo Minas Frescal / Rafaela Torrezan Privatti ;
orientador Arlindo Saran Netto. -- Pirassununga,
2017.
85 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. avaliação físico-química. 2. avaliação
microbiológica. 3. Leite cru 4.queijo fresco. I. Saran
Netto, Arlindo, orient. II. Título.

RAFAELA TORREZAN PRIVATTI

Efeitos da contagem bacteriana total do leite cru refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e rendimento durante a vida útil do queijo Minas Frescal

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Data de aprovação: ____/ ____/ ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição _____

*Aos meus pais e noivo, que nunca
desistiram de mim. Mãe, seu cuidado e
dedicação foi o que me deu, em alguns
momentos, a esperança para seguir. Pai,
sua presença significou segurança e
certeza de que não estou sozinho nessa
caminhada.*

Agradecimentos

Primeiramente a *Deus* e a *Santa Rita de Cássia* pela força e coragem para conquistar meus objetivos.

Ao *Prof. Dr. Arlindo Saran Netto* pela confiança e orientação.

A *Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal* pelo empréstimo do laboratório, orientação, auxílio no decorrer da pesquisa, conselhos e carinho.

Ao *Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro* pela assistência nas análises estatísticas.

À querida técnica de laboratório *Dra. Andréia Cristina Nakashima Vaz* por sua amizade, ensinamentos, carinho e auxílio nas análises laboratoriais.

Aos meus (as) estagiários (as) *Gustavo, Ângela, Caroline e Ariana* pela ajuda, animação e dedicação no decorrer das análises de laboratório e fabricação dos queijos.

À colega *Natália Bertini* pelo companheirismo e carinho a mim concedido.

Ao *Rafael, Rose, Rosilda e João* pela facilitação e auxílio nas análises laboratoriais.

Aos funcionários (as) do laticínio do campus “Fernando Costa” pela paciência e ajuda na fabricação dos queijos.

Ao meu noivo *Me. Marcelo Candido* pelo carinho, a paciência, o companheirismo, os ensinamentos e por sua capacidade de me trazer paz.

A minha mãe *Zélia* e meu pai *José Luis Privatti* por todo amor e pelo apoio em minha escolha e serem muito importantes em minha vida.

Aos meus *avôs* e demais *familiares* pelo carinho e apoio.

À *Capes* pela concessão da bolsa de mestrado, o qual me proporcionou me dedicar exclusivamente nessa pesquisa.

Aos professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP-Pirassununga, SP) pelos ensinamentos e contribuições.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos."

(Charles Chaplin)

RESUMO

PRIVATTI, R. T. **Efeitos da contagem bacteriana total do leite cru refrigerado sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e rendimento durante a vida útil do queijo Minas Frescal**. 2017. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A Contagem Bacteriana Total (CBT) é um critério de avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite. O presente estudo teve por finalidade avaliar o efeito da CBT do leite cru refrigerado, sobre as características físico-químicas, microbiológicas e rendimento do queijo Minas Frescal. Utilizaram-se leites com dois níveis de CBT para a fabricação dos queijos: baixa CBT= média de 18.400 UFC/mL e alta CBT= média de 74.100 UFC/mL. As etapas de elaboração dos queijos incluíram a pasteurização do leite, adição dos ingredientes (cloreto de cálcio, cloreto de sódio e coalho), coagulação e obtenção do coágulo, dessoragem, enformagem e embalagem. Os queijos foram embalados em embalagens plásticas e analisados nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação e durante esse período foram mantidos em câmara fria a 6°C. A sequência de elaboração dos queijos foi repetida 3 vezes, para cada nível de CBT, totalizando 60 unidades por tratamento. Cinco unidades de queijos foram analisadas por dia, os parâmetros físico-químicos avaliados foram: teores de umidade, proteína e gordura, índices de extensão e profundidade da proteólise, pH, acidez titulável e extensão da lipólise, e os microbiológicos: coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Utilizou-se um delineamento experimental em parcelas subdivididas em blocos, considerando-se a contagem bacteriana total como efeito principal, os dias de análise como subparcelas e os processamentos como blocos. Nos queijos Minas Frescal não houve interação dos níveis de CBT e período de armazenamentos para os teores de umidade, proteína, gordura e índices de extensão e profundidade da proteólise. Entretanto, houve efeito dos níveis de CBT para as porcentagens médias de proteína e índices de extensão e profundidade da proteólise, com valores superiores para o tratamento com alta CBT, para o teor de umidade houve efeito dos níveis de CBT, com médias de 63,46% e 60,77% para os tratamentos com baixa e alta CBT, respectivamente. Independentemente dos níveis de CBT, houve efeito do período de armazenamento, com decréscimo no teor médio de umidade e elevação nos teores médios de gordura, proteína e índice de extensão da proteólise. Para as características de pH e acidez titulável houve interação para os níveis de CBT e período de armazenamento, a partir do 14º dia. O pH do tratamento com baixa CBT apresentou variação discreta (6,59-6,49), enquanto que para o tratamento com alta CBT houve decréscimo de 6,72

para 6,15, o aumento de acidez foi verificado em ambos os tratamentos, porém em maior grau no grupo de alta CBT. A extensão da lipólise apresentou interação para os níveis de CBT e período de armazenamento, no 21º dia após a fabricação, com aumento no teor de ácidos graxos livres. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* não foram encontradas nos queijos, 5,2% das amostras apresentaram coliformes termotolerantes, porém em contagem permitida pela legislação brasileira. No entanto, no 14º dia após a fabricação, 9,56% das amostras apresentaram estafilococos coagulase positiva, em contagens superiores aos padrões legais. O rendimento dos queijos Minas Frescal não sofreu influência dos níveis de CBT. Os resultados do trabalho indicaram que os queijos Minas Frescal produzidos com leites contendo CBT inferior a 50.000 UFC/mL, originam produtos mais estáveis e de melhor qualidade ao longo do período de armazenamento.

Palavras chave: avaliação físico-química, avaliação microbiológica, leite cru, queijo fresco.

Abstract

PRIVATTI, R. T. **Effects of the total bacterial count of the refrigerated raw milk on the physicochemical parameters, microbiological and yield during the shelf life of the Minas Frescal cheese.** 2017. 86f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The Total Bacterial Count (TBC) is a criterion for the evaluation of hygienic-sanitary quality of milk. The present study had the purpose of evaluating the effect of TBC of the refrigerated raw milk, on the physical-chemical characteristics, microbiological and yield of the Minas Frescal cheese. Milks with two levels of TBC were used for cheese production: low TBC= mean of 18400 CFU/mL and high TBC= mean of 74100 CFU/mL. The manufacture of cheeses included: pasteurization of the milk, addition of ingredients (calcium chloride, sodium chloride and rennet), coagulation, mass cutting, desorption, forming and packaging. The cheeses were packed in plastic bags and analyzed on days 1, 7, 14 and 21 after manufacture and during that period were kept in a cold chamber at 6°C. The sequence of elaboration of the Minas cheeses were repeated 3 times, for each level of TBC, totaling 60 units per treatment. Five cheese units were analyzed per day, the physical-chemical parameters evaluated were: percentages of fat, humidity, protein, extension and depth of proteolysis, pH, titratable acidity and extent of lipolysis, and the micro-organisms evaluated were: thermotolerant coliforms, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. A completely randomized block design was used, considering TBC as the main effect, the days of analysis as sub parcels and the processing batches as the blocks. In the Minas Fresch cheese there weren't interaction for TBC levels and storage period for humidity, protein, fat contents and extension and depth of proteolysis. However, there were effect for TBC levels and protein percentages and extension and depth of proteolysis, with higher values for treatment with low TBC, for moisture content there was effect for TBC levels, with averages of 63.46% and 60.77% for treatments low and high TBC, respectively. Regardless of TBC levels, there were effect for the storage period, with decreases in the moisture content and elevation in the protein, fat contents and proteolysis extension index. For the characteristics pH and titratable acidity there were interaction for TBC levels and storage period, on day 14, for pH the treatment with low TBC did not present expressive variation (6.59-6.49), while the treatment high TBC presented a decrease from 6.72 to 6.15, the increase of acidity was observed in both treatments, but to a greater extent in the high TBC group. The extent of lipolysis showed interaction for TBC levels and storage period, on day 21, with elevation of content of free

fatty acids. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not found in the cheeses. 5.2% of the samples presented thermotolerant coliforms but in count allowed by the brazilian legislation. However on the 14th day after the manufacture, 9.56% of the samples presented coagulase-positive staphylococci in scores above legal standards. The yield of the Minas Frescal cheeses was not influenced by TBC levels. The results of the study indicated that Minas Frescal cheeses produced with milks containing TBC of less than 50.000 CFU/mL produce more stable and better quality products throughout the storage period.

Keywords: fresh cheese, microbiological evaluation, physico-chemical evaluation, raw milk.

Lista de Figuras

Figura 1- Resultados da contagem bacteriana total dos leites crus refrigerados utilizados para fabricação dos lotes de queijos Minas Frescal.	39
Figura 2- Etapas de Fabricação do Queijo Minas Frescal.	41
Figura 3- Fluxograma de Produção do Queijo Minas Frescal.	42
Figura 4- Variação do teor de umidade dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.	54
Figura 5- Variação dos teores de proteína e gordura dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.	54
Figura 6- Médias do pH dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.	56
Figura 7- Médias da acidez titulável (% de ácido láctico) dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.	56
Figura 8- Médias da avaliação da extensão da lipólise (mg de KOH/ g de gordura) dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.	57
Figura 9- Comportamento dos índices de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.	58

Lista de Quadros

Quadro 1- Condições microbiológicas e contagem de células somáticas (IN-62; IN-7).	22
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1- Critérios de aceitação para Queijo Tipo Minas Frescal.	34
Tabela 2- Médias das contagens de mesófilos e psicrotróficos dos leites crus refrigerados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.	51
Tabela 3- Médias da composição físico-química dos leites crus refrigerados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.	51
Tabela 4- Médias das contagens de mesófilos e psicrotróficos dos leites pasteurizados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.	52
Tabela 5- Porcentagens médias (g/100g) de umidade, proteína e gordura dos queijos Minas Frescal, de acordo com a CBT dos leites crus refrigerados.	53
Tabela 6- Porcentagens médias (g/100g) de umidade, proteína e gordura dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.	53
Tabela 7- Médias do pH e acidez titulável dos queijos Minas Frescal, de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.	55
Tabela 8- Médias da avaliação da extensão da lipólise dos queijos Minas Frescal, de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.	57
Tabela 9- Porcentagens dos índices de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT dos leites cru refrigerados.	58
Tabela 10- Porcentagens médias do índice de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.	58
Tabela 11- Médias das contagens dos micro-organismos, conforme previsto na RDC-12, dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.....	59
Tabela 12- Porcentagens de queijos Minas Frescal positivos (NMP/g) para a contagem de coliformes termotolerantes (45°C), de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados.	59
Tabela 13- Porcentagens dos rendimentos médios da produção dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT dos leites crus refrigerados.	60

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

°C	Graus Celsius
°H	Graus Hortvert
=	Igual
®	Marca Registrada
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
BP	Agar Baird Parker
BS	Agar Bismuto Sulfito
CBT	Contagem Bacteriana Total.
CCS	Contagem de Células Somáticas
céls	Células
CPP	Contagem Padrão em Placas
EC	Caldo <i>E. coli</i>
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Gramas
GES	Gordura no Extrato Seco
HE	Agar Entérico de Hectoen
IN-7	Instrução Normativa nº7
IN-62	Instrução Normativa nº62
kg	Quilograma

KOH	Hidróxido de Potássio
LEB	Caldo de Enriquecimento de <i>Listeria</i>
LPM	Agar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
mL	mililitro
NCIMS	National Conference on Interstate Milk Shipments
NNC	Nitrogênio não-caseico
NNP	Nitrogênio não-protéico
NT	Nitrogênio Total
NMP	Número Mais Provável
OXA	Agar Oxford
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
RDC-12	Resolução nº 12
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
s	Segundos
SC	Caldo Selenito Cistina
SNF	Sólidos Não Gordurosos
ST	Sólidos Totais
TCA	Ácido Tricloroacético
TT	Caldo Tetracionado
TSA-YE	Agar Soja Tripticase enriquecido com 0,6% de Extrato de Levedura
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USP	Universidade de São Paulo

XLD Agar Xilose Lisina Desoxiciolato

ZAZ Departamento de Zootecnia

Sumário

1. Introdução	19
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1. Leite: definição e composição química	20
2.2. Qualidade do leite e aspectos legais	21
2.3. Contagem Bacteriana Total (CBT).....	24
2.3.1. Fontes de Contaminação Bacteriana	26
2.3.2. Principais micro-organismos que constituem a CBT e prejuízos no leite e derivados	28
2.3.2.1. Bactérias Termodúricas	28
2.3.2.2. Bactérias Mesófilas.....	29
2.3.2.3. Bactérias Psicrotróficas	30
2.3.2.3.1. Prejuízos em queijos causados pela ação psicrotrófica	32
2.4. Queijo Minas Frescal: breve histórico e aspectos legais	33
3. Objetivos.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.1.1. Objetivos específicos	36
4. Material e Métodos	37
4.1. Obtenção, periodicidade e caracterização da matéria-prima.....	37
4.2. Análises no leite cru refrigerado	37
4.2.1. Análises físico-químicas	37
4.2.1.1. Determinação de células somáticas	38
4.2.2. Análises microbiológicas	38
4.2.2.1. Contagem padrão de micro-organismos mesófilos.....	38
4.2.2.2. Contagem padrão de micro-organismos psicrotróficos	38
4.3. Tratamento dos grupos	39
4.4. Fabricação do queijo Minas Frescal	39
4.4.1. Tratamento térmico do leite	39
4.4.2. Coagulação, tratamento da massa, enformagem e embalagem.....	40
4.4.3. Análises laboratoriais nos queijos Minas Frescal	43
4.4.3.1. Avaliação microbiológica.....	43
4.4.3.1.1. Quantificação de coliformes termotolerantes (45°C)	43

4.4.3.1.2.	Quantificação de estafilococos coagulase positiva.....	44
4.4.3.1.3.	Identificação de <i>Salmonella</i> spp.	44
4.4.3.1.4.	Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.4.3.2.	Avaliação físico-química.....	45
4.4.3.2.1.	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	45
4.4.3.2.2.	Determinação de umidade	46
4.4.3.2.3.	Determinação de gordura.....	47
4.4.3.2.4.	Extensão da lipólise	47
4.4.3.2.5.	Determinação de proteína	48
4.4.3.2.6.	Avaliação da proteólise.....	48
4.4.4.	Avaliação do rendimento industrial	49
4.5.	Delineamento experimental e análise estatística	50
5.	Resultados.....	51
5.1.	Leite cru refrigerado.....	51
5.2.	Leite pasteurizado.....	52
5.3.	Queijos Minas Frescal	53
5.3.1.	Avaliação físico-química	53
5.3.2.	Avaliação microbiológica	59
5.3.3.	Rendimento industrial	60
6.	Discussão	61
7.	Conclusões.....	72
8.	Referências	73

1. Introdução

A qualidade do leite utilizado como matéria-prima para a produção de derivados lácteos é um ponto fundamental para garantir o sucesso desse setor. Assim, um dos meios encontrados pelas indústrias lácteas, visando incentivar os produtores a investirem na qualidade do leite cru foi realizar o pagamento com base em parâmetros como: Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e teor de macro-nutrientes (teores de gordura, proteína e sólidos não gordurosos (SNF)) e não apenas pela quantidade (volume ou peso).

A CBT é um critério de inspeção que auxilia na avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite, é expressa em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro de leite.

O principal problema relacionado a altas contagens bacterianas é a acidificação do leite, causada pela produção de ácido lático, devido à ação das bactérias ácido-láticas que compõem a CBT, sobre a lactose. No entanto, há diversos problemas nos derivados lácteos que são relacionados à contaminação bacteriana inicial do leite, principalmente a enzimas produzidas por alguns grupos de bactérias, por exemplo: gelificação do leite UAT (Ultra Alta Temperatura), tonalidades e sabores atípicos em queijos e iogurtes, falhas na textura e estufamento em queijos, dentre outros, além dos riscos a saúde dos consumidores devido a linhagens bacterianas patogênicas e produtoras de toxinas.

Todavia, a cadeia láctea não possui dados sobre a real influência de diferentes contagens bacterianas sobre a qualidade dos derivados lácteos, pois estudos que relacionem os níveis de CBT do leite cru com os parâmetros de qualidade, fabricação e vida de prateleira dos derivados lácteos são incipientes.

Assim, uma investigação que relacione diferentes níveis de CBT do leite cru, com parâmetros de qualidade e vida útil dos seus derivados é de suma importância, pois geram ganhos para toda cadeia produtiva.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Leite: definição e composição química

Em 2015, foram produzidos 656 mil toneladas de leite no mundo, sendo os Estados Unidos o líder de produção com 93,5 mil toneladas. O Brasil apareceu na quarta posição com uma produção de 35,1 mil toneladas de leite (FAO, 2017). A região Sul liderou o ranking nacional de produção, em 2015, com 12,3 bilhões de litros, o que equivale a 35,2% do total, seguida pela região Sudeste com 11,9 bilhões de litros (34% do total), as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte produziram 4,8, 4,2 e 1,8 bilhões de litros de leite, respectivamente (IBGE, 2016). Em relação ao valor bruto da produção, o leite gerou em 2015, R\$ 27,8 bilhões, representando 5,58% do total do valor bruto da produção agropecuária, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016).

O leite é um alimento completo nutricionalmente, fruto da secreção de glândulas mamárias de mamíferas, reconhecido por fornecer micro e macro-nutrientes essenciais. O leite é amplamente consumido pelas pessoas em todas as fases da vida, visando o crescimento e desenvolvimento adequado (MULLER, 2002; PEREDA et al., 2005).

