

INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE ESTOCAGEM NA PROPRIEDADE RURAL SOBRE A QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE *IN NATURA*

Farm milk storage system's influence on the raw milk microbiological quality

Luciano dos Santos Bersot^{1*}

Vinicius Cunha Barcellos¹

Fábio Massao Fujisawa²

Juliano Gonçalves Pereira²

Maike Tais Maziero³

SUMÁRIO

A refrigeração do leite *in natura* na propriedade rural tem a finalidade de aumentar seu tempo de estocagem, diminuindo os custos de transporte e perdas pela acidificação causada pelos microrganismos mesófilos. No entanto, a refrigeração pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas termorresistentes causadoras de vários defeitos em produtos lácteos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da estocagem em tanques de imersão e de expansão na qualidade do leite *in natura* com relação aos microrganismos mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos. Para tanto, foram avaliadas dez propriedades leiteiras, sendo cinco com sistema de resfriamento por imersão e cinco utilizando tanques de expansão. A média de mesófilos em tanques de imersão ($6,04 \pm 0,71$ log UFC/ml) foi significativamente maior que nos tanques de expansão ($4,97 \pm 0,77$ log UFC/ml), indicando que a refrigeração por imersão não se mostrou eficiente no controle deste grupo de microrganismos. 60% das amostras colhidas estavam fora dos padrões exigidos pela IN51, sendo 80% delas dos produtores de leite com tanque de imersão e 40% em tanque de expansão. Não houve diferença significativa para psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos entre os tipos de estocagem avaliados. Tanto as amostras coletadas dos tanques de imersão quanto as do tanque de expansão apresentaram grandes percentuais (77,2 a 96,9%) de culturas psicrotróficas com atividade proteolítica. O resfriamento do leite em tanques de expansão mostrou-se mais eficiente no controle de microrganismos mesófilos quando comparado ao tanque de imersão, fato que não foi observado estatisticamente com relação aos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos.

Termos para indexação: mesófilos; psicrotróficos; proteolíticos; resfriamento.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite *in natura* produzido no Brasil freqüentemente tem se mostrado em desacordo com os padrões microbiológicos brasileiros (NERO et al., 2005; PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2006; ZANELA et al., 2006; ROSA & QUEIROZ, 2007). Essa qualidade está intimamente relacionada a dois aspectos: um relacionado às fontes de contaminação do leite e outro com a taxa de multiplicação dos microrganismos contaminantes. Neste sentido, estão relacionadas ao primeiro aspecto, a saúde da glândula mamária, a microbiota do exterior do úbere, a

contaminação dos equipamentos e a qualidade microbiológica da água; com relação ao segundo aspecto, considera-se o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece após a ordenha até o processamento (SILVEIRA et al., 1998; NASCIMENTO & SOUZA, 2002).

A refrigeração do leite nas propriedades leiteiras é feita, principalmente, em tanques de imersão ou de expansão direta. O tanque de imersão é um sistema mais simples, no qual o latão é colocado no tanque com água até próximo ao gargalo. A taxa de resfriamento do leite depende da temperatura da água de imersão. Na expansão direta, o tanque é constituído

- 1 Professor do Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina (*autor para correspondência: lucianobersot@ufpr.br)
- 2 Aluno de Iniciação Científica - Medicina Veterinária - Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina
- 3 Doutoranda em Tecnologia de Alimentos - PPGTA - Universidade Federal do Paraná, Curitiba

por uma parede de aço inoxidável isolante e unidade refrigerante acionada por compressor externo que baixa a temperatura por sistema de convecção. O leite é constantemente agitado para permitir a refrigeração homogênea e impedir que o leite congele.

A Instrução Normativa 51, publicada em 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), prevê a refrigeração do leite a temperatura máxima de 4°C em tanques de expansão ou 7°C, em tanques de imersão, num período não superior a 3 horas após o término da ordenha. A permanência do leite nas propriedades poderá ser de, no máximo, 48 horas, sendo o mesmo coletado em caminhões providos de tanques isotérmicos que coletam o leite refrigerado e o encaminham aos estabelecimentos industriais para o processamento (BRASIL, 2002).

A refrigeração do leite na propriedade e o transporte a granel são medidas cuja implantação visa melhorar a qualidade microbiológica do leite produzido no país com relação às bactérias mesófilas. Entretanto, temperaturas na faixa de refrigeração selecionam a microbiota psicotrófica que, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento, multiplica-se bem a estas temperaturas (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006).

As bactérias psicotróficas, apresentam crescimento lento, mas produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e/ou proteases) que resistem ao processo de pasteurização, até mesmo do processo UHT (*Ultra High Temperature*), e que podem causar alterações sensoriais nos derivados lácteos (SILVEIRA et al., 1998; ALFENAS, 1999).

