



Universidade Norte do Paraná

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

PAULO ROBERTO BIGNARDI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E DE
BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS DO LEITE DE VACAS
HOLANDESAS E GIROLANDAS**

Londrina
2010

PAULO ROBERTO BIGNARDI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DO LEITE DE VACAS
HOLANDESAS E GIROLANDAS**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Profª Drª Marcela de Rezende Costa

Londrina
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação**

Bignardi, Paulo Roberto.
B492a Avaliação do perfil físico-químico e de bactérias psicrotróficas do leite de vacas holandesas e girolandas / Paulo Roberto Bignardi. Londrina: [s.n], 2010.
viii; 62p.
Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite.
Universidade Norte do Paraná.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Marcela Rezende Costa
1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR
2- Leite cru 3- Raças bovinas 4- Composição físico-química 5- Bactérias psicrotróficas I- Costa, Marcela Rezende, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.136

PAULO ROBERTO BIGNARDI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DO