Na legislação brasileira entende-se por “leite, sem outra designação, todo produto oriundo de ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, sendo que o leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie a qual se origina”, tal definição foi instituída em 1952 pelo RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) e não sofreu alteração durante a atualização do mesmo (BRASIL, 2017).

De acordo, com Huth, Di Rienzo e Miller (2006), uma dieta balanceada constituída por no mínimo 3 porções diárias de produtos de origem láctea, fornece a quantidade necessária de nutrientes responsáveis por diversos benefícios à saúde, como: aumento da aquisição óssea durante o crescimento, desaceleração da perda óssea relacionada com a idade, e consequente prevenção da osteoporose, além disso, a ingestão de leite e seus derivados está ligada à redução da pressão arterial, do peso corporal e prevenção dos cânceres de colo e de mama.

Esses benefícios, estão diretamente relacionados com a composição centesimal do leite, tal alimento é constituído por aproximadamente 87,3% de água, sendo o remanescente sólidos totais (12,7%).

Esses sólidos compreendem: 4,9% de carboidratos, em suma lactose, 3,3% de proteínas, as quais subdividissem em dois gêneros: caseínas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β e κ) que formam

uma solução coloidal e proteínas do soro (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, soro-albumina, transferrina, ceruloplasmina, imunoglobulinas, enzimas como fosfatase, peroxidase e catalase, e por fim nitrogênio não-proteico (NNP), principalmente ureia), 0,9% de minerais (Ca, Mg, P, citrato, K, Cl, Na e SO_4) e vitaminas hidrossolúveis B1, B2 e C, esses nutrientes são classificados como extrato seco desengordurado totalizando 9,1%, os 3,6% restantes constituem uma emulsão de gorduras, na qual encontram-se dispersas vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (RIEL, 1991; TRONCO, 2010).

No entanto, fatores de ordem fisiológica, patológica, nutricional, dietético, relacionados aos animais e ao modo de manejo são fontes que podem acarretar em variações na composição centesimal do leite (MILANI, 2011).

2.2. Qualidade do leite e aspectos legais

O termo qualidade é originário do latim *qualitate*, o qual é definido como: “propriedade, atributo ou condição das coisas ou pessoas capaz de distingui-las das outras e de lhes determinar a natureza”, de acordo com Ferreira (1975). Nesse sentido, a qualidade do leite pode ser entendida como: um alimento que mantenha suas características naturais preservadas (sabor, odor, cor e teor de gordura, proteína, lactose, vitaminas e sais minerais) e que esteja livre de substâncias estranhas que possam causar efeitos colaterais aos humanos, dentre essas: patógenos, agrotóxicos, resíduos de antibióticos, toxinas e sujidades, além disso, o leite deve possuir boa qualidade microbiológica e sanitária: contaminação microbiana (CBT) e CCS baixas (SALOMÃO, 2012; SANTOS, 2004).

Entretanto, somente em 1998, com a criação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), pelo governo federal, a cadeia produtiva de leite brasileira passou a se preocupar com a qualidade desse produto, o objetivo principal desse programa foi gerar avanços na qualidade do leite, e como consequências garantir ao consumidor um produto seguro, aumentar a competitividade do mercado nacional, além de agregar valor aos produtos lácteos e evitar perdas ao produtor e para indústria (PINTO, 2013).

Incorporado ao PNMQL foi criado uma rede de laboratórios credenciados ao MAPA, intitulada rede brasileira de qualidade do leite (RBQL), responsável pelas análises de parâmetros de qualidade (características físico-químicos, composição centesimal, CCS e CBT) (MACHADO, 2008). Arelado ao PNMQL, foi instituída, em 2002, a Instrução Normativa nº51, que diz respeito aos padrões de identidade, qualidade e técnicas de produção, essa normativa estabeleceu várias mudanças na cadeia produtiva do leite, dentre essas destacam-se as relacionadas ao armazenamento pós-ordenha e ao transporte até o local de

processamento do mesmo, ambas devendo ser realizados a 4°C. O leite precisa atingir tal temperatura no máximo até três horas após a ordenha. Também, foram estabelecidos requisitos mínimos de qualidade ligados ao teor de macro-nutrientes e higiênico-sanitários, a adequação a estes quesitos poderia ser realizada pelos produtores até 2012.

Porém, em 2010, verificou-se que 23% e 36,2% das amostras analisadas pelo RBQL não atendiam aos limites de CCS e CBT, respectivamente, os quais eram de 750.000 para os dois parâmetros. Fato esse preocupante, tendo em vista que até 2012, os limites deveriam ser reduzidos para 100.000 UFC/mL e 400.000 céls/mL para CBT e CCS, respectivamente, em todo território nacional (ESTEVES; CARVALHO e COELHO, 2012). Assim, em dezembro de 2011, foi instituída a Instrução Normativa nº62 (IN-62) que estabeleceu limites gradativos de redução para a CCS e CBT (Quadro 1) (BRASIL, 2011), entretanto esses prazos foram novamente prorrogados pela Instrução Normativa nº7 (BRASIL, 2016).

Quadro 1- Condições microbiológicas e contagem de células somáticas (IN-62; IN-7).

Datas e regiões	Contagem padrão em placas (UFC/mL)	Contagem de células somáticas (CCS/mL)
01/07/2008 até 31/12/2011 regiões: S/SE/CO. 01/07/2010 até 31/12/2012 regiões: N/NE	$\leq 7,5 \times 10^5$	$\leq 7,5 \times 10^5$
01/01/2012 até 30/06/2014 regiões: S/SE/CO. 01/01/2013 até 30/06/2015 regiões: N/NE	$\leq 6,0 \times 10^5$	$\leq 6,0 \times 10^5$
01/07/2014 até 30/06/2018 regiões: S/SE/CO. 01/07/2015 até 30/06/2019 regiões: N/NE	$\leq 3,0 \times 10^5$	$\leq 5,0 \times 10^5$
01/07/2018 regiões: S/SE/CO. 01/07/2019 regiões: N/NE	$\leq 1,0 \times 10^5$	$\leq 4,0 \times 10^5$

Fonte: adaptado de BRASIL, 2011; BRASIL, 2016.

Além disso, segundo a IN-62, e em consonância com o novo RIISPOA (BRASIL, 2017), o leite cru refrigerado ao chegar ao laticínio deve apresentar as características físico-químicas e composicionais, descritas em seguida:

- “Densidade relativa à 15°C: (1,028 a 1,034) g/mL;
- Acidez em ácido láctico: (0,14 a 0,18)g em 100 mL;
- Índice Crioscópico: -0,530°H e -0,555°H;
- Extrato seco total: mínimo de 11,4g/100g;
- Extrato seco desengordurado: mínimo de 8,4g/100g;
- Gorduras: mínimo de 3,0g/100g;
- Proteínas: mínimo de 2,9g/100g;
- Lactose: mínimo de 4,3g/100g (BRASIL, 2011).”

Outras considerações relevantes da IN-62 são que a composição do leite (teores de gordura, proteína e sólidos totais), a CCS e a CBT, são parâmetros que obrigatoriamente e periodicamente devem ser analisados, por laboratórios oficiais da RBQL, se o produtor destinar seu produto para estabelecimentos sob inspeção federal e a extinção da designação dos leites tipo B e C, os quais passaram a ser denominados como cru refrigerado (BRASIL, 2011).

Os parâmetros mínimos de qualidade estabelecidos pela IN-62 e IN-7 são de caráter obrigatório, assim como uma medida para incentivar a melhoria da qualidade do leite cru, as indústrias desse setor com o objetivo de aumentar seus lucros, em termos de rendimento, vida de prateleira e garantia ao consumidor de um produto seguro, passaram a conceder bônus, bem como a penalizar os produtores, tal fato é conhecido como pagamento por qualidade e é amplamente utilizado no mundo. Os principais indicadores de qualidade utilizados são baseados na composição centesimal, CBT, CCS, características físico-químicas, presença de antibióticos, variações zootécnicas e sazonalidade, porém dentre esses se destacam os atributos higiênico-sanitários e os teores de gordura e proteína (FONSECA; CARVALHO, 2004; MACHADO, 2008).

Todos os macro-nutrientes podem ser utilizados como forma de bonificação, no entanto, os mundialmente usados são os teores de gordura e proteína, ficando os demais nutrientes em segundo plano. O bônus baseado nos teores de gordura e proteínas são vantajosos para as indústrias que possuem alta dependência desses elementos para alçar seus rendimentos, como as queijarias e as produtoras de derivados da matéria gorda (creme de leite, nata e manteiga). Esses elementos influenciam também as características organolépticas dos derivados lácteos e dos sorvetes (FONSECA; CARVALHO, 2004). Como exemplo, a empresa Itambé desenvolveu uma tabela de bonificação e penalização, utilizada por muitos laticínios no Brasil, na qual quando o leite cru apresenta os limites mínimos determinados pela legislação, o produtor não recebe incentivos ou descontos, porém quando os teores de gordura e proteína são superiores, estes são bonificados com até R\$0,05/litro se as porcentagens de gordura e proteína forem $\geq 4,20$ e $\geq 3,8$, respectivamente, como também são penalizados em R\$0,02/litro se os limites forem $\leq 2,99$ para gordura e $\leq 2,89$ para proteína (ITAMBÉ, 2016).

A CCS é um atributo sanitário informativo da saúde da glândula mamária das vacas. Altos níveis de células somáticas (células de defesa) no leite são consequência da presença de vacas com mastite no rebanho. Elucidando tal fato, se 50% do rebanho apresentar mastite a CCS no tanque será aproximadamente 500.000 céls/mL (CASSOLI; SILVA;

MACHADO, 2016). A CCS é um parâmetro extremamente explorado em pesquisas científicas, as quais já comprovaram os prejuízos que elevados índices desta causam para a indústria, em termos de rendimento, vida de prateleira, deficiências texturais e organolépticas, entre outros (FONSECA. CARVALHO, 2004). No programa de pagamento de qualidade da empresa Itambé, leites com CCS entre 400.000 e 599.999 céls/mL não recebem bonificação, nem penalização, incentivos são dados aos leites que apresentem CCS inferior a 400.000 céls/mL, sendo o maior bônus de R\$0,06/litro para leites com valor ≤ 250.00 céls/mL (ITAMBÉ, 2016).

A qualidade microbiológica do leite cru é mensurada diretamente pela CBT, em grande parte das indústrias desse setor no Brasil e no mundo. Na empresa Itambé há penalizações e bonificações aos produtores de até R\$0,04/litros se os limites forem ≥ 500.000 UFC/mL e ≤ 20.000 UFC/mL, respectivamente (FONSECA; CARVALHO, 2004; ITAMBÉ, 2016). Tal parâmetro é importante tanto do ponto de vista industrial, como de saúde pública. Em termos industriais, leites ácidos (resultado da fermentação da lactose por bactérias ácido-láticas) e enzimas exógenas termorresistentes (produzidas por micro-organismos psicrotróficos) prejudicam a produção e a vida de prateleira de diversos derivados lácteos. Em relação à saúde pública, quanto menor a contaminação microbiana menor o risco de o leite conter toxinas bacterianas e esporos de bactérias termodúricas patogênicas (FONSECA; CARVALHO, 2004).

2.3. Contagem Bacteriana Total (CBT)

O leite não é apenas um alimento rico nutricionalmente para os mamíferos, mas também é um meio de cultura perfeito para micro-organismos. Micro-organismos como bolores, leveduras e vírus têm pouquíssima participação na microbiota do leite cru, sendo assim a origem da contaminação deste alimento majoritariamente bacteriana (SANTOS; FONSECA, 2007).

O método analítico oficial para avaliar o grau de contaminação microbiológica no leite cru é a CBT ou contagem padrão em placas (CPP). Tal método é realizado por meio de diluições decimais seriadas, de amostras de leite cru, incubadas a 35°C em ágar padrão por 48 horas. Após esse período, é realizada a contagem do número de colônias, sendo o resultado final expresso em UFC/mL (BRASIL, 2003). Outros métodos para determinação da CBT foram legitimados pelo NCIMS (National Conference on Interstate Milk Shipments), os quais incluem contagem aeróbica em Petrifilm, plaqueamento em espiral, filtração em membrana

com grade hidrofóbica e os equipamentos que utilizam como princípio a citometria de fluxo (MURPHY et al., 2016).

Em 2012, 2.706.626 amostras de leite de todo o Brasil, foram analisadas pelos laboratórios credenciados no RBQL, os resultados mostraram que: 34%, 6%, 12%, 19% e 29% das amostras apresentavam CBT entre 750.000-9.999.000, 600.000-750.000, 300.000-600.000, 100.000-300.000 e abaixo de 100.000, respectivamente, indicando assim que 40% das amostras apresentavam-se fora dos padrões legais, para aquele ano (≤ 600.000 UFC/mL) (PINTO, 2013). Em 2016, a Clínica do Leite (Piracicaba/SP) publicou um levantamento das amostras analisadas no ano de 2015, das 44.030 amostras de leite cru dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás, 65% apresentavam CBT ≤ 300.000 UFC/mL, ou seja, estavam dentro dos limites legais, no entanto para o limite de 100.000 UFC/mL, que entrará em vigor no ano de 2018, de, apenas 41% das amostras apresentariam esse padrão (MACHADO; CASSOLI, 2016).

A CBT está relacionada tanto com a carga bacteriana inicial do leite, quanto com a taxa de multiplicação dos micro-organismos durante o armazenamento, deste modo, a CBT do momento da industrialização influencia na qualidade do produto final. De acordo com Murphy et al. (2016), o tipo, quantidade, estágio de crescimento e atividade enzimática das bactérias presentes determinam a dimensão dos problemas nos derivados lácteos.

Elevados índices de CBT no leite causam alterações nos níveis de lactose, proteínas, gorduras, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNF) e minerais. Vargas et al. (2013) verificaram que conforme ocorria elevação dos índices de CBT, os teores de gordura, proteína, minerais e sólidos totais, possuíam o mesmo comportamento, enquanto que para os teores de lactose e sólidos não gordurosos o comportamento era inverso, ou seja, ocorria redução significativa nos teores desses nutrientes. Segundo Machado et al. (2000), a elevação dos teores de proteína, gordura, sólidos totais e minerais não é benéfica, pois se deve ao decréscimo na produção de leite e consequentemente concentração desses nutrientes, ocasionada provavelmente por um processo inflamatório da glândula mamária.

Em outro estudo, realizado por Bueno et al. (2008), os resultados demonstraram que os teores médios de gordura e sólidos totais não sofreram alterações significativas, entretanto ocorreu redução no teor médio de lactose e aumento do teor médio de proteína conforme houve elevação da CBT.

Ravanis e Lewis (1995) afirmam que mesmo em produtos finais produzidos a partir de leites contendo uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, dependendo da

microbiota contaminante, podem ocorrer alterações nos nutrientes da matéria-prima, levando a problemas nesses produtos.

Contudo, baixas contagens bacterianas no leite cru são possíveis com a adoção de boas práticas de higiene e programas de incentivos das empresas direcionados aos produtores, como ocorrido em Nova York, em 2014, em que 46% das amostras apresentaram CBT inferior a 10.000 UFC/mL, após a implementação de programas de incentivo (MURPHY et al., 2016). Também, em um estudo realizado por Stulova et al. (2010) na Estônia, de 131 amostras analisadas, 91% (119) apresentaram CBT ≤ 50.000 UFC/mL. Esses dados evidenciam que baixas CBTs são factíveis.

2.3.1. Fontes de Contaminação Bacteriana

Existem três principais fontes de contaminação microbiológica primária, que contribuem para o aumento da CBT no leite. Tais fontes de contaminação estão descritas a seguir:

- *Saúde do Rebanho*: a microbiota natural do interior do teto de vacas sadias é praticamente desprezível para CBT do leite, além disso, estes micro-organismos tem capacidade reduzida de se multiplicar em baixas temperaturas durante o armazenamento do leite (KURWEIL, 1973). Porém, a elevação da CBT pode ser ocasionada por uma inflamação da glândula mamária designada mastite, há uma grande diversidade de micro-organismos envolvidos nessa doença como: *Streptococcus* sp., em suma as espécies *S.agalactiae* e *S.uberis* (GONZÁLES et al., 1986; JEFREY; WILSON, 1987), *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* (RIBEIRO JR.; BELOTI, 2012), *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (WALCHER, 2011). O grau de elevação da CBT, relacionado à mastite, é dependente da quantidade de animais infectados no rebanho, da gravidade da doença, do nível de infecção e do micro-organismo causador da mesma (COUSIN; BRAMLEY, 1981).
- *Exterior do úbere e manejo da ordenha*: o local onde as vacas repousam, pode estar altamente contaminado com bactérias gram-negativas, estreptococos, estafilococos, coliformes, bactérias psicrófilas, termofílicas, além de micro-organismos formadores de esporos (BRAMLEY; MCKINNON, 1990). Tais micro-organismos podem contaminar a pele dos tetos das vacas, bem como do úbere, podendo assim elevar a contagem bacteriana total até 10^{10} UFC/mL (BRAMLEY et al., 1982; HOGAN et al., 1989). Na pele dos tetos e do exterior do úbere também existe uma microbiota

natural, porém essa não causa o aumento da CBT, devido à baixa capacidade de reprodução sob-refrigeração. Como no caso anterior a elevação da CBT é dependente do grau de contaminação, ou seja, da higiene dos tetos das vacas pré-ordenha. Boas práticas de higiene do ordenhador, também são cruciais para evitar a contaminação do produto.