As proteases produzidas pelas bactérias psicotróficas em leite destinado a fabricação de queijos pode causar queda no rendimento nos queijos e liberar peptídeos de baixo peso molecular que podem causar gosto amargo nestes queijos (FURTADO, 2005). Em leite UHT provocam um aumento no índice de consistência e na viscosidade (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do sistema de estocagem do leite refrigerado (tanque de expansão e de imersão) na propriedade rural sobre a qualidade do leite *in natura* com relação à incidência de bactérias mesófilas, psicotróficas e psicotróficas proteolíticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram efetuadas coletas amostras de leite *in natura* em dez propriedades leiteiras localizadas na região Oeste do Paraná, no período de agosto de 2007 e junho de 2008, sendo cinco propriedades com resfriamento de leite em tanque de expansão e outras cinco com tanque de imersão em água fria. No total, foram coletadas 59 amostras de leite *in natura*, sendo 30 provenientes de tanques de expansão e 29 amostras de tanques de imersão.

Todas as amostras, independentemente do sistema de estocagem, estavam refrigeradas a 7°C e o tempo de armazenamento foi de 48h.

As amostras foram coletadas diretamente na boca dos tanques de expansão e nos latões imersos nos tanques de imersão por meio de um copo coletor de aço inoxidável, previamente flambado e logo acondicionadas isotermicamente até o momento da análise. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina.

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis foi realizada por plaqueamento em profundidade "pour plate" em PCA incubado a 35-37°C por 48h segundo os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água do MAPA, publicados na Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

A contagem de microrganismos psicotróficos foi executada por plaqueamento em superfície "spread plate" em PCA incubado a 21 °C por 25h de acordo com Silva et al. (1997) e a avaliação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a técnica desenvolvida por Santana (2001). Para tanto, foram selecionadas as placas com contagens de microrganismos psicotróficos entre 10 e 100 UFC/placa. Utilizado um carimbo de madeira recoberta com veludo estéril, estas colônias foram transferidas para placas contendo ágar leite a 10%. As placas foram incubadas a 21°C por 72h e as colônias que apresentaram halo de proteólise foram quantificadas.

Os resultados obtidos foram tabulados e os dados submetidos à análise de variância e comparação entre médias (Teste de Tukey), com 95% de confiabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e desvio padrão das contagens de mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos das amostras de leite *in natura* estocadas em tanques de imersão e de expansão estão representados na Tabela 1.

Analisando os dados pelo Teste-T, pôde-se observar que a média de contagens de mesófilos das amostras de leite coletadas em tanque de expansão foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) quando comparadas com amostras coletadas em tanques de imersão.

A refrigeração do leite em tanques de imersão é, geralmente, mais lenta que nos tanques de expansão (VEISSEYRE, 1988), fato que pode ter favorecido a multiplicação de mesófilos.

A fase lag e o tempo de geração dos microrganismos psicotróficos são longos, e, portanto, podem ter contribuído para que não fosse detectada diferença significativa entre o leite armazenado em tanque de imersão e expansão (SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes aos relatados por Arcuri et al. (2006), que encontraram amostras variando de 3,62 a 6,62 log UFC/ml de bactérias mesófilas em leite refrigerado em tanque de expansão de produtores das regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Estado do Rio de Janeiro.

Pinto et al. (2006) obtiveram amostras variando de 2,30 e 7,00 log UFC/ml de bactérias psicotróficas em tanques individuais de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira. A média de psicotróficos proteolíticos foi de 3,62 log UFC/ml. Os autores concluíram que as condições higiênicas de produção e de armazenamento, de transporte e de refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não estão adequadas para minimizar a contaminação microbiana e a multiplicação de bactérias psi-crotróficas.

A água residual de lavagem nos latões e tanques de expansão é considerada a principal fonte de contaminação do leite por microrganismos mesófilos e psicotróficos (SANTANA et al., 2001).

Arcuri et al. (2008) relataram contagens maiores de bactérias psicotróficas em leite estocado em tanques comunitários do que no leite estocado em tanques individuais, indicando que a mistura de matéria-prima de diversos produtores compromete a qualidade do produto.

Estudos revelam que a refrigeração por si só, mesmo que adequadamente, não é suficiente para manter a qualidade do leite, sendo cuidados relacionados à higiene da ordenha fundamentais para a boa qualidade microbiológica do produto (OLIVEIRA et al., 1999; SANTANA et al., 2001; SERRA, 2004).