- *Higiene dos utensílios*: todos os equipamentos envolvidos no processo de ordenha, bem como os tanques ou latões onde o leite recém-ordenhado será depositado precisam estar desinfetados para não contaminarem o alimento ali armazenado. A água da higienização, é um fator primordial, assim deve ser de excelente qualidade (BEHMER, 1999). Segundo Tronco (2010), água não potável pode conter bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, e *Alcaligenes*, que provocam elevação da CBT e problemas para a indústria láctea. A dureza da água, também pode contribuir para a contaminação bacteriana, pois essa em nível elevado junto aos nutrientes do leite e a superfície dos equipamentos, proporciona a formação de biofilmes bacterianos (ROBBS; CAMPELO, 2002).

Os fatores mencionados anteriormente influenciam na carga bacteriana inicial do leite cru, a qual é definida pela quantidade de bactérias presentes logo após a ordenha no tanque de refrigeração (BEHMER, 1999). Em estudo conduzido por Bozo et al. (2013), os autores verificaram que a adoção de boas práticas de ordenha e manejo, como também a manutenção dos equipamentos e procedimentos de limpeza adequados, ocasionaram uma diminuição na CBT de $1,36 \times 10^6$ UFC/mL para $4,7 \times 10^4$ UFC/ mL.

Entretanto, o tempo e a temperatura que o leite cru ficará armazenado até o beneficiamento são pontos cruciais para a CBT, pois essas duas variáveis estão ligadas à multiplicação bacteriana (FONSECA, 1998). Há relatos na literatura que apontam que contagens bacterianas iniciais (pós a ordenha) de 4.300 UFC/mL mantidas por 48 horas a 4,4°C, 10°C e 15,5°C atingem populações de 4.560 UFC/mL, 127.720 UFC/mL e 330.110.000 UFC/mL, respectivamente (SPREER, 1991). Segundo a IN-62, o leite cru não deve exceder 48 horas e 4°C entre as ordenhas e a industrialização, porém sob essas condições micro-organismos psicrotróficos, especialmente bastonetes gram-negativos, ainda podem multiplicar-se, sobretudo quando há elevada contagem bacteriana inicial na matéria prima (ORDÓÑEZ, 2005).

2.3.2. Principais micro-organismos que constituem a CBT e prejuízos no leite e derivados

Há inúmeros grupos de bactérias que podem multiplicar-se no leite, e assim contribuir para o aumento da CBT, dentre essas se destacam: as termodúricas, as mesófilas, as psicrotróficas e as patogênicas que se encontram dentro desses grupos (HAYES et al., 2001; SANTOS; FONSECA, 2007). A seguir, será realizada uma abordagem geral sobre esses grupos e os principais problemas causados no leite e em derivados.

2.3.2.1. Bactérias Termodúricas

A pasteurização é um tratamento térmico largamente utilizado na indústria láctea, visando à destruição de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, consiste no aquecimento do leite a 72°C por 15 segundos ou 63°C por 30 minutos (FORSYTHE; HAYES, 2002). No entanto, as bactérias termodúricas caracterizam-se pela sobrevivência a esse tratamento ou como endósporos bacterianos (MURPHY et al., 2016). Sua presença no leite cru origina-se da limpeza ineficiente dos tetos das vacas, bem como da má higienização dos equipamentos e tubulações envolvidos na cadeia láctea (FORSYTHE; HAYES, 2002).

Espécies como *Microbacterium lactium*, *Micrococcus luteus* e *Streptococcus thermophilus* são exemplos de bactérias resistentes à pasteurização, sendo que *S. thermophilus* pode provocar a acidificação do leite pasteurizado (FORSYTHE; HAYES, 2002). Entretanto, os principais problemas relacionados a esse grupo são às linhagens esporogênicas, como os *Bacillus* e *Clostridium*, esses micro-organismos formam esporos que podem resistir por anos no ambiente, em condições hostis (extremo calor ou frio), são imóveis e não possuem metabolismo. Entretanto, tanto os micro-organismos termorresistentes, bem como os esporos, geram problemas no tempo de prateleira de leites pasteurizados, em pó, UAT e derivados lácteos, como também há espécies produtoras de toxinas, como o *Bacillus cereus* e o *Clostridium perfringens*, colocando em risco a saúde dos consumidores (ICMSF, 1994; BRITO et al., 2005). A ocorrência de *Bacillus cereus* em leite UAT comercializados no interior de São Paulo foi relatada por Vidal-Martins, Rossi Jr. e Rezende-Lago (2005) e Rezende et al. (2000), onde 11,8% e 34,1% das amostras continham essa bactéria, respectivamente. De acordo com Reyes et al. (2007), a presença de *Bacillus cereus* variou de 34,5% a 62,5% em amostras de leite desidratado fornecidos a um programa de merenda escolar chileno.

Em queijos semi-duros e duros, problemas ligados aos micro-organismos esporogênicos incluem defeitos na coloração e textura, como formação de regiões amolecidas e esbranquiçadas causadas por *Clostridium sporogenes*. O *Bacillus proteoliticus* é responsável pela coloração azulada ao fim da maturação (3-5 meses) e o *Bacillus polymixa* origina gases e sabor pútrido (FURTADO, 1991). Além disso, o gênero *Clostridium* sp. realiza a fermentação butírica, onde o lactato é transformado em butirato com a produção de CO₂ e H₂, originando o estufamento em queijos e sabores indesejáveis, linhagens de *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. tyrobutyricum* provocam o estufamento tardio em queijos, provocando olhaduras indesejáveis e em episódios graves rachaduras nas cascas (PERRY, 2004). Segundo Vissers et al. (2006) o estufamento em queijos pode ser provocado por apenas um esporo de bactéria produtora de butirato por mililitro de leite cru.

2.3.2.2. Bactérias Mesófilas

Bactérias que possuem temperatura ótima de crescimento entre (30-40)°C, mas que se multiplicam na faixa de (20-45)°C são chamadas de mesófilas (JAY, 2005). Os principais gêneros dessa categoria de bactérias são as gram-positivas: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus* e as gram-negativas: *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (TRONCO, 2003; ALVES; FONSECA, 2006).

O principal problema relacionado às bactérias mesófilas é a fermentação láctica, esta ocorre devido à utilização da lactose como principal alimento por bactérias lácticas dos gêneros, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, produzindo ácido láctico, o qual induz a acidificação do leite, que dependendo da intensidade pode desestabilizar a estrutura da caseína e causar coagulação. Leites com essas características (ácidos e coagulados) são recusados pelas indústrias, pois sugerem grande contaminação bacteriana originária dos fatores descritos no item 2.3.1. (EVANGELISTA, 1987; BEHMER, 1999).

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, são responsáveis pela fermentação da glicose, e em consequência provocam a queda do pH, como também são indicativos de mastite subclínica. No entanto o maior problema desse gênero é a espécie patogênica produtora de enterotoxinas: *Staphylococcus aureus* (TRONCO, 2003; TEBALDI et al., 2008). A coloração rósea originária do *Micrococcus roseus* em leites é o único problema relacionado ao gênero *Micrococcus*, porém por se multiplicarem em temperatura ambiente esses micro-organismos contribuem para a CBT (ALAIS, 1971). Da família

Streptococcaceae, os problemas relacionados são alterações na viscosidade vinculada ao *Leuconostoc mesenteroides* e as espécies ligadas à mastite: *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* (JAY, 2005).

As bactérias mesófilas gram-negativas somente serão encontradas em leites termicamente tratados, se as contagens iniciais foram extremamente altas (MURPHY et al., 2016). Tais bactérias pertencem à família das enterobactérias, e estão relacionadas a diversos defeitos: fermentam os açúcares do leite produzindo ácido lático e ácido acético, acidificando o leite, também produzem gases (CO_2 e H_2) causando estufamento precoce em queijos, geram sabor desagradável no leite. O gênero *Enterobacter* spp. e a espécie *Klebsiella oxytoca* são relacionados à produção de substâncias viscosas, a *Serratia marcescens* origina uma coloração avermelhada no leite e nos derivados, há linhagens responsáveis por doenças infecciosas como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (ALAIS, 1971; LAVEN; ASHORE; STEWART, 2003; TRONCO, 2003). Os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, são comumente conhecidos como coliformes e são relacionados à decomposição da matéria orgânica, indicando assim o grau de higiene do leite, enquanto as espécies *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, são denominadas coliformes termotolerantes ou fecais, e são associadas às fezes de animais de sangue quente, e consequentemente determinam o grau de sanidade do leite e sugerem riscos à saúde (PORTO, 2004).

2.3.2.3. Bactérias Psicrotróficas

Segundo os preceitos do International Dairy Federation, os micro-organismos caracterizados por não sofrerem influência de sua temperatura ótima de crescimento e se desenvolverem a 7°C ou menos, são classificados como psicrotróficos (COLLINS, 1981). As bactérias gram-positivas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria* e *Microbacterium* e as gram-negativas: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* são os principais gêneros de bactérias psicrotróficas recorrentes no leite cru refrigerado. Esse tipo de micro-organismos pode compor em até 75% a microbiota do leite cru, se este for obtido em condições higiênico-sanitárias impróprias e armazenado sob-refrigeração (<7°C) por um extenso período de tempo (FONSECA; PEREIRA; CARVALHO, 1999; NIELSEN, 2002). Há também, espécies patogênicas psicrotróficas, como *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolítica*, responsáveis por intoxicações ligadas ao consumo de leite e derivados (BRITO et al., 2005).

O gênero *Pseudomonas* possui grande importância, pois sob baixas temperaturas prevalece, dentre os outros (ROQUE; SCHUMACHER; PAIVA, 2003). Além disso, é responsável por diversas alterações de cor, como: tonalidades azuis e amarelas causadas por *Pseudomonas syncianae* e *Pseudomonas synxantha*, respectivamente em leites e derivados, na manteiga *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas nigrificiens* produzem colorações rosada e preta, respectivamente. Sabores de batata e frutas são relacionados ao crescimento de *Pseudomonas mucidolens* e *Pseudomonas fragi*, respectivamente e o odor de pútrido as *Pseudomonas* sp. (TRONCO, 2003).

O principal problema relacionado aos micro-organismos psicrotóxicos é a produção de proteases e lipases, as quais são enzimas extracelulares resistentes aos tratamentos térmicos (pasteurização e UAT) originando problemas nos leites processados e derivados lácteos (FONSECA; PEREIRA; CARVALHO, 1999). Entre 30-45°C, essas enzimas possuem atividade ótima e abaixo de 7°C a atividade é reduzida em até 30% (MURPHY et al., 2016).

As proteínas do soro do leite não sofrem o ataque das proteases de origem bacteriana, sendo a ação dessas enzimas predominantemente sobre as micelas de caseína, principalmente sobre a κ -caseína, e em menores proporções sobre a β -caseína e α -caseínas, respectivamente, liberando assim polipeptídeos e aminoácidos. Como resultado dessa degradação ocorre o desenvolvimento de sabor amargo, adstringente e pútrido no leite, aumento da viscosidade, gelificação e sedimentação no leite UAT e defeitos na produção de queijos, afetando assim a vida de prateleira desses produtos (LAW; ANDREWS; SHARPE, 1977; TRONCO, 2003; MELO Jr., 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2009; MOLINERI et al., 2012).

Os principais gêneros produtores de proteases, segundo Law (1979), são: *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Proteus* sp., *Cytophaga* sp., *Enterobacter liquefaciens*, *Xanthomonas*, *Acinobacter* sp., *Escheria freendi*, *Bacillus* e as *Pseudomonas*, principalmente: *Ps. putrefaciens*, *Ps. fragi*, *Ps. flourescens* e *Ps. putida*. Segundo Mottar¹ (1989, p. 281-292 apud MURPHY et al., 2016, p. 10137)¹ citado por Murphy et al. (2016) cerca de (70-90)% das amostras de leite cru apresentavam bactérias psicrotóxicas produtoras de proteases. Em relação a inativação dessas proteases, de acordo com Adaws, Barach e Speck (1975) após 4-5 horas a 72°C foram inativadas 90% de proteases extracelulares originárias de *Pseudomonas*, no entanto, esse binômio tempo x temperatura

¹ Mottar, J. F. 1989. Effect on the quality of dairy products. Pages 281–292 in *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*. R. C. McLellar, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

causa perda de nutrientes e descaracterização organoléptica no leite e consequentemente nos derivados lácteos.

Os principais micro-organismos produtores de lipases são: *Flavobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ps. fluorescens* e *Ps. fragi* (BRAMLEY; McKINNON, 1990). De acordo com Chen, Daniel e Coolbear (2003), as ligações α dos triglicerídeos são susceptíveis ao ataque de lipases extracelulares microbianas, dando origem a ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico, cáprico) dentre outros e consequentemente sabor e odor de ranço (ARCURI, 2003). Além dos ácidos graxos de cadeia curta, durante a ação enzimática, também ocorre à liberação de ácidos graxos insaturados, que podem sofrer oxidação e se tornarem aldeídos e cetonas e como resultado geram um sabor de oxidado ou metálico aos produtos lácteos, já o sabor e odor de sabão é originado de ácidos graxos de maior peso molecular (ARCURI, 2003). As lipases microbianas também causam problemas na produção e maturação de queijos, em cremes de leite e manteigas.

A ação lipolítica e proteolítica foi encontrada em todos os grupos de bactérias isoladas em leite cru refrigerado, no estudo de Tebaldi et al. (2008). Segundo os autores, o grupo de bactérias gram-negativas oxidase positiva apresentou 100% de atividade enzimática proteolítica e lipolítica, tal grupo era predominantemente composto por micro-organismos psicrotróficos dos gêneros: *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Burkholderia*, outro fato observado foi que a atividade proteolítica nos demais grupos isolados (*Enterococcus* sp., *Staphylococcus* spp. e Enterobacteriaceae) apresentou maior intensidade quando comparada a atividade lipolítica.

2.3.2.3.1. Prejuízos em queijos causados pela ação psicrotrófica

A qualidade da matéria prima de queijos, como também de outros derivados lácteos é fundamental para a qualidade dos produtos originados. Leites com alto grau de contaminação bacteriana, causam inúmeros prejuízos para as queijarias, principalmente se essa contaminação for predominante psicrotrófica e produtora de lipases e proteases.

No processo de fabricação de queijos a etapa mais importante é a coagulação da caseína, porém quando há degradação das micelas dessa proteína, causadas por proteases bacterianas, ocorre à liberação de produtos solúveis, como polipeptídeos e aminoácidos, que são perdidos no soro ao invés de constituírem o coágulo, reduzindo assim o rendimento industrial de queijos (LUCEY; KELLY, 1994).

Ácidos graxos também são encontrados no soro devido à ação de enzimas lipolíticas sobre triglicerídeos, acarretando em perdas nos percentuais de gordura e consequentemente redução do rendimento em queijos (CROMIE, 1992).

Hicks et al. (1986), observaram que esses dois tipos de enzimas também causam a retenção da água na massa, colocando os queijos fora dos padrões legais. Segundo Munro, Grieve e Kitchen (1984), o rendimento industrial de queijos pode sofrer uma queda de até 5% devido as alteração nos níveis de proteínas, gorduras e lactose.

Em estudo realizado por Almeida (1998), o autor notou que os problemas em queijos relacionados com sabor e aroma são em maioria ligados a lipases, pois essas são adsorvidas pelos glóbulos de gordura ficando presas na massa, enquanto que as proteases por serem hidrossolúveis são arrastadas junto ao soro.

Além desses problemas, existem outros defeitos na fabricação de queijos que estão relacionados às atividades proteolíticas e lipolíticas de enzimas produzidas por micro-organismos em leites com elevada CBT, como alterações no tempo de coagulação, na rigidez do coágulo, na taxa de desenvolvimento da acidez, falhas na textura e consequentemente alterações de características organolépticas (MUNRO; GRIEVE; KITCHEN, 1984).

2.4. Queijo Minas Frescal: breve histórico e aspectos legais

Em 2015, onze bilhões de litros de leites foram processados em forma de queijos (ZOCCAL, 2016), 60% da produção nacional é alcançada pelos 4 líderes de fabricação, onde a muçarela é a campeã com 30%, seguida pelos queijos prato, requeijão e Minas Frescal, com 20%, 7,5% e 6%, respectivamente (MILKPOINT, 2014).

Segundo a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária:

“Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).”

Dentre os diversos tipos de queijos, o queijo Minas Frescal ocupa posição de destaque no Brasil. Legitimamente brasileiro, começou a ser produzido em Minas Gerais, no

século XVIII, e atualmente é produzido e apreciado em todo território nacional (CAMPOS, 2001), sendo assim estudos com esse tipo de queijo tornam-se importantes para toda cadeia produtiva do setor lácteo. De acordo, com a Portaria nº352 de 4 de setembro de 1997, o queijo Minas Frescal é definido como, “o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas” (BRASIL, 1997). Primeiramente, esse tipo de queijo foi classificado como sendo de alta umidade, entretanto, em 1 de março de 2004 por meio da Instrução Normativa nº4 (BRASIL, 2004), foi reclassificado como queijo semigordo de muita alta umidade, ou seja, deve possuir de 25 a 44,99% de gordura no extrato seco (GES) e umidade acima ou igual a 55% (BRASIL, 1996).

Visualmente o queijo Minas Frescal deve ser cilíndrico e possuir entre 0,3 e 5 kg, de tonalidade branca, ser livre de crostas ou ter somente uma camada fina desta, conter ou não olhaduras e ser macio. O sabor e odor são caracterizados por serem suaves, e/ou levemente ácido e característico, respectivamente (BRASIL, 1997).

Os parâmetros microbiológicos mercadológicos para o queijo Minas Frescal estão dispostos na Resolução nº 12 (RDC-12), de 2 de janeiro de 2001, estes podem ser observados na Tabela 1. (BRASIL, 2001).

Tabela 1- Critérios de aceitação para Queijo Tipo Minas Frescal.

Micro-organismos	Categoria	Critérios de aceitação
Coliformes 45°C (NMP/mL)	5	n=5 c=2 m=50 M=500
Estafilococos coagulase positiva/g	5	n=5 c=1 m=100 M=500
<i>Salmonella</i> spp./25g	10	n=5 c=0 m=0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	10	n=5 c=0 m=0

Fonte: adaptado de BRASIL, 2001. Legenda: “(n) unidades amostrais; (c) número máximo aceitável de unidades do lote em que as contagens microbianas são superiores ao limite mínimo (m) número máximo aceitável de unidades do lote em que as contagens microbianas são inferiores ao limite máximo tolerado (M) unidades defeituosas para o respectivo micro-organismo”. Fonte: FRANCO e LANDGRAF, 2009.

Imediatamente após sua fabricação, os queijos frescos devem ser consumidos, e devido a essa característica possuem uma vida de prateleira curta (BRASIL, 1996). A associação brasileira das indústrias de queijos (ABIQ) prevê que a vida útil de queijos Minas Frescal é pequena chegando há 20 dias (ABIQ, 2017). O fim da vida de prateleira desse tipo de queijo termina quando um dos parâmetros (umidade, gordura, microbiológicos ou sensoriais) desrespeita a legislação. Sangaletti et al. (2009) estudaram a vida de prateleira de

queijos Minas Frescal por 30 dias a 4°C, sendo as análises realizadas nos dias 1, 10, 20 e 30 após a produção, os resultados mostraram que um dos lotes avaliados tornou-se impróprio para o consumo no 30º dia pelo crescimento excessivo de *Escherichia coli*.

Portanto, realizar estudos sobre a influência da matéria prima na qualidade do queijo Minas Frescal, são de grande valia para o setor lácteo brasileiro.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da contagem bacteriana total do leite cru refrigerado, sobre a fabricação e qualidade do queijo Minas Frescal.

3.1.1. Objetivos específicos

Avaliar as diferenças entre os queijos Minas Frescal produzidos a partir de leites contendo dois níveis de CBT, por meio de:

- Análises das características físico-químicas, microbiológicas e o rendimento industrial dos queijos Minas Frescal;
- Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas durante a vida útil.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção, periodicidade e caracterização da matéria-prima

O leite cru refrigerado foi obtido do rebanho leiteiro da Prefeitura do *Campus* “Fernando Costa” da Universidade de São Paulo (USP) em Pirassununga. O leite foi mantido em um tanque de refrigeração a 4°C com agitador mecânico por 4 ordenhas (manhã e tarde), logo após foi transferido para o tanque de expansão do Setor de Laticínios do *Campus*, o qual possui Inspeção do Serviço Estadual de São Paulo (SISP), totalizando 48 horas entre as ordenhas e o beneficiamento. Posteriormente, o leite foi pasteurizado em trocador de calor a placas e 100 litros do total de 1000 litros foram encaminhados para o tanque de fabricação de queijo, por meio das tubulações do laticínio do *Campus*. As colheitas foram realizadas ao acaso, no período de agosto de 2016 a março de 2017.

4.2. Análises no leite cru refrigerado

As amostras de leite cru para as análises microbiológicas e físico-químicas foram coletadas em frascos de vidros previamente esterilizados, do tanque de recepção do laticínio do *Campus*, antes da pasteurização e encaminhadas imediatamente ao laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), sob-refrigeração.

4.2.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, a 22°C, através da absorção diferencial de ondas infravermelhas no analisador de leite ultrassônico (Lactoscan MCC), calibrado para a análise de leite de vaca. Foram determinados os teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado (SNF). O procedimento consistiu em acoplar ao aparelho analisador um becker contendo uma alíquota de 20 mL da amostra, previamente homogeneizada e realizar a leitura dos resultados.

A densidade do leite foi determinada utilizando termolacto-densímetro, conforme Brasil (2006).

O pH foi mensurado pelo método potenciométrico à 25°C, utilizando o pHmetro modelo MS Tecnopon Instrumentação (Mpa210) (BRASIL, 2006).

4.2.1.1. Determinação de células somáticas

A contagem de células somáticas no leite foi realizada em triplicata por meio do equipamento Ekomilk Scan®, a 21°C.

4.2.2. Análises microbiológicas

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 água peptonada tamponada a 0,1% esterilizada (diluição 10^{-1}), a partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente.

4.2.2.1. Contagem padrão de micro-organismos mesófilos

A contagem de micro-organismos mesófilos foi realizada através de semeadura em profundidade utilizando Agar Padrão para Contagem (PCA).

O método consistiu na transferência de um mL das diluições para placas de Petri estéreis, em duplicata, seguida da adição de 15 a 17 mL de ágar padrão fundido e resfriado a temperatura em torno de 45°C. Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas para contagem de micro-organismos 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, forneceu o número de unidades formadoras de colônias de microrganismos mesófilos por mililitro da amostra (UFC/mL) (BRASIL, 2003).

4.2.2.2. Contagem padrão de micro-organismos psicrotróficos

Alíquotas de 0,1 mL das diluições decimais seriadas foram pipetadas em placas de Petri, previamente preparadas, contendo de 15-20 mL do ágar PCA solidificado. O inóculo foi espalhado com a ajuda de uma alça de Drigalski, em seguida as placas foram incubar em posição invertida a 7°C por 10 dias, em B.O.D. As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo técnica padrão, em placas com 25 a 250 colônias e o resultado foi expresso em UFC/mL (APHA, 2001).

4.3. Tratamento dos grupos

Foram realizadas seis colheitas aleatórias de leite cru refrigerado (C1, C2, C3, C4, C5 e C6), as quais foram divididas em dois tratamentos, de acordo com o nível de bactérias mesófilas (CBT), determinado como descrito no item 4.2.2.1, em concordância com a IN-62 (BRASIL, 2001). Assim, cada grupo contou com três repetições, em períodos diferentes, garantindo o número de repetições suficientes para a análise estatística (Figura 1).

- *Tratamento 1*: leites com CBT <50.000 UFC/mL de leite, média de 18.400 UFC/mL;
- *Tratamento 2*: leites com CBT ≥50.000 e <100.000 UFC/mL de leite, média de 74.100 UFC/mL.

Figura 1- Resultados da contagem bacteriana total dos leites crus refrigerados utilizados para fabricação dos lotes de queijos Minas Frescal.

Fonte: Própria autoria.

4.4. Fabricação do queijo Minas Frescal

4.4.1. Tratamento térmico do leite

O leite cru refrigerado sofreu tratamento térmico à temperatura de 72°C por 15 segundos, seguido de resfriamento imediato, para cerca de 4°C, em um pasteurizador a placas.

Aproximadamente 100 litros de leite pasteurizado foram encaminhados para o tanque de fabricação de queijo, por meio das tubulações do laticínio do *Campus*, as quais foram previamente higienizadas e sanitizadas para evitar a recontaminação do leite

pasteurizado. Foi retirada uma amostra de leite pasteurizado, a qual foi acondicionada sob refrigeração e submetida às mesmas análises microbiológicas do leite cru refrigerado.

4.4.2. Coagulação, tratamento da massa, enformagem e embalagem

Para a fabricação do queijo Minas Frescal, os 100 litros de leite pasteurizado foram aquecido sob agitação até 40°C, atingida essa temperatura foram adicionados 2 kg de cloreto de sódio, 50 mL de cloreto de cálcio e 120 mL de coagulante líquido (enzima quimiosina) (Figura 2A). O leite foi deixado em repouso por 40 minutos, visando à coagulação (Figura 2B).

Obtido o coágulo, após tempo pré-estabelecido, foi realizado o corte da coalhada, com auxílio de liras horizontal e vertical. Assim, iniciou-se a agitação e o aquecimento da massa até 45°C. Após cinco minutos de repouso da massa, realizou-se a dessoragem.

A massa obtida foi transferida, higienicamente, para fôrmas plásticas (Figura 2C), permanecendo por 15 minutos até sofrer a viragem (Figura 2D).

Os queijos foram pesados nas formas para o cálculo do rendimento industrial (Figura 2E). Em seguida, os queijos foram armazenados em câmara fria à temperatura de 6°C. Após 24 horas, os queijos foram retirados das formas, embalados em sacos plásticos, pesados novamente e conservados na câmara fria a 6°C por 21 dias (Figura 2F).

O procedimento de elaboração (Figura 3) foi repetido três vezes para cada tratamento, totalizando 120 unidades de queijo Minas Frescal.

Figura 2- Etapas de Fabricação do Queijo Minas Frescal.

Legenda: (A) Ingredientes; (B) Coagulação; (C) Enformagem; (D) Viragem; (E) Pesagem e (F) Armazenamento em câmara-fria (6°C).

Fonte: Própria autoria.

Figura 3- Fluxograma de Produção do Queijo Minas Frescal.

Fonte: Própria autoria.

4.4.3. Análises laboratoriais nos queijos Minas Frescal

As avaliações, descritas a seguir, foram realizadas nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação dos queijos. Foram colhidas aleatoriamente cinco amostras/tratamento/colheita para execução das análises.

4.4.3.1. Avaliação microbiológica

A qualidade microbiológica foi avaliada através dos micro-organismos estabelecidos pela RDC 12 (BRASIL, 2001) para queijos de muita alta umidade, grupo no qual se encontra o queijo Minas Frescal.

Para cada tratamento foram utilizados cinco queijos abertos sob condições de assepsia. Utilizaram-se 25 gramas por unidade amostral que foram homogeneizadas juntamente com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% estéril (diluição 10^{-1}). A partir desta, foram realizadas diluições seriadas, tantas quanto necessárias para as análises de coliformes termotolerantes (45°C), estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, a partir de 1 mL diluindo-se em 9 mL de água peptonada tamponada 0,1%.

4.4.3.1.1. Quantificação de coliformes termotolerantes (45°C)

Para esse grupo de micro-organismos foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), tal técnica foi realizada por meio de um teste presuntivo e um confirmativo.

O teste presuntivo consistiu em pipetar alíquotas de 1 mL de cada diluição para uma série de três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato triptose (LST) e tubos de Durham invertidos (captação do gás), tais tubos foram homogeneizados e incubados a 35°C por 24 horas, transcorrido o tempo de incubação foi observado se houve crescimento com produção de gás (tubos positivos). Em caso negativo, os tubos foram reincubados até completarem 48 horas e a leitura foi repetida.

Os tubos de caldo LST positivos foram submetidos ao teste confirmativo, o qual consistiu na transferência de uma alçada para um tubo contendo 10 mL de caldo *E. coli* (EC) e tubos de Durham invertidos, seguida por incubação em banho-maria a 45,5°C por 24 horas, foram considerados positivos os tubos com crescimento e produção de gás (APHA, 1992).

4.4.3.1.2. Quantificação de estafilococos coagulase positiva

As amostras foram inoculadas por plaqueamento em superfície em placas contendo ágar Baird Parker (BP) enriquecido com solução salina gema de ovo 50% e telurito de potássio a 1%, previamente preparadas e secas. Foram selecionadas diluições até 10^{-3} e inoculadas (0,1 mL) em duplicata, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas. Dado o tempo de incubação, foram contadas as colônias típicas de estafilococos coagulase positiva (colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo até a zona opaca) e o resultado expresso como log UFC/mL (A.O.A.C., 1984).

Para a confirmação de 3 a 5 colônias típicas foram transferidas com a ajuda de uma alça de platina para o caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), e esses foram incubados a 35°C por 24 horas. As colônias enriquecidas em BHI foram submetidas às provas de confirmação de coagulase, catalase e coloração de gram, de acordo com Mac Faddin (1976). O teste de coagulase consistiu em inocular 0,1 mL do caldo BHI, incubado *over night*, com colônias suspeitas a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho liofilizado, que foi incubado por 4 horas a 35°C em banho-maria. A prova foi considerada positiva quando houve formação de coágulo. Já o teste de catalase consistiu em inocular uma alíquota da cultura pura sobre uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, quando ocorreu desprendimento de bolhas de gás, a cultura foi considerada como catalase positiva. Também foram preparados esfregaços, a partir das colônias isoladas dos meios de cultura, que foram submetidas a coloração pelo método de gram.

4.4.3.1.3. Identificação de *Salmonella* spp.

Para esse tipo de micro-organismo foi realizado um teste de presença ou ausência, o qual consistiu na incubação de 25 gramas de queijo em 225 mL de solução de água peptonada tamponada 0,1%, por 24 horas a 35°C. Transcorrido esse tempo, um mL dessa solução foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo tetratationado (TT) e um mL para o outro tubo contendo caldo selenito cistina (SC), ambos foram incubados a 42°C por 24 horas. Após as 24 horas, os tubos foram agitados em vortex e, com o auxílio de uma alça de platina, estriou-se uma alçada do caldo TT em 3 placas contendo ágar Entérico de *Hectoen*

(HE), ágar Bismuto Sulfito (BS) e ágar Xilose Lisina Desoxiciolato (XLD), respectivamente. Esse mesmo procedimento foi repetido com o caldo SC. As placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas e foi verificado se houve o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* spp. (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

4.4.3.1.4. Identificação de *Listeria monocytogenes*

Para verificar a presença de *Listeria monocytogenes* nas amostras foi utilizado o método adaptado do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (HITCHINS; JINNEMAN; CHEN, 2011). Vinte e cinco gramas de queijo foram homogeneizados em 225 mL de caldo de Enriquecimento de *Listeria* (LEB) e incubados por 48 horas a 30°C. Cada recipiente de LEB foi agitado cuidadosamente, em seguida realizou-se o estriamento com alça microbiológica em ágar Oxford (OXA), e estas placas foram incubadas a 35°C por 24-48 horas, também foi realizado o plaqueamento, a partir de uma alçada em placas de ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM), que foram incubados a 30°C por 24-48 horas.

Após a incubação, foi verificada a presença de colônias típicas de *Listeria* em cada meio. Assim, no mínimo 5 colônias típicas de *Listeria* spp. foram selecionadas e plaqueadas em ágar soja tripticase enriquecido com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), por 24-48 horas a 30°C, visando à purificação. Observou-se as colônias sob luz oblíqua e foi selecionada uma colônia azulada típica, bem isolada, para a realização das provas de confirmação. Com o auxílio de uma alça de inoculação, a colônia típica foi transferida para um tubo de TSA-YE inclinado e incubada a 30°C por 24 horas. A cultura foi submetida às provas de coloração de gram, teste de catalase (reação com H₂O₂ a 3% de concentração) e motilidade.

4.4.3.2. Avaliação físico-química

Após a retirada da massa dos cinco queijos Minas Frescal para a avaliação microbiológica, as amostras foram maceradas e homogeneizadas, respectivamente, para as avaliações físico-químicas.

4.4.3.2.1. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A realização da análise de pH seguiu a metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

O procedimento foi realizado em um potenciômetro digital modelo MS Tecnopon Instrumentação (Mpa210), a partir de 10 gramas de queijo a 25°C e aproximadamente 20 mL de água destilada, que foram homogeneizadas com o auxílio de um bastão de vidro, obtendo assim uma pasta uniforme para a realização da leitura.

4.4.3.2.1. Determinação da acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por meio do Método DORNIC (AOAC,1995), em que 10 gramas de cada amostra foram misturados com 105 mL de água destilada a 40°C, seguida de agitação com bastão de vidro até dissolução e, subsequente filtração. Das soluções filtradas coletaram-se 50 mL que foram titulados com solução Dornic (NaOH 0,11N), utilizando fenolftaleína como indicador.

Para obtenção dos resultados que foram expressos em % ácido láctico, utilizou-se os seguintes cálculos:

$$\% \text{ em ácido láctico} = \frac{V * f * 0,9}{m}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1N;

0,9 = fator de conversão do ácido láctico;

m = massa da amostra, em gramas.

4.4.3.2.2. Determinação de umidade

A determinação de umidade foi adaptada do Método de Secagem em Estufa a 105°C (BRASIL, 2005).

Pesaram-se cinco gramas de cada amostra em cadinhos, que foram levados para a estufa por 72 horas. Após esse tempo as amostras foram esfriadas em dessecador e pesadas, até atingirem peso constante. Para obter o resultado, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\% \text{ Umidade a } 105^{\circ} = \frac{100 \times m}{m'}$$

Onde: m = perda de massa em gramas;

m' = massa da amostra em gramas.

4.4.3.2.3. Determinação de gordura

A análise de determinação do teor de gordura foi efetuada pelo Método Butirométrico para queijo, no butirômetro de queijo, adaptada da metodologia descrita na Instrução Normativa número 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

O procedimento consistiu em pesar exatamente 3,0 gramas das amostras homogeneizadas, diretamente nos copos dos butirômetros. Acoplou-se os copos na parte inferior dos butirômetros de forma a ficarem bem vedados. Em seguida adicionaram-se cerca de 5 mL de água, 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. Os butirômetros foram transferidos para banho-maria a 80°C para auxiliar na dissolução das amostras.

Quando as amostras apresentaram-se dissolvidas, foi adicionado água até a última marcação dos butirômetros, em seguida os butirômetros foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm. A leitura das porcentagens de gordura das amostras, em base úmida, foram efetuadas diretamente nas escalas dos butirômetros. Para obter os resultados, em base seca (GES), utilizou-se a fórmula a seguir:

$$GES (\%) = \frac{\% \text{ Gordura na base úmida}}{\% \text{ Umidade}} \times 100$$

4.4.3.2.4. Extensão da lipólise

A medição do grau de lipólise foi quantificada por meio do teor de ácidos graxos livres (AGL), segundo o método tritimétrico descrito por Caboni, Zannoni e Lercker (1990), no qual o índice de acidez foi expresso em mg de hidróxido de potássio (KOH) para neutralizar um grama de gordura.