Os dados apresentados na Tabela 1 evidenciam que o leite estocado em tanques de imersão apresentou contagens mais elevadas nos três grupos microbianos estudados, embora o efeito não tenha sido observado estatisticamente para os psicotróficos e os proteolíticos, evidenciando que esse tipo de tanque tem baixa eficiência no controle da multiplicação da microbiota do leite.

Em julho de 2008 entraram em vigor os novos padrões microbiológicos para o leite cru (BRASIL, 2002) que estabelece limites aceitáveis de mesófilos de no máximo $7,5 \times 10^5$ UFC/mL. Assim, tomando-se como referência esses novos padrões, foi verificado que 60% das amostras colhidas estão fora dos padrões exigidos, sendo 80% delas provenientes de produtores que utilizam tanque de imersão e 40% que utilizam tanque de expansão (Figura 1).

De acordo com Nero et al. (2005) que realizaram um estudo para verificar se o leite *in natura* produzido em quatro estados produtores (MG, RS, PR, SP) de leite no Brasil estaria em condições de cumprir o estabelecido na Instrução Normativa 51 (IN51), especialmente quanto ao atendimento dos padrões microbiológicos, 48,6% das amostras apresentaram contagens acima do determinado na IN51, ou seja, 10^6 UFC/g.

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as contagens de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e a atividade proteolítica em amostras de leite *in natura* de cinco produtores que utilizam tanques de imersão e expansão na propriedade rural. Observa-se que as amostras de leite *in natura* dos tanques de imersão apresentam elevados percentuais (77,2 a 95,9%) de psicotróficos com atividade proteolítica.

Tabela 1 – Média e desvio padrão das contagens (Log UFC/ml) de mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em amostras de leite *in natura* coletadas em tanques de imersão e expansão na região Oeste do Paraná

Mesófilos		Psicotróficos		Psicotróficos Proteolíticos	
Imersão	Expansão	Imersão	Expansão	Imersão	Expansão
6,04 ^a ±0,71	4,97 ^b ±0,77	5,84 ^c ±1,27	5,33 ^c ±0,95	5,21 ^d ±0,80	4,85 ^d ±0,95

Letras diferentes na mesma linha e para o mesmo grupo de microrganismo indicam diferença estatística (pd^{**}0,05).

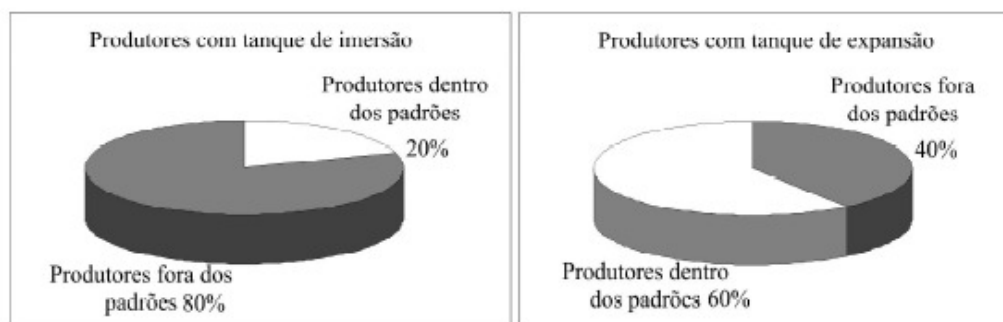


Figura 1 – Produtores de leite da região Oeste do Paraná que utilizam tanques de imersão e de expansão, quando comparados com os padrões da Instrução Normativa 62

Algumas linhagens de bactérias psicotróficas apresentam maior capacidade proteolítica do que outras (NÖRNBERG et al., 2009), e algumas apresentam atividade proteolítica em distintas faixas de temperatura (SILVA, 2005). Estes fatores podem explicar as diferenças encontradas no percentual de culturas com atividade proteolítica nos cinco produtores avaliados.

Pelos dados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3 evidencia-se que somente a refrigeração do leite não é suficiente para controlar a multiplicação de microrganismos psicotróficos. Considerando que a maioria dos psicotróficos é, de fato, mesófilos que alteram seu metabolismo como forma de adaptação às condições extrínsecas do ambiente (JAY, 2005) é extremamente importante que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para diminuir a contaminação inicial e, desta forma, a redução da temperatura pode manter a contagem microbiana em níveis baixos (FAGUNDES et al., 2006).

O resfriamento do leite na propriedade rural, a coleta e transporte do produto a granel trouxeram uma série de vantagens à indústria de beneficiamento, como redução do custo do frete, diminuição do tempo de transporte do leite e diminuição de perdas com relação à acidificação por mesófilos. No entanto, o resfriamento não cessa totalmente a multiplicação microbiana, principalmente de psicotróficos e não garante a qualidade do leite caso não sejam observados os cuidados higiênicos durante a ordenha e manipulação do mesmo.