O método foi realizado triturando-se em liquidificador 100 gramas de cada queijo juntamente com 200 mL de água destilada a 35°C por 2 minutos. Com a agitação as membranas dos glóbulos de gordura foram rompidos e por coalescência a gordura chega à superfície do frasco. Cinco gramas desta gordura foram pesados e diluídos em 50 mL de solução etanol/éter etílico (1v/1v), que imediatamente foram titulados com solução metanólica de KOH 0,1N. A fenolftaleína foi utilizada como indicador e a titulação cessou assim que ocorreu o aparecimento da coloração rosa claro.

4.4.3.2.5. Determinação de proteína

A porcentagem de proteína foi determinada através do teor de nitrogênio total multiplicado pelo fator 6,38, através do método Kjeldahl (Brasil, 2006) no laboratório de Proteínas, do departamento de zootecnia (ZAZ) da FZEA/USP.

Em tubos de micro-kjeldahl pesaram-se 0,1 gramas de cada amostra e adicionou-se catalisador (sulfato de potássio, sulfato de cobre penta hidratado e selênio), e ácido sulfúrico concentrado. Em seguida os tubos foram encaminhados para digestão, em bloco digestor, por aproximadamente cinco horas. Retirados os tubos do bloco, os mesmos foram encaminhados para a destilação. Adicionou-se a cada tubo água destilada, lavando a parede do tubo. Em seguida, realizou-se a destilação, neutralizando a amostra com NaOH 50%, e recolheu-se uma alíquota do destilado em erlenmeyer contendo ácido bórico 4% com indicador (vermelho de metila e verde de bromocresol). A titulação foi efetuada com ácido clorídrico 0,1N até mudança de cor e permanência da mesma.

Para obtenção dos resultados, os seguintes cálculos foram realizados:

$$\% \text{ Nitrogênio total (NT)} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{m}$$

$$\% \text{ proteínas} = \% \text{ NT} \times F$$

Onde:

V = volume da solução de ácido clorídrico 0,1N, gasto na titulação, em mL;

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N;

m = massa da amostra, em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína.

4.4.3.2.6. Avaliação da proteólise

A proteólise é indicada pelos índices de extensão e profundidade. As proteinases naturais do leite e do agente coagulante estão relacionadas com o índice de extensão, estas hidrolisam as proteínas em peptídeos de alto peso molecular. Já os peptídeos de baixo peso molecular que possuem sua degradação ligada à atividade das endoenzimas e exoenzimas, estão relacionados ao índice de profundidade.

Os índices foram obtidos através dos cálculos descritos a seguir (WOLFSCHOON, 1983):

$$\text{Índice de extensão} = \frac{\text{Nitrogênio não - caseíco (NNC)}}{NT} \times 100$$

$$\text{Índice de profundidade} = \frac{\text{Nitrogênio não - protéico (NNP)}}{NT} \times 100$$

Para a determinação do NT, foi utilizado o método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita no item 4.4.3.2.5 (Brasil, 2006).

A determinação do NNC foi efetuada por meio da metodologia adaptada de Bynum e Barbano (1985), na qual 3 gramas de queijo foram triturados com 200 mL de tampão acetato pH 4,6 durante 30 segundos, com o auxílio de um liquidificador, a suspensão foi filtrada com papel de filtro faixa azul (filtração lenta). Uma alíquota da solução filtrada foi transferida para um tubo de Kjeldahl e analisado conforme descrito no item 4.4.3.2.5.

A determinação do NNP, também foi adaptada do método de Bynum e Barbano (1985). Nesta, a extração foi realizada a partir de 2,33 gramas de queijo com 70 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, a solução foi triturada em liquidificador por 30 segundos, e esta mistura foi filtrada em papel filtro faixa azul. Uma alíquota do filtrado foi transferida para um tubo de Kjeldahl e analisada.

4.4.4. Avaliação do rendimento industrial

O rendimento bruto da obtenção dos queijos nos diferentes tratamentos foi determinado em 2 tempos, logo após a fabricação e 24 horas após a produção. O rendimento foi cálculo, de acordo com Yunes e Benedet (2000), por meio da fórmula:

$$R(\%) = \frac{Pq}{Pf} \times 100$$

Onde:

R = rendimento bruto (kg de queijo/kg de leite);

Pq = peso do queijos;

Pf = peso da formulação (leite acrescido dos ingredientes).

4.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental, para os leites crus refrigerados e leites pasteurizados utilizados para a fabricação dos lotes de queijos Minas Frescal, foi em blocos ao acaso, tendo como efeito do tratamento a contagem bacteriana total e, como blocos, os processamentos (com três repetições para cada tratamento). Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento *PROC MIXED* do programa SAS (SAS, 2004), e as diferenças entre as médias foram testadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Para os queijos Minas Frescal foi utilizado um delineamento experimental em parcelas subdivididas com blocos, considerando-se a contagem bacteriana total como efeito principal, os dias de análise como subparcelas e os processamentos como blocos com três lotes por tratamento para o queijo Minas Frescal. A análise estatística das características avaliadas, que envolveram medidas repetidas no tempo, foi realizada utilizando-se os procedimentos *PROC MIXED* do programa SAS (SAS, 2004) as diferenças foram testadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

5. Resultados

5.1. Leite cru refrigerado

A Tabela 2 contém os resultados com o nível de contaminação bacteriológica presente nas amostras de leite cru utilizadas nos processamentos. Os valores médios de mesófilos (CBT) diferiram estatisticamente ($P < 0,01$), confirmando a estratificação utilizada nessa pesquisa, enquanto a contagem de psicrotróficos não diferiu para os níveis de CBT dos leites crus refrigerados.

Tabela 2- Médias das contagens de mesófilos e psicrotróficos dos leites crus refrigerados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.

CBT no leite cru (10³ UFC/mL)	Mesófilos* (log. UFC/mL)	Psicrotróficos* (log. UFC/mL)
<50	4,24±0,07 ^b	4,71±0,6 ^a
≥50 e <100	4,87±0,07 ^a	5,16±0,6 ^a

*Resultados relativos à média ± erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em duplicata.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores mínimos, médios, máximos e o coeficiente de variação do teor de macro-nutrientes, pH e CCS dos leites crus refrigerados utilizados para a fabricação dos queijos Minas Frescal, bem como as médias por tratamento. Não foi verificado efeito ($P > 0,05$) dos níveis de CBT para essas variáveis. A densidade apresentou efeito ($P < 0,01$) para o fator CBT.

Tabela 3- Médias da composição físico-química dos leites crus refrigerados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.

	CBT no leite (10³ UFC/mL) *		Média**	Mínimo	Máximo	CV (%)
	<50	≥50 a <100				
Gordura (%)	2,97±0,1	2,81±0,1	2,89	2,68	3,11	5,64
SNF (%)	8,60±0,07	8,55±0,07	8,58	8,42	8,83	1,35
Lactose (%)	4,73±0,04	4,70±0,04	4,72	4,63	4,85	1,34
Proteína (%)	3,15±0,03	3,13±0,03	3,14	3,08	3,23	1,35
pH	6,72±0,04	6,69±0,04	6,71	6,60	6,76	0,86
Densidade (g/L)	1030,2±0,1 ^b	1030,7±0,1 ^a	1030,4	1030,0	1030,9	0,32
CCS (10³ céls/mL)	113,39±2	162,99±27	138,19	75,112	259,5	40,65

*Resultados relativos à média ± erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em triplicata.

**Média das seis amostras de leite cru refrigerado, analisadas em triplicata.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Fonte: Própria autoria.

5.2. Leite pasteurizado

Os valores médios de mesófilos não diferiram ($P>0,05$), para os níveis de CBT dos leites, porém para as contagens de psicrotróficos houve efeito ($P<0,05$) para os níveis de CBT, como pode ser observado na Tabela 4. A microbiota contaminante foi drasticamente destruída, após o tratamento térmico ($72^{\circ}\text{C}/15$ segundos) colocando os leites em condições satisfatórias para a fabricação dos queijos.

Tabela 4- Médias das contagens de mesófilos e psicrotróficos dos leites pasteurizados, utilizados na fabricação dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT.

CBT no leite cru (10^3 UFC/mL)	Mesófilos* (log. UFC/mL)	Psicrotróficos* (log. UFC/mL)
<50	2,56 $\pm$ 0,3 ^a	1,61 $\pm$ 0,2 ^b
≥ 50 e <100	2,91 $\pm$ 0,3 ^a	2.47 $\pm$ 0,2 ^a

*Resultados relativos à média $\pm$ erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em duplicata.

Na coluna, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Própria autoria.

5.3. Queijos Minas Frescal

5.3.1. Avaliação físico-química

As médias para os teores de umidade, proteína e gordura não apresentaram interação para os níveis de CBT e período de armazenamento ($P>0,05$). Entretanto, para os teores médios de umidade e proteína houve efeito ($P<0,01$), ($P<0,05$), respectivamente, nos níveis de CBT, como apresentado na Tabela 5. O teor de umidade foi superior para o tratamento com CBT <50.000 UFC/mL, enquanto a porcentagem de proteína foi inferior, já para o tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL ocorreu o oposto para esses componentes. Os teores de gordura não apresentaram efeito ($P>0,05$) nos níveis de CBT avaliados (Tabela 5).

Tabela 5- Porcentagens médias (g/100g) de umidade, proteína e gordura dos queijos Minas Frescal, de acordo com a CBT dos leites crus refrigerados.

	CBT no leite (10^3 UFC/mL)		Pr > F
	<50	≥ 50 e <100	
Umidade (%) *	63,46 $\pm$ 0,3 ^a	60,77 $\pm$ 0,3 ^b	0,0037
Proteína (%) *	16,14 $\pm$ 0,3 ^b	17,32 $\pm$ 0,3 ^a	0,0406
Gordura/GES (%) *	15,09/41,3 $\pm$ 0,1 ^a	15,2/38,75 $\pm$ 0,1 ^a	0,5851

*Resultados relativos à média global $\pm$ erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Em relação, ao período de armazenamento (Tabela 6) e independente dos níveis de CBT, houve efeito polinomial quadrático ($P<0,01$) para o teor médio de umidade (Figura 4) e para os teores de gordura e proteína houve efeito linear positivo ($P<0,01$), ($P<0,05$), respectivamente (Figura 5). Nota-se que com o passar do tempo houve perda de umidade e consequentemente aumento da concentração dos níveis de gordura e proteína.

Tabela 6- Porcentagens médias (g/100g) de umidade, proteína e gordura dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Pr > F
Umidade (%) *	65,29 $\pm$ 0,4 ^a	61,28 $\pm$ 0,4 ^b	60,96 $\pm$ 0,4 ^b	60,91 $\pm$ 0,5 ^b	<.0001
Proteína (%) *	15,78 $\pm$ 0,4 ^c	16,32 $\pm$ 0,4 ^{bc}	17,21 $\pm$ 0,4 ^{ab}	17,61 $\pm$ 0,4 ^a	0,0304
Gordura (%) *	14,36 $\pm$ 0,2 ^c	14,78 $\pm$ 0,2 ^{bc}	15,32 $\pm$ 0,2 ^b	16,12 $\pm$ 0,2 ^a	0,0002

*Resultados relativos à média $\pm$ erro padrão de seis repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Figura 4- Variação do teor de umidade dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Figura 5- Variação dos teores de proteína e gordura dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 7 estão apresentadas as médias referentes ao pH (Figura 6) e a acidez titulável (% de ácido láctico) (Figura 7), houve interação ($P<0,01$) para os níveis de CBT e período de armazenamento, para estas características que apresentaram diferenças significativas, a partir do 14º dia após a fabricação.

Em relação ao pH, somente o tratamento com CBT superior a 50.000 UFC/mL apresentou alteração significativa ($P<0,01$) durante o tempo de armazenamento, com decréscimo de pH de 6,72 para 6,15, enquanto que para o tratamento com CBT <50.000 UFC/mL a redução foi de 6,59 para 6,49. Já para a acidez titulável, os dois tratamentos apresentaram efeito significativo ($P<0,01$) a partir do 14º dia após a fabricação, entretanto em nível mais acentuado no tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL.

Tabela 7- Médias do pH e acidez titulável dos queijos Minas Frescal, de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.

pH				
CBT (10³ UFC/mL) *	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
<50	6,59±0,04 ^{a; A}	6,68±0,04 ^{a;A}	6,63±0,04 ^{a;A}	6,49±0,06 ^{a;A}
≥50 e <100	6,72±0,04 ^{a; A}	6,67±0,04 ^{a;A}	6,49±0,04 ^{b;B}	6,15±0,04 ^{c;B}
Acidez Titulável (% ácido láctico)				
CBT (10³ UFC/mL) *	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
<50	0,0296±0,004 ^{b; A}	0,0388±0,004 ^{ab;A}	0,0466±0,004 ^{a;B}	0,0469±0,005 ^{a;B}
≥50 e <100	0,0383±0,004 ^{c; A}	0,0361±0,004 ^{c;A}	0,0622±0,004 ^{b;A}	0,104±0,004 ^{a; A}

*Resultados relativos à média ± erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Na coluna, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 6- Médias do pH dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

Figura 7- Médias da acidez titulável (% de ácido láctico) dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

A extensão da lipólise apresentou interação ($P<0,05$) para os níveis de CBT e período de armazenamento, no 21º dia após a fabricação (Tabela 8). Ocorreu aumento significativo ($P<0,01$) durante o período de armazenamento (Figura 8).

Tabela 8- Médias da avaliação da extensão da lipólise dos queijos Minas Frescal, de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.

Extensão da Lipólise (mg de KOH/g de gordura)				
CBT (10^3 UFC/mL) *	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
<50	$0,84 \pm 0,04^{c;A}$	$0,891 \pm 0,04^{c;A}$	$1,255 \pm 0,04^{b;A}$	$1,677 \pm 0,06^{a;B}$
≥ 50 e <100	$0,742 \pm 0,04^{c;A}$	$0,911 \pm 0,04^{c;A}$	$1,287 \pm 0,04^{b;A}$	$2,362 \pm 0,04^{a;A}$

*Resultados relativos à média $\pm$ erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Na coluna, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 8- Médias da avaliação da extensão da lipólise (mg de KOH/ g de gordura) dos queijos Minas Frescal em função dos níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

As médias para os índices de extensão e profundidade da proteólise não apresentaram interação para os níveis de CBT dos leites crus refrigerados e período de armazenamento ($P>0,05$). Entretanto, para o índice de extensão e profundidade da proteólise houve efeito ($P<0,05$), para os níveis de CBT dos leites crus, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9- Porcentagens dos índices de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT dos leites cru refrigerados.

Proteólise	CBT no leite (10^3 UFC/mL)		Pr > F
	<50	≥50 e <100	
Índice de extensão (%) *	10,37±1,0 ^b	18,12±0,8 ^a	0,0103
Índice de profundidade (%) *	4,82±0,4 ^b	7,67±0,3 ^a	0,0149

*Resultados relativos à média global ± erro padrão de três repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Em relação, ao período de armazenamento (Tabela 10) houve efeito polinomial quadrático ($P < 0,01$) para o índice de extensão da proteólise, independente do nível de CBT (Figura 9), enquanto que para o índice de profundidade da proteólise não houve efeito ($P > 0,05$).

Tabela 10- Porcentagens médias do índice de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.

Proteólise	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Pr > F
Índice de extensão (%) *	11,94±1,0 ^b	12,31±1,0 ^b	13,14±1,0 ^b	19,59±1,0 ^a	0,009
Índice de profundidade (%) *	6,52±0,6 ^a	5,09±0,6 ^a	6,19±0,6 ^a	7,18±0,6 ^a	0,1376

*Resultados relativos à média ± erro padrão de seis repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

Figura 9- Comportamento dos índices de extensão e profundidade dos queijos Minas Frescal de acordo com o período de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

5.3.2. Avaliação microbiológica

Os resultados das análises para estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* dos queijos são mostrados na Tabela 11. Para os micro-organismos avaliados não houve interação para os níveis de CBT e período de armazenamento, porém houve efeito ($P < 0,05$) para a contagem de estafilococos coagulase positiva e período de armazenamento, a partir do 14º dia após a fabricação, inviabilizando o consumo dos queijos, pela elevada contaminação, conforme previsto na RDC-12 (BRASIL, 2001).

Tabela 11- Médias das contagens dos micro-organismos, conforme previsto na RDC-12, dos queijos Minas Frescal, de acordo com o período de armazenamento.

	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Estafilococos coagulase positiva (log. UFC/mL) *	0 ^b	0 ^b	0,8362±0,2 ^a	1,2134±0,2 ^a
<i>Salmonella</i> spp. /25g*	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i>/25g*	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

*Resultados relativos à média global ± erro padrão de seis repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais, em duplicata, nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Na linha, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Própria autoria.

Na Tabela 12 estão apresentados os dados referentes às análises de coliformes termotolerantes (45°C). Não houve interação ($P > 0,05$) para os níveis de CBT e período de armazenamento, 94,78% das amostras de queijos Minas Frescal não apresentaram coliformes termotolerantes, enquanto 5,22% apresentaram coliformes termotolerantes dentro dos limites legais.

Tabela 12- Porcentagens de queijos Minas Frescal positivos (NMP/g) para a contagem de coliformes termotolerantes (45°C), de acordo com os níveis de CBT dos leites crus refrigerados.

CBT	NMP/g			
(10 ³ UFC/mL)	0 (%)	3 (%)	7 (%)	11 (%)
<50*	45,22	0,87	0,87	0,87
≥50 e <100*	49,56	0,87	0,87	0,87
Total (%) **	94,78	1,74	1,74	1,74

* Resultados relativos a três repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais, nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

**Resultados relativos a seis repetições (processamentos), analisados em 5 unidades amostrais, nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação.

Fonte: Própria autoria.

5.3.3. Rendimento industrial

Os rendimentos médios, logo depois da fabricação (0 hora) e após 24 horas desta, não apresentaram efeito ($P>0,05$) para os níveis de CBT avaliados (Tabela 13).

Tabela 13- Porcentagens dos rendimentos médios da produção dos queijos Minas Frescal, de acordo com o nível de CBT dos leites crus refrigerados.

CBT no leite cru (10 ³ UFC/mL)	Rendimento (%)	
	0 hora*	24 horas*
<50	18,69±0,9 ^a	16,68±0,6 ^a
≥50 e <100	17,16±0,9 ^a	15,00±0,6 ^a

*Resultados relativos à média ± erro padrão de três repetições (processamentos), obtidos por meio dos pesos dos queijos Minas Frescal e da formulação, logo depois da fabricação e após 24 horas desta.

Nas colunas, médias seguidas de letras minúsculas diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fonte: Própria autoria.

6. Discussão

Os níveis de CBT estabelecidos nessa pesquisa (<50.000 UFC/mL e ≥ 50.000 a <100.000 UFC/mL) das amostras de leite cru refrigerado, apresentaram-se dentro dos padrões legais: ≤ 300.000 UFC/mL para a região sudeste, como também do limite que entrará em vigor a partir de 1 de julho de 2018, de 100.000 UFC/mL (BRASIL, 2016), indicando que o leite foi obtido de vacas sadias e em excelentes condições higiênicas, pois níveis de CBT superiores a 100.000 UFC/mL indicam falhas de higiene no processo de produção, segundo Bramley e Mckinnon (1990).

No entanto, a realidade nacional diverge dos índices alcançados nessa pesquisa. Diversos estudos relataram altos níveis de CBT no leite brasileiro, Ribeiro Neto et al. (2012) avaliaram a CBT em 17.030 amostras de leite cru refrigerado da região nordeste, entre julho de 2009 e junho de 2010 e obtiveram CBT média de $1.186.000$ UFC/mL, sendo que para esse período o limite legal era de 750.000 UFC/mL (BRASIL, 2002). Na bacia leiteira do estado do Paraná, Hoogerheide e Mattioda (2012) observaram que 11,04% das amostras de leite cru analisadas excediam o limite de 750.000 UFC/mL, entretanto se o limite fosse de 100.000 UFC/mL, 72,73% das amostras não se enquadrariam nos padrões legais; Machado e Cassoli (2016) relataram que das 44.030 amostras leite cru dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná e Goiás, analisadas no ano de 2015, pela Clínica do Leite (Piracicaba/SP), 65% apresentavam CBT ≤ 300.000 UFC/mL, estando dentro dos limites legais, no entanto somente 41% das amostras estariam adequadas ao limite de 100.000 UFC/mL (BRASIL, 2016).

Contudo, a adoção de medidas simples de boas práticas higiênicas na ordenha possui impacto positivo na CBT, como relatado por Beloti et al. (2012) onde após a implementação dessas ocorreu redução de 88,05% na CBT em 49 fazendas do município de Ivaiporã, no norte do Paraná. Ademais, baixos níveis de CBT são possíveis e reais, segundo Carvalho (2010), as CBTs médias da Argentina, Reino Unido e Nova Zelândia, são de 67, 30 e 18 mil UFC/mL, respectivamente.

Além da obtenção higiênica do leite e da saúde dos animais, outros fatores cruciais que contribuem para a contagem bacteriana total são a temperatura e o tempo de estocagem. Nessa pesquisa, o leite cru foi mantido a 4°C por 4 ordenhas (manhã e tarde), totalizando 48 horas até o beneficiamento, como previsto na legislação brasileira (BRASIL, 2011). O'Connell et al. (2016) avaliaram a CBT inicial do leite cru (0 horas) e após 48 horas mantido a 4°C e obtiveram 2.512 UFC/mL e 3.802 UFC/mL, respectivamente, já Malacarne

et al. (2013) encontraram CBT inicial (0 horas) de 104.713 UFC/mL e após 48 horas mantido entre 4-6°C e 8-10°C a mesma atingiu 131.826 UFC/mL, 1.659.587 UFC/mL, respectivamente. Tais dados indicam que a contagem bacteriana total é dependente da contaminação inicial do leite cru e que manter o leite sob-refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) reduz a velocidade de multiplicação das bactérias mesófilas.

Os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos não gordurosos foram apresentados na Tabela 3 e encontram-se dentro e/ou próximos aos padrões legais (BRASIL, 2011). Não houve diferenças ($P > 0,05$) para os níveis de CBT estudados para esses componentes, Vargas et al. (2013) e Bueno et al. (2008) também não encontraram diferenças estatísticas nessas faixas de CBT. Os mesmos autores relataram diminuição dos teores de lactose, em leites com CBT > 100.000 UFC/mL, como provável consequência Vargas et al. (2013) encontraram diminuição da porcentagem de sólidos não gordurosos. Outro fato revelado por Bueno et al. (2008) foi em relação à elevação do teor de proteínas com o aumento da CBT, os autores ligam esse fato a concentração desse nutriente, em relação aos demais (lactose e gordura), que são mais susceptíveis a degradação de origem bacteriana, Andrade, Hartmann e Masson (2009) também encontraram esse mesmo comportamento do teor de proteína com a elevação da CBT. Os tipos de micro-organismos contaminantes também influenciam na composição centesimal do leite, como descrito por Vasil et al. (2016), os quais encontraram diminuição do teor de proteína, em leites contaminados por *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus warneri*.

Em relação às porcentagens desses macro-nutrientes, o teor de gordura (2,89%) foi inferior ao encontrado por Santos et al. (2008) em leites armazenados a 4°C por 48 horas, o qual foi de 3,81%, como também ao de Bueno et al. (2008), de 3,73% em leites com CBT entre 11.000 e 100.000 UFC/mL e aos descritos por Vargas et al. (2013), de 3,47% para CBT < 50.000 UFC/mL e 3,50% para CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL, por outro lado os teores de lactose (4,72%), sólidos não gordurosos (8,58%) e proteínas (3,14%) foram superiores aos relatados por Vargas et al. (2013), os quais foram de 4,42%, 8,45% e 3,08% para CBT < 50.000 UFC/mL e 4,41%, 8,46% e 3,09% para CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL, respectivamente, e por Santos et al. (2008) e Bueno et al. (2008), os quais encontraram índices de lactose de 4,41% e 4,55%, respectivamente, porém os mesmos autores relataram teores de proteínas superiores, de 3,22% e 3,29%, respectivamente. A composição do leite é dependente de inúmeras variáveis (raça, estado de lactação, número de ordenhas, saúde dos animais e alimentação), sendo o teor de gordura, o nutriente mais afetado (COSTA; TEIXEIRA, 2007).

A gordura no leite pode variar de 2,4 a 5,5% (GOFF, 2014), sendo que 3,5% é o teor médio de gordura de vacas holandesas (JENSEN; NEMBURG, 1995), das quais o leite estudado foi obtido, entretanto, de acordo com Teixeira (2006) a nutrição é responsável por 50% do teor de gordura do leite, justificando assim a porcentagem encontrada nessa pesquisa.

Segundo Brasil (2011), a acidez do leite deve estar compreendida entre (0,14 a 0,18) g/100 mL, tais valores equivalem ao intervalo de pH de 6,6 a 6,8. Como ilustrado na Tabela 3 o valor médio do pH foi de 6,71, estando dentro da normalidade e indicando que não houve acidificação nos leites estudados, fato esse devido às baixas contagens bacterianas e a manutenção do leite sob-refrigeração, uma vez que o pH é afetado pela ação das bactérias ácido lácticas mesófilas que transformam a lactose em ácido láctico, causando a redução do valor do pH (FOX; LUCEY; COGAN, 1990). Vasil et al. (2016), Malacarne et al. (2013) e Andreatta et al. (2004) encontraram valores de pH no leite cru semelhantes, de 6,77, 6,72 e 6,74, respectivamente, enquanto Milogo et al. (2015) observaram valor inferior de 6,4 em leites armazenados por 48 horas a 4°C.

A CCS dos leites não apresentou diferenças ($P>0,05$) para os níveis de CBT avaliados se enquadrando dentro dos padrões legais brasileiros (BRASIL, 2011). Segundo Santos (2003), a elevação da CCS do tanque sinaliza a ocorrência de mastite subclínica no rebanho. Leites do tanque com $CCS \geq 200.000$ céls/mL são considerados atípicos, de acordo com Health (2011), podendo acarretar em diminuição da produção, alterações na composição centesimal dos leites e ao incremento da ação proteolítica e lipolítica devido à ação de proteases e lipases nativas do leite (GRIEVE; KITCHEN, 1985; AULDIST; HUBBLE, 1998).

A única característica físico-química dos leites crus refrigerados que apresentou efeito ($P<0,01$) para os níveis de CBT analisados foi a densidade relativa, sendo de 1030,2 g/L para o tratamento com CBT <50.000 UFC/mL e 1030,7 g/L para o tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL, todavia ambos os tratamentos se apresentaram dentro do intervalo legal de 1028,0 g/L a 1034,0 g/L (BRASIL, 2011). Nos leites estudados o tratamento com CBT <50.000 UFC/mL apresentou teor de gordura superior (2,97%) em relação ao tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL, que obteve 2,81% para gordura, segundo Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008) a elevação do teor de gordura gera decréscimos na densidade corroborando com os resultados encontrados. Além disso, o tratamento 2 (≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL) apresentou nível de CCS de $162,99 \times 10^3$ céls/mL, sendo este superior ao do tratamento 1 (<50.000 UFC/mL), o qual foi de $113,29 \times 10^3$ céls/mL, de acordo com Machado, Pereira e Sarriéz (2000) a elevação da CCS causa decréscimos na

produção de leite ocasionando em concentração dos nutrientes deste, e consequentemente causa acréscimos na densidade do leite.

A obrigatoriedade da pasteurização do leite cru destinado a fabricação de queijo Minas Frescal, está descrita em Brasil (1997). Tal etapa é indispensável para assegurar a segurança alimentar, pois promove a eliminação de bactérias patogênicas, como também causa a redução da microbiota deteriorante (ADAD, 2004).

A redução microbiológica foi satisfatória, sendo de 1,68 ciclos log. para a contagem de bactérias mesófilas nos leites pasteurizados com CBT <50.000 UFC/mL e de 1,96 para os leites com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL, do mesmo modo Lisita (2005) evidenciou diminuição de 1,80 ciclos log. para leites destinados a produção de queijos, enquanto Rossi Júnior et al. (2006) encontrou taxa de redução superior de 3,65 ciclos log. para bactérias mesófilas em leites pasteurizados designados a produção de leite UAT, oscilações de 1,5 a 5,2 ciclos log. nas taxas de redução bacteriana em leites pasteurizados foram descritas por Assumpção (2001).

Em relação à composição físico-química dos queijos Minas Frescal, os teores médios globais de umidade apresentaram efeito ($P < 0,01$) para os níveis de CBT estabelecidos, independente do período de armazenamento, sendo 63,46% e 60,77% para os tratamentos com CBT <50.000 UFC/mL e CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL, respectivamente, esse fato pode ser atribuído aos pHs dos queijos Minas Frescal, pois com o decréscimo deste ocorre maior expulsão da água e formação de um coágulo mais rígido contendo menor teor de umidade (YAN; LANGLOIS; O'LEARY, 1983), sendo que para o tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL houve decréscimos superior no pH ao longo do período de armazenamento. Outro fator que pode ter contribuído para as diferenças nas porcentagens de umidade dos queijos é a densidade dos leites crus refrigerados, esta por sua vez apresentou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os níveis de CBT, sendo que o tratamento com CBT <50.000 exibiu densidade inferior ao outro tratamento, indicando maior porcentagem de água no leite cru, fato semelhante ao ocorrido nos queijos Minas Frescal.

Os teores de umidade encontrados estão de acordo com a legislação, a qual classifica o queijo Minas Frescal como de muita alta umidade ($>55\%$) (BRASIL, 1996; BRASIL, 2004), resultados similares foram descritos por Andreatta et al. (2009) que obtiveram teor médio de umidade de 63,05% em queijos Minas Frescal produzidos com leites com CCS média de 125.000 céls/mL (semelhante à CCS média dos leites crus deste estudo); Cardoso (2006) encontrou teor médio de 59,13% em queijos Minas Frescal produzidos com leites crus refrigerados armazenados por 48 horas, 63,2% e 62,88% foram os teores de

umidade médio em queijos Minas Frescal industrializados obtidos por Ricardo et al. (2011) e Dias et al. (2016), respectivamente, enquanto valores superiores na porcentagem de umidade foram encontrados por Naldini (2002) em queijos Minas Frescal produzidos de modo convencional e Silva (2015) em queijos Minas Frescal artesanais, os quais foram de 65,82% e 65,32%, respectivamente.

Durante o período de armazenamento (Figura 4) houve efeito ($P<0,01$) para os teores médios de umidade, independentemente do nível de CBT, com redução de 65,29% (dia 1) para 60,91% (dia 21), totalizando uma perda de 6,71%. A sinérese nos queijos durante o tempo de armazenamento pode estar ligada a diminuição das forças entre as micelas de caseína, devido ao aumento da concentração de íons H^+ evidenciados pelo decréscimo do pH e elevação da acidez titulável, tal fator acentua a liberação do soro (FOX et al., 2000; LAW; TAMIME, 2010), como também ao tipo de processamento, neste por sua vez não ocorre prensagem (expulsão forçada do soro) e ao tipo de embalagem, pois o vácuo dificulta a sinérese (SILVA, 2015).

Perdas menores no teor de umidade foram relatados por Andreatta et al. (2009), que obtiveram redução de 63,05% para 61,52% após 23 dias de armazenamento em queijos Minas Frescal embalados à vácuo, Rocha, Buriti e Saad (2006) encontraram decréscimo no teor de umidade de aproximadamente 3,3% após 21 dias de armazenamento, já Silva (2015) observou perdas de 4,65% e 14,26%, em queijos produzidos artesanalmente e industrializados, respectivamente, após 10 dias de armazenamento, enquanto Sant'Ana et al. (2013) relataram redução de aproximadamente 10%, após 21 dias de produção.

A legislação brasileira não estabelece níveis máximos e mínimos para a quantidade de proteínas no queijo Minas Frescal, o que gera grandes oscilações nos teores desse nutriente. Houve efeito ($P<0,05$) para os teores de proteína e níveis de CBT, os quais apresentaram média de 16,14% e 17,32% para CBT <50.000 UFC/mL e CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL, respectivamente, essa diferença está relacionada aos teores de umidade, visto que o tratamento com CBT ≥ 50.000 e <100.000 UFC/mL apresentou teor de umidade inferior gerando assim a concentração no teor de sólidos deste tratamento.

Fato similar foi evidenciado por Silva (2015), que obteve 12,45% de proteínas em queijos Minas Frescal artesanais com umidade de 65,82% e 18,65% de proteínas em queijos Minas Frescal industrializados que sofreram prensagem, com umidade de 54,38%. Porcentagens inferiores foram encontrados por Sant'Ana et al. (2013) e Naldini (2002), os quais foram de 15,35% e 15,86%, respectivamente, teores proteicos semelhantes foram

descritos por Andreatta et al. (2009) e Machado et al. (2004), sendo respectivamente, 17,35% e 17,06% e Spadoti, Dornellas e Roig (2005) relataram teor superior de proteína de 18,02%.

O teor de proteína também apresentou efeito linear positivo ($P < 0,05$) para os dias de armazenamento, independentemente do nível de CBT, com aumento progressivo com o passar do tempo (Figura 5) em decorrência da dessoragem e concentração dos sólidos. Sangaletti et al. (2009) encontrou o mesmo comportamento, com variação de 21,29% para 22,10%, após 30 dias de armazenamento.

Como consequência do maior teor de proteínas nos queijos do tratamento 2 (CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL), houve maior índice de extensão médio da proteólise para este grupo (18,12%) diferindo estaticamente ($P < 0,05$) do tratamento com CBT < 50.000 UFC/mL, o qual obteve índice de extensão médio de 10,37%, atrelado a este fator a superioridade do nível de CCS dos leites crus do tratamento 2 (Tabela 3), isto pode estar ligado aos níveis de CCS, pois as células somáticas são conversoras do plasminogênio em plasmina (VERT; BARDANO; 1991), esta por sua vez, atua sobre frações (α_{s1} , α_{s2} e β) da caseína mesmo após a pasteurização (KORYCKA-DAHL; DUMAS; CHENE, 1983), visto que o índice de extensão da proteólise mensura a quantidade de peptídeos de alto e médio peso molecular presentes nos queijos, resultantes da degradação das proteinases naturais do leite e ação do agente coagulante sobre as porções α e β da caseína.

Em queijos artesanais da Canastra, Silva et al. (2011) e Costa Junior et al. (2009) encontraram índices de extensão de 12,28% e 9%, respectivamente, enquanto em queijos Minas artesanal da microrregião de Campo das Vertentes, Moreno (2013) obteve índice de extensão médio de 12,02%.

Além do efeito do tratamento no índice de extensão foi verificado efeito ($P < 0,01$) do período de armazenamento, independente do nível de CBT (Tabela 10), assim as médias globais da extensão da proteólise apresentaram comportamento quadrático crescente (Figura 9) ao longo de período de armazenamento. Sobral et al. (2015) observaram fato semelhante em queijos da região de Araxá e do Cerrado, nos quais ocorreu variação de 8,54% para 18,57% e de 9,72% para 16,86%, respectivamente, durante 30 dias de armazenamento. Em queijos Minas Frescal, Saboya et al. (1998) encontraram valores inferiores ao presente trabalho, de 7,59% a 13,03% após 21 dias de fabricação, enquanto Isepon e Oliveira (1993) encontraram evolução de 4,64% para 10,71%, após 13 dias de armazenamento.