4 CONCLUSÕES

Neste estudo, o resfriamento do leite *in natura* em tanques de expansão mostrou-se mais eficiente no controle da multiplicação de microrganismos mesófilos quando comparado ao tanque de imersão, fato que não foi observado estatisticamente com

relação aos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos. No entanto, para todos os produtores avaliados, a incidência destes microrganismos pode ser considerada alta.

SUMMARY

Raw milk on-farm refrigeration aims to increase the storage period, decreasing the costs of transport and acidification losses caused by mesophilic microorganisms, however it can allow the development of heat-resistant enzymes producers psychrotrophic microorganisms that cause several defects on dairy products. The present study goals to evaluate the effect on raw milk quality after storage in expansion or immersion tanks regarding to mesophilic, psychrotrophic and proteolytic psychrotrophic microorganisms. Were evaluated ten dairy farms, five of them with immersion system and other five with expansion system. The average of mesophilic in immersion tanks (6.04 ± 0.71 log UFC/ml) were significantly higher comparing to expansion tanks (4.97 ± 0.77 log UFC/ml), indicating that the immersion refrigeration didn't appear been efficient on those microorganism control. 60% of samples were in disagree to the IN51 standards, been 80% of them from farms with immersion tanks and 40% from expansion tanks. No significant difference between the systems were shown for psychrotrophic and proteolytic psychrotrophic. Samples of both systems presented high percentage (77.2 to 96.9%) of psychrotrophic colonies with proteolytic activity. The milk refrigeration in expansion tanks showed to be more efficient in controlling mesophilic microorganisms than samples cooled in immersion tanks, whereas the same result couldn't be statistically proved on psychrotrophic microorganisms.

Index terms: mesophilic; psychrotrophic; proteolytic; refrigeration

Tabela 2 – Contagens (média) de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e atividade proteolítica (%) em amostras de leite *in natura* de cinco produtores que utilizavam o tanque de imersão na propriedade rural.

Grupo de microrganismos	Tanque de imersão em banho de água fria (Log UFC/mL)				
	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Produtor 5
Psicotróficos	5,66	4,89	5,45	6,35	6,55
Proteolíticos	5,43	4,44	5,25	5,76	5,06
Atividade Proteolítica (%)	95,9	90,7	96,3	90,7	77,2

Tabela 3 – Contagens (média) de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e atividade proteolítica (%) em amostras de leite *in natura* de cinco produtores que utilizavam o tanque de expansão na propriedade rural.

Grupo de microrganismos	Tanque de expansão direta (Log UFC/mL)				
	Produtor 1	Produtor 2	Produtor 3	Produtor 4	Produtor 5
Psicotróficos	4,49	5,53	4,86	5,96	5,56
Proteolíticos	3,97	5,39	4,53	4,86	5,26
Atividade Proteolítica (%)	88,4	96,9	93,2	81,5	94,6

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, R.C.G. Termorresistência de bactéria psicrotrófica produtora de ácido isolada de leite. *Archives of Latinoamerican of Nutrition* v.49, n.1, p.72-5, 1999.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Instrução Normativa 62*, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Instrução Normativa 51*, Brasília, DF, 2002.
- FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, C.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.2, p.568-572, 2006.
- FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 1999. p.13-14.
- JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- NASCIMENTO, M.S.; SOUZA, P.A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicrotróficos e a prova de redutase em leite cru refrigerado. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.16, n.97, p.81-86, 2002.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas v.51, n.1, p.191-195, 2005.
- NÖRNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientia Veterinária*, Porto Alegre, v.37, n.2, p.157-163, 2009.
- OLIVEIRA, C.A.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.13, p.10-16, 1999.
- PINTO, C.J.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.27, n.2, p.422-430, 2007.
- SANTANA, E.H.W. *Contaminação do leite por microorganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira*, 2001. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microorganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, 2001.
- SERRA, M.J.B. *Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardiño*, SP. 2004. 37p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997.
- SILVA, P.D.L. *Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicrotróficas presente no leite cru refrigerado*. 2005. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de microorganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.12, n.55, p.21-27, 1998.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends of Food Science and Technology*, Norwich, v.8, p.35-41, 1997.
- ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R., STUMPF JR., W.; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; PAULO RICARDO GARCIA MARTINS, P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.41, n.1, p.153-159, 2006.
- VEISSEYRE, R. *Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Zaragoza: Editorial Acribia. 629 p. 1988.
- VIDAL-MARTINS, A.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microorganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.57, n.3, p. 396-400, 2005.