O alto teor de umidade dos queijos Minas Frescal contribui para a ação da quimosina residual (cerca de 6%) durante o período de armazenamento (FOX; Mc

SWEENEY, 1998). A superioridade dos níveis de extensão da proteólise desse estudo pode ser decorrente do método de armazenamento empregado, o qual propiciou elevada dessoragem (ausência de vácuo).

Os peptídeos de alto e médio peso molecular provenientes da degradação primária das caseínas são substratos para a ação proteolítica advinda de enzimas bacterianas, originando como produtos finais compostos de baixa massa molecular (aminoácidos, oligopeptídeos e aminas), os quais são mensurados por meio do índice de profundidade (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989). O índice de profundidade apresentou efeito ($P < 0,05$), para os níveis de CBT dos leites crus (Tabela 9), independente do período de armazenamento, com índice superior no tratamento com CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL, tal fato pode estar associado a produção de enzimas proteolíticas pelas bactérias psicrotróficas, as quais estavam presentes em contagens superiores nesse tratamento, bem como ao maior teor de substrato (peptídeos de alto e médio peso molecular) para estas, demonstrado pelo índice de extensão. Moreno (2013) encontrou índice de profundidade semelhante de 6,91% em queijos Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes, enquanto Machado et al. (2004), em queijo Minas artesanal do Serro, obtiveram índice de profundidade superior de 9,18%.

Não houve efeito ($P > 0,05$) ao longo do período de armazenamento para o índice de profundidade da proteólise. Resultados divergentes foram encontrados por Sobral et al. (2015), os quais verificaram elevação dos índices de profundidade em queijos artesanais da região de Araxá de 5,09% para 11,91%, e em os queijos do Cerrado de 6,35% para 11,52%, ao longo de 30 dias de armazenamento.

Os teores de gordura dos queijos Minas Frescal foram de 15,09% (41,3% GES) para o tratamento com CBT < 50.000 UFC/mL e 15,2% (38,75% GES) para o grupo CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL, não apresentaram efeito ($P > 0,05$) para os níveis de CBT avaliados (Tabela 5), os mesmos continham entre 25% a 44,99% no GES, como preconizado pela legislação, por serem classificados como queijos semi-gordos (BRASIL, 1996; BRASIL, 2004). Rodrigues et al. (2011) verificaram que 91,3% das amostras de queijo Minas Frescal avaliadas apresentavam teor médio de gordura de 16,2% (40,1% GES), estando de acordo com a legislação e próximas aos valores obtidos nessa pesquisa, já Ricardo et al. (2011) encontraram variações nos níveis de gordura de 29,9 a 64,2% no GES, em 10 amostras de queijo Minas Frescal industrializados, tais diferenças podem estar ligadas a falta de padronização dos teores de gordura dos leites utilizados para a fabricação dos queijos.

Durante o período de armazenamento, houve efeito ($P<0,01$) para o teor de gordura, independente do nível de CBT, com aumento da porcentagem desta ao longo do tempo (Figura 5), devido a concentração dos sólidos nos queijos decorrente da perda de umidade sofrida por estes. O teor de gordura em queijos é inversamente proporcional ao teor de umidade, assim queijos como o Cheddar (umidade=39%) possuem teor de gordura médio de 31%, enquanto os Camembert (umidade=56%) contêm em média 22% de gordura (BOHRER, 2014).

A liberação de ácidos graxos livres pela ação enzimática sobre os triacilglicerídeos é denominada lipólise (FURTADO; CHANDAN, 1983), assim a extensão da lipólise auxiliou na quantificação do teor de ácidos graxos livres ao longo da vida útil. A extensão da lipólise apresentou interação ($P<0,05$) para os níveis de CBT e período de armazenamento (Tabela 8). Os tratamentos apresentaram comportamento crescente significativo ($P<0,01$) durante o período de armazenamento, os incrementos nas quantidades de ácidos graxos livres foram de 1,62 e 0,84 mg KOH/g de gordura para os tratamentos com $CBT \geq 50.000$ e <100.000 UFC/mL e $CBT < 50.000$ UFC/mL, respectivamente.

De acordo com Holland et al. (2005) a elevação no teor de ácidos graxos livres deve estar associada à proliferação das bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado, estas por sua vez produzem enzimas lipolíticas termorresistentes que promovem a hidrólise dos lipídios liberando ácidos graxos livres e compostos voláteis, pois as lipases naturais do leite, principalmente as lipases lipoproteicas que se encontram ligadas as micelas de caseína, são inativadas pelo processo de pasteurização (MUIR, 1996) e o tratamento com $CBT \geq 50.000$ e <100.000 UFC/mL apresentou contagem superior de bactérias psicrotróficas, propiciando assim maior ação enzimática e liberação de ácidos graxos livres.

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento do teor de ácidos graxos livres foi a rancidez oxidativa, visto que os queijos não foram embalados a vácuo, proporcionando a interação entre o oxigênio e os 3,5% de ácidos graxos insaturados dos queijos Minas Frescal (INMETRO, 2011; VICENZI, 2013). Sangaletti et al. (2009) encontraram elevação de 0,22 mg de KOH/g de gordura em queijos Minas Frescal embalados a vácuo, após 30 dias de armazenamento a 4°C, enquanto Andreatta (2006) encontrou elevação de 0,33 meq ácidos graxos livres/kg de queijo, após 23 dias de armazenamento a 4°C.

Atrelado ao aumento dos níveis de ácidos graxos livres nos queijos ocorreu o decréscimo do pH e conseqüentemente a elevação da acidez titulável, visto que o pH e acidez

titulável mensuram a concentração de íons H^+ dispersos e o teor de ácidos e/ou compostos ácidos (ácido láctico e graxos, proteínas, fosfatos, sulfatos de cálcio e magnésio, carbonatos e citratos) presentes nos queijos (AMIOT, 1991; SCOTT, 1991). Além da contribuição advinda dos ácidos graxos, podem ter ocorrido transformações nos macro-nutrientes do queijo, principalmente na lactose residual pelos micro-organismos resistentes ao tratamento térmico utilizado, uma vez que o tratamento com CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL possuía contagem superior de micro-organismos mesófilos, os quais possuem gêneros de bactérias ácido-láticas e a pasteurização não proporciona a seleção da microbiota prevalente (ESKIN, 1990).

O pH e a acidez titulável apresentaram interação ($P < 0,01$) para os níveis de CBT e período de armazenamento (Tabela 7). Em relação ao pH, apenas o tratamento com CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL apresentou alteração estatística ($P < 0,01$) durante o tempo de armazenamento, com decréscimo de pH de 6,72 para 6,15 (0,57), enquanto que para o tratamento com CBT < 50.000 UFC/mL a redução foi de 6,59 para 6,49 (0,10). A elevação da acidez titulável foi inversamente proporcional a redução do pH, ambos os tratamentos apresentaram efeito ($P < 0,01$) a partir do 14º dia após a fabricação, entretanto em nível mais acentuado no tratamento com CBT ≥ 50.000 e < 100.000 UFC/mL, no qual o acréscimo foi de 0,066%, enquanto o aumento para o tratamento com CBT < 50.000 UFC/mL foi de apenas 0,017%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Buriti et al. (2005), os quais relataram diminuição de 0,58 no pH, e aumento de 0,15% para acidez titulável, após 21 dias de armazenamento em queijos Minas Frescal. Sangaletti et al. (2009) encontraram maior nível de redução no pH de queijos Minas Frescal, de 0,81, após 30 dias de armazenamento, e aumento de 0,026% no teor de ácido láctico, enquanto Sant'Ana et al. (2013) verificam quedas no pH de 0,3 e a adição em ácido láctico de 0,5%, em queijos Minas Frescal após 21 dias de armazenamento.

A avaliação microbiológica dos queijos Minas Frescal não foi influenciada pelos níveis de CBT. Os coliformes termotolerantes (Tabela 12) foram detectados em 5,22% das amostras de queijos Minas Frescal, em níveis inferiores aos estabelecidos pela legislação (5×10^2 UFC/mL) (BRASIL, 2001), entretanto diversos autores relataram a presença de coliformes termotolerantes em desacordo com a legislação, Pinto et al. (2011) e Salotti et al. (2006) verificaram que 90% e 83,4% das amostras de queijos Minas Frescal artesanais e 55% e 66,7% das amostras de queijos industrializados (sob fiscalização), respectivamente,

extrapolavam o limite legal para coliformes termotolerantes, do mesmo modo, Apolinário, Santos e Lavorato (2014) demonstraram que 54,8% das amostras de queijo Minas Frescal produzidas na região da Zona da Mata mineira e sob inspeção não se enquadravam nos padrões legais.

Durante o período de armazenamento (Tabela 11) e independente do nível de CBT, houve efeito ($P < 0,05$) para a contagem de estafilococos coagulase positiva, colocando os queijos Minas Frescal fora dos padrões legais (5×10^2 UFC/mL), devido a elevada contaminação por esses micro-organismos nos lotes, os quais foram de $1,4 \times 10^5$ UFC/mL (14 dias) e $2,2 \times 10^5$ UFC/mL (21 dias) em 9,56% das amostras avaliadas. Almeida Filho e Nader Filho (2000) também encontraram contagens de estafilococos coagulase positiva em torno de 10^5 UFC/g em 50% dos queijos Minas Frescal analisados, Komatsu et al. (2000) e Apolinário, Santos e Lavorato (2014) encontraram 88% e 16,2%, respectivamente, das amostras de queijo Minas Frescal analisadas fora dos padrões legais para este micro-organismo. A presença desses micro-organismos pode ser atribuída às características físico-químicas do queijo Minas Frescal (pH e alto teor de umidade) e ao tipo de processamento, segundo Forsythe (2002), falhas no tratamento térmico, sanitização inadequada de equipamentos, higiene dos manipuladores imprópria e temperaturas de estocagem elevadas, propiciam a contaminação por coliformes termotolerantes, os quais possuem gêneros patogênicos e estafilococos coagulase positiva, cujo em elevada quantidade podem levar a produção de enterotoxinas, gerando riscos a saúde do consumidor.

Não foram identificados *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, no presente estudo, como preconizado pela legislação, a qual prevê ausência destes micro-organismos em 25g de amostras (BRASIL, 2011), assim como os resultados obtidos por Salotti et al. (2006) e Pinto et al. (2011), já Apolinário, Santos e Lavorato (2014) e Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) não encontraram *Salmonella* spp., todavia isolaram *Listeria monocytogenes* em 9,6% e 3,2%, em amostras de queijo Minas Frescal, respectivamente. Rocha, Buriti e Saad (2006) ao avaliar a contaminação microbiológica em queijos Minas Frescal constataram que em 6 das 7 marcas analisadas, os queijos apresentavam-se impróprios para o consumo após 7 dias de fabricação e extremamente deteriorados após 21 dias de fabricação.

De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa os queijos tornaram-se impróprios para o consumo após 14 dias de armazenamento, porém também encontravam deteriorados após de 21 dias da data de manufatura, evidenciando a necessidade de padronização na vida útil desse tipo de queijo, apesar das peculiaridades na fabricação, visto

que na legislação não há prazo de validade definido e a associação brasileira das indústrias de queijos (ABIQ) estima um prazo de validade de 20 dias.

De acordo com Lucey e Kelly (1994), a massa (kg) de queijo gerada a partir de 100 kg de leite é denominada de modo usual, como rendimento. Não houve efeito ($P>0,05$) para os rendimentos com 0 e 24 horas, para os níveis de CBT dos leites crus refrigerados, corroborando com Murphy et al. (2016) o qual afirma que queijos produzidos com leites crus com CBT <100.000 UFC/mL não devem sofrer alterações no rendimento industrial. Andreatta et al. (2006) encontraram rendimento médio semelhante de 16,2% em queijos Minas Frescal produzidos, a partir de leites com CCS entre 100.000-200.000 céls/mL, bem como Neves-Souza e Silva (2005) os quais obtiveram rendimento de 16,41% em queijos Minas Frescal produzidos com coalho bovino, entretanto Aguiar et al. (2013) e Aquino et al. (2009) encontraram rendimentos superiores de 21,01% e 17,14%, respectivamente, na fabricação de queijos Minas Frescal.

Inúmeros fatores ligados a matéria prima, bem como ao produto podem contribuir para as diferenças no rendimento da fabricação de queijos. Os teores de gordura e proteína dos leites são determinantes para o rendimento (GUO et al., 2004). Além destes, altos níveis de células somáticas também provocam quedas na produção (AULDIST; HUBLLE, 1998). A contagem de bactérias psicrotróficas no leite cru e o tempo de armazenamento sob-refrigeração, também geram alterações no rendimento dos queijos, devido a degradação por ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas sob os constituintes do leite que são arrastados junto ao soro (MURPHY et al., 2016). Ellis e Marth (1984) utilizaram leite cru inoculado com cepas de *Pseudomonas* e *Flavobacterium* armazenado a 7°C por até 7 dias para a produção de queijo cheddar e verificaram que o rendimento industrial dos queijos fabricados a partir destes leites tiveram uma redução de (1,2 a 4,2)%, quando comparado ao rendimento obtido a partir de leite inoculado sem armazenamento, em estudo conduzido por Leitner et al. (2008) os autores observaram diminuição média do rendimento da coalhada de queijo de 7% em queijos produzidos com leites armazenados por 48 horas a 4°C. Em relação ao produto, o teor de umidade dos queijos, bem como o processamento (tratamento térmico, tipo de coagulação e perdas durante o corte da massa) também possuem influência direta sobre o rendimento (FENELON; GUINEE, 1999).

7. Conclusões

Os resultados obtidos indicaram que os queijos Minas Frescal produzidos com leites contendo CBT inferior a 50.000 UFC/mL, originam produtos mais estáveis e de melhor qualidade ao longo da vida útil desse produto.

8. Referências

- ADAD, J. M. T. Indústria de alimentos de origem animal atividade básica da medicina veterinária ou da química? (Conclusão). **Informativo CFQ**, p. 6-12, abril-junho, 2004.
- 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**, Baltimore, v. 58, n. 6, p. 828-834, Jun. 1975.
- AGUIAR, A. C. R.; OLIVEIRA, C. R.; CALDEIRA, L. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; OLIVEIRA, S. J.; SOARES, C.; SILVA, D. A.; MENEZES, J. C.; BORGES, L. D. A. Consumo, produção e composição do leite e do queijo de vacas alimentadas com níveis crescentes de ureia. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 20, n. 1, p. 37-42, 2013.
- ALAIS, C. **Ciência de la leche – Principios de Técnica Lechera**. México: Compania Editorial Continental S.A., 1971.
- ALMEIDA, A. A. P. Micro-organismos psicotróficos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.53, n. 304, p.90-93, 1998.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-80, 2000.
- ALVES, C.; FONSECA, L. M. Avaliação das variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado, por meio dos parâmetros de composição centesimal, CCS e CBT. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 23, 2006, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, 2006, p. 416-419.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington, 1992, p. 345.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001, p. 676.
- AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMAN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 129-135, 2009.
- ANDREATTA, E. **Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. 2006. 110f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- ANDREATTA, E.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; MARQUES, M. C.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V.; SANVIDO, G.; GIGANTE, M. L. Avaliação do rendimento e proteólise do queijo Minas Frescal produzido com diferentes níveis de células somáticas: resultados preliminares. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, s.n., p. 71-74, 2006.
- ANDREATTA, E.; FERNANDES, A. M.; SANTOS, M. V.; MUSSARELLI, C.; MARQUES, M. C.; GIGANTE, M. L.; OLIVEIRA, C. A. F. Quality of minas frescal cheese prepared from Milk with

different somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p.320-326, 2009.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

AQUINO, A. A.; PEIXOTO JUNIOR, K. C.; GIGANTE, M. L.; RENNÓ, F. P.; PRADA e SILVA, L. F.; SANTOS, M. V. Efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas leiteiras sobre a composição e rendimento de fabricação de queijos minas frescal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 273-279, 2009.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R.; ALMEIDA, N. L. **Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ). Tipos de queijo-Minas Frescal. 2017. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/nutricao_queijosbrasil_tipos_vaca.asp>. Acesso em: 17 de maio de 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analyses**. 11 ed. Washington. 1984, p.10.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY INTERNATIONAL (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 6 ed, Arlington, v.1, 1995.

ASSUMPÇÃO, E. G. **Identificação dos pontos de contaminação microbiológica ao longo do processamento de queijo prato: estudo de caso**. 2001, 77f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 53, p. 28-36, 1998.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. 2. ed. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **The microbiology of milk**, London, UK: Elsevier Science Publishers, p. 163-208, 1990.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13º ed. São Paulo: Editora Noel, 1999.

BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C. Impacto da implantação de boas práticas de higiene na ordenha sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 67, n. 388, p. 05-10, 2012.

BOHRER, B. Table 6.1. Some cheese varieties with some characteristics, composition and suggested ratio of protein/fat in standardized milk. Fat and moisture levels for most varieties correspond to definitions given in the Canadian regulations. **Food Science**. 2014. Disponível em:<<https://www.uoguelph.ca/foodscience/table-61>>. Acesso em: 22 de junho de 2017.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 589-594, 2013.

BRAMLEY, A. J. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd I. Isolation from bovine feces and from straw bedding of cattle. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, p. 369-373, 1982.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. 2. ed. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **The microbiology of milk**, London, UK: Elsevier Science Publishers, 1990, p. 163-208.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 30 de março de 2017. Seção 1, p. 3.

_____. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 2017. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 07 de julho de 1952, Seção 1.

_____. Instrução Normativa nº 04, de 01 de março de 2004. Altera a Portaria nº 352 de 04/09/1997. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 05 março. 2004. Seção I, p. 5.

_____. Instrução Normativa nº 07, de 03 de maio de 2016. Altera a tabela 2 do item 3.1.3.1 do Anexo II da Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 04 de maio de 2016. Seção 1, p. 11.

_____. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 30 de setembro de 2002. Seção 1, p. 13.

_____. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado e de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 29 de dezembro de 2011. Seção 1, p. 6.

_____. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 18 de setembro de 2003. Seção 1, p. 14.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006, Seção 1, p. 8.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília, 2005.

_____. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 de março de 1996. Seção 1, p. 50.

_____. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. 08 de setembro de 1997. Seção 1, p. 19684.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ACURI, E. et al. **Tipos de microrganismos**-Agronegócio do leite. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2005.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 38, p. 173–180, 2005.

BUENO, V. F. S.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, Niterói, v. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

BYNUM, D. G.; BARBANO, D. M. Whole Milk Reverse Osmosis Retentates for Cheddar Cheese Manufacture: Chemical Changes During Aging. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 68, p. 1-10, 1985.

CABONI, M. F.; ZANNONI, M.; LERCKER, G. Fat lipolysis in Parmigiano-Reggiano cheese. **Scienza e Tecnica Lattiero Casearia**, Parma, v. 41, p. 289-297, 1990. Suplemento.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARVALHO, G. R. A. **indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 102-113, 2010. Circular Técnica.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, Grã-Bretanha, v. 18, p. 262–267, 2007.

CASSOLI, L. D.; SILVA, J.; MACHADO, P. F. **Mapa da Qualidade-Contagem de Células Somáticas (CCS) da Clínica do Leite**. Piracicaba: ESALQ/USP, Edição 1, 2016.

CAMPOS, D. C. **Queijo: breve histórico e principais características**. Piracicaba: ESALQ-NAPMA, 2001, p. 59. (NAPMA, n.11).

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COLLINS, E. B. Heat resistant Psychrotrophic Microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.

COSTA, C. N.; TEIXEIRA, N. M. Estratégias para melhoria da qualidade do leite com foco na IN51. In: MARTINS, P. do C.; SOUZA, V. F. de; MOREIRA, M. S. de P.; ROSA NETO, C. (Ed.). **Conhecimentos e tecnologias para produção de leite no Estado de Rondônia**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007. p. 35-53.

COSTA JUNIOR, L. C. G.; COSTA, R. G. B.; MAGALHÃES, F. A. R.; VARGAS, P. I. R.; FERNANDES, A. J. M.; PEREIRA, A. S. Avaliação da proteólise de queijo artesanal de uma unidade produtora da Serra da Canastra nas quatro estações do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 371, p. 62-69, 2009.

COUSIN, C. M.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: R.K. Robinson. **Dairy Microbiology**-The microbiology of Milk. London: Applied Science, 1981, v. 1, p. 119-163.

- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 47, p. 96-100, 1992.
- DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.
- ELLIS, B. R.; MARTH, E. H. Growth of *Pseudomonas* or *Flavobacterium* in milk reduced yield of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 47, p. 713-716, 1984.
- ESTEVEES, E. G.; CARVALHO, E. C.; COELHO, F. S. **Resultados Analíticos**. Disponível em: <[http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20-%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20\(RBQL\).pdf](http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20-%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20(RBQL).pdf)>. Acesso em: 09 de maio de 2017.
- ESKIN, M. N. A. **Biochemistry of foods**. 2nd ed. London: Academic Press, 1990.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. Rio de Janeiro, São Paulo: Atheneu, 1987.
- FENELON, M. A.; GUINEE, T. P. The effect of milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 2287-2299, 1999.
- FERREIRA, A. B. H. **Novo dicionário da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1975, p. 1175.
- FONSECA, F. L.; CARVALHO, M. P. O grande gargalo: tecnologia, preço e qualidade do leite. In: FONSECA, F. L.; CARVALHO, M. P. **Leite, política e derivados**. São Paulo: Quiron Livros, 2004, p.23-30.
- FONSECA, L. F. L. Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 1998. p. 54-56.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Statistical Database - Faostat**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 05 de maio de 2017.
- FONSECA, L. F. L.; PEREIRA, C. C.; CARVALHO, M. P. Qualidade microbiológica do leite. In: INTERLEITE -SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 4., 1999, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 1999. p. 36-43.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FORSYTHE, S. J.; HAYES, P. R. **Higiene de los alimentos, microbiologia y HACCP**. Zaragoza: Acribia S.A. 2002. 3 Edição, p.489.
- FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glicolysis and related reaction during cheese manufacture and ripening. **Critical reviews in food science and nutrition**. Boca Raton, v. 29, p. 237-253, 1990.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Chemistry and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks. In:_____. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London, U. K.: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 10, p. 403-418.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6ª reimpressão. São Paulo: Atheneu, 2009.

FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. São Paulo: Globo. 1991, 2 Edição. p. 297.

FURTADO, M. M.; CHANDAN, R. C. Efeito do teor de gordura na maturação de um queijo por *Penicillium caseicolum*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 38, n. 225, p. 13-22, 1983.

GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leukocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 52, p. 101-120, 1985.

GOFF, D. Composition and Structure: Overview . **The Dairy Science and Technology**- ebook. University of Guelph, Canada. 2014. Disponível em: < <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/composition-and-structure-overview>>. Acesso em: 14 de junho de 2017.

GONZALEZ, R. N.; JASPER, D. E.; BUSNELL, R. B.; FARBER, T. B. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Bel Air, v.189, n.4, p. 442-445, 1986.

GUO, M.; PARK, Y. W.; DIXON, P. H.; GILMORE, J. A.; KINDSTEDT, P. S. Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 52, p. 103-107, 2004.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CARREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 292 - 298, 2001.

HEALTH, P. A. **Monitor SCC for herd health**. 2011. Disponível em: < <http://www.cattlenetwork.com/bovine-vet/web-exclusive-practice-tips/monitor-scc-for-herd-health-113984579.html>>. Acesso em: 15 de junho de 2017.

HICKS, C. L.; ONUORAH, C.; O'LEARY, J.; LANGLOIS, B. E. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield - Asummation. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 69, n. 3, p. 649-657, 1986.

HITCHINS, A. D; JINNEMAN, K.; CHEN, Y. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: **(FDA) Laboratory methods: Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 10, revised April, 2011. Disponível em: < <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm> >. Acesso em: 29 de julho de 2016.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S.; HUESTON, W. D.; PRICHARD, D. E.; BOWMAN, G. L.; HEIDER, L. E.; BROCKETT, B. L.; CONRAD, H. R. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 72, n.1, p. 250-258, 1989.

HOLLAND, R.; LIU, S. Q.; CROW, V. L.; DELABRE, M. L.; LUBBERS, M.; BENNETT, M.; NORRIS, G. Eterases of lactic acid bactéria and cheese flavour: milk fat hidrólisis, alcoholysis and esterification. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6-9, p. 711-718, 2005.

HOOGERHEIDE, S. L.; MATTIODA, F. Qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado em propriedades rurais do estado do Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 385, p. 58-63, 2012.

HUTH, P. J.; DIRIENZO, D. B.; MILLER, G. D. Major Scientific Advances with Dairy Foods in Nutrition and Health. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1207-1221, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 de maio de 2017.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganismos de los alimentos 1: Técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 1994.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Relatório sobre a análise de gordura e colesterol em queijos**. Programa de Análises de Produtos, 2011.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas frescal. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 50, n. 3, p. 451-454, 1993.

ITAMBÉ. **Pagamento por qualidade**. 2016. Disponível em: <http://www.ccprleite.com.br/br/p/115/pagamento_por_qualidade.aspx>. Acesso em: 10 de maio de 2017.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JEFFREY, D. C.; WILSON, J. Effect of mastitis-related bacteria on the total bacteria counts of bulk milk supplies. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 40, n. 2, p. 23-28, 1987.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

KORYCKA- DAHL, M.; DUMAS, B. R.; CHENE, N. Plasmin activity in milk. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 66, n. 4, p. 704- 711, 1983.

KURWEIL, R.; BUSSE, M. Total count and microflora of freshly drawn milk. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 28, n. 7, p. 427-431, 1973.

LAW, B.A. Reviews of the progress of Dairy Science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation fo ultra-high temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n.1, p.145-148, 1977.

LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. **Technology of Cheesemaking**. 2th ed. West Sussex, United Kingdom: Wiley Blackwell - SDT, 2010.

LAVEN, R. A.; ASHMORE, A.; STEWART, C. S. *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157. **The Veterinary Journal**, London, v. 165, n. 1, p. 78-83, 2003.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; JACOBI, S.; WEISBLIT, L.; BERNSTEIN, S.; MERIN, U. The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. **Internacional Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 109–113, 2008.

- LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínio**. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- LUCEY, J.; KELLY, J. Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 16, n. 1, p. 130–142, 1994.
- MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516–521, 2004.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍEZ, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1883–1886, 2000.
- MACHADO, P. F. Pagamento por qualidade. In: BARBOSA, S. B. P.; BATISTA, A. M. V.; MONARDES, H. **III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Recife: CCS Gráfica e Editora. 2008, v. 1, p. 183–191.
- MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. **Mapa da Qualidade-Contagem Bacteriana Total (CBT) – 2016**. Piracicaba: ESALQ/USP, v. 2, 2016.
- MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976, p. 312.
- MALACARNE, M.; SUMMER, A.; FRANCESCHI, P.; FORMAGGIONI, P.; PECORARI, M.; PANARI, G.; VECCHIA, P.; SANDRI, S.; FOSSA, E.; SCOTTI, C.; MARIANI, P. Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 29, p. 36–41, 2013.
- MELO JUNIOR, A. S. **Influência das células somáticas e micro-organismos psicrotróficos na gelificação e sedimentação do leite UHT**. 2005. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MILANI, M. P. **Qualidade do leite em diferentes sistemas de produção, anos e estações climáticas no noroeste do Rio Grande do Sul**. 2011, 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- MILOGO, V.; SISSAO, M.; SIDIBÉ/ANAGO, A. G.; QUÉDRAOGO, G. A. Effect of storage time and temperature on raw milk composition of dairy cattle in tropical conditions. **African Journal of Dairy Farming and Milk Production**, Brooklyn, v. 2, n. 1, p. 104–108, 2015.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO (MAPA). **Valor bruto da produção agropecuária bate recorde em 2015**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-bate-recorde-em-2015>>. Acesso em: 05 de maio de 2017.
- MILKPOINT. **Saiba quais são os principais tipos de queijo e de onde vieram**. 2014. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/saiba-quais-sao-os-principais-tipos-de-queijo-e-de-onde-vieram-87836n.aspx>>. Acesso em: 17 de maio de 2017.
- MOLINERI, A. I.; SIGNORINI, M. L.; CUATRÍN, A. L.; CANAVESIO, V. R.; NEDER, V. E.; RUSSI, N.B.; BONAZZA, J. C.; CALVINHO, L. F. Association between milking practices and

psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 44, p. 187-194, 2012.

MORENO, V.C. Caracterização física e físico-química do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 49, p. 44-48, 1996.

MULLER, E. Qualidade do leite, células somáticas de prevenção de mastite. In: II SUL – LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2, 2002, Toledo. **Anais...** Maringá: Nupel, 2002, p. 206 – 217.

MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 39, n. 1, p. 7-16, 1984.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 12, p.10128-10149. 2016.

NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

NEVES-SOUZA, R. D.; SILVA, R. S. S. F. Estudo de custo-rendimento do processamento de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 170-174, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin system microbial proteases in Milk: Characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 6628-6634, 2002.

O'CONNELL, A.; RUEGG, P. L.; JORDAN, K.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 5, p. 3367–3374, 2016.

ORDÓÑEZ, J. et al. **Tecnologia de Alimentos**-Alimentos de Origem Animal. Porto Alegre: Artmed, 2005, v.2.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005, v.1.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

PINTO, M. S. **Legislação sobre Qualidade do Leite no Brasil**-Desafio de Cumprimento dos Índices de Qualidade do Leite Impostos pela Instrução Normativa N°62/2011. 2013. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/painelsetorial/palestras/legislacao-sobre-qualidade-do-leite-no-brasil-mayara-souza-pinto.pdf>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2016.

- PORTO, E. **Microbiologia do Leite**. 2004. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/MicrobiologiaLeite.pdf>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2016.
- RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 164-167, Mar. 1995.
- REZENDE, N. C. M.; ROSSI Jr., O. D.; AMARAL, L. A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 7, p. 162-166, 2000.
- REYES, J. E.; BASTÍAS, J. M.; GUTIÉRREZ, M. R.; RODRÍGUEZ, M. O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 1-6, 2007.
- RIBEIRO, J. C.; BELOTI, V. Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite – Revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, Avaré, v. 2, n. 02, p. 01-12, 2012. Disponível em: <www.fira.edu.br/revista/reec_vol2_num2_pag1.pdf>. Acesso em: 11 de maio de 2017.
- RIBEIRO NETO, A. C.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. 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.
- RICARDO, N. R.; KATSUDA, M. S.; MAIA, L. F.; ABRANTES, L. F.; OSHIRO, L. M. Análise físico-química de queijos Minas Frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v. 2, n. 2, p. 89-95, 2011.
- RIEL, R. **Ciência e tecnologia de la leche**: Composicion y estructura físico-química de la leche. Zaragoza: Editorial Acribia S. A, 1991. p. 1-54.
- ROBBS, P. G.; CAMPELO, J. C. F. Produção segura na cadeia do leite. In: PORTUGAL, J. A. et al. (Ed). **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora: EPAMIG/CT/ILCT, 2002, p.53-76.
- 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.
- RODRIGUES, J.; FARIAS, H. L. F.; BARBOSA, B. F. F.; GARCIA, T. A.; ISSY, P. N.; ARMONDES, M. P. O. Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas Frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-GO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 9, n. 1, p. 30-34, 2011.
- ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAIVA, P. C. Quantificação de microrganismos psicotróficos em leites pasteurizados tipos B e C comercializados na cidade de SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n. 112, p. 59-68, 2003.
- ROSSI JUNIOR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; CORTEZ, A. L. L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo do seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2006.
- SABOYA, L. V; OLIVEIRA, A. J.; FURTADO, M. M.; SPADOTI, L. M. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 368-378, 1998.

SALOMÃO, V. S. C. **Influência de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p.171-175, 2006.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. C. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S.; BATISTA, A. S. M.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, p. 7442-7453, 2013.

SANTOS, M. V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: Brito, J. R. F.; Portugal J. A. B. (Org.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora, 2003, v. 1, p. 139-149.

SANTOS, M. V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Editora UPF, 2004, v. 1, p. 269-283.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade de Leite**. Pirassununga: Manole, 2007.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; ANASTACIO, P. I. B.; SILVA JUNIOR, L. C.; ISEPON, J. S.; NICOLAU, E. S. Qualidade do leite cru refrigerado estocado por diferentes períodos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 63, n. 364, p. 36-41, 2008.

SAS Institute. **SAS® User's Guide: Statistics**. SAS Institute Inc., Cary, NC., 2004.

SCOTT, R. **Acidez y otros analisis químicos para el control del proceso de elaboracion. Fabricación de queso**. 2 ed. Zaragoza: ACRIBIA, 1991. p. 93-110.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; MAGALHÃES, F. A. R.; PICCOLI, R. H.; FERREIRA, E. B. Características físico-químicas do queijo minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001, p. 317.

SILVA, T. E. **Estudo do shelf life do queijo Minas Frescal artesanal e industrial**. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2015.

SOBRAL, D.; PINTO, M. S.; TEODORO, V. A. M.; CARVALHO, A. F.; COSTA, R. G. B.; MIGUEL, E. M. Comparação dos índices de proteólise de queijos artesanais das regiões do Cerrado e Araxá. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 30, p. 43, 2015.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 705-712, out./dez. 2005.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

STULOVA, I.; ADAMBERG, S.; KRISCIUNAITÉ, T.; KAMPURA, M.; BLANK, L.; LAHT, T-M. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. **Applied Microbiology**, Los Angeles, v. 51, n. 6, p. 683-690, 2010.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p.753-760, 2008.

TEIXEIRA, N. M. A produção de leite com qualidade. In: YAMAGUCHI, L. C. T.; MENDES, L. C.; LIMA, I. B. de; RODRIGUES, C. do C.; COELHO, M. A. de O. **Qualidade e eficiência na produção de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. p. 11-27.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 2 ed. Santa Maria: Ed da UFSM, 2003.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2010.

VARGAS, D. P.; NORNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M. P.; MELLO, F. C. B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 20, n. 4, p. 241-247, out./dez. 2013.

VASIL, M.; PECKA-KJELB, E.; ELECŃKO, J.; ZACHWIEJA, A.; ZAWADZKI, W.; ZIGO, F.; IILEK, J.; FARKASŃOVA, Z. Effects of udder infections with *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus warneri* on the composition and physicochemical changes in cows milk. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn, v. 19, n. 4, p. 841–848, 2016.

VERT, R. T.; BARDANO, D. M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leucocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 7, p. 2077-2081, 1991.

VICENZI, R. **Reações químicas não enzimáticas**. In: Apostila de Tecnologia de Alimentos. Ijuí: Editora Unijuí, 2013, p. 13.

VISSERS, M. M.; DRIEBUIS, F.; TE GIFFEL, M. C.; DE JONG, P.; LANKVELD, J. M. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 850–858, 2006.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra-alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

WALCHER, U. **Mastite bovina**. 2011. 22 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WOLFSCHOON, P. A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Boletim do Leite**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

YAN, L.; LANGLOIS, B. E; O'LEARY, J. Effect of storage conditions of grade A raw milk on proteolysis and cheese yield. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 38, p. 715-717, 1983.

YUNES, V. M. BENEDET, H. D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 285-290, 2000.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Leite e derivados. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. 27, p. 823-881.

ZOCCAL, R. Queijos-Produção e importação. **Revista Balde Branco**. 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>>. Acesso em: 17 de maio de 2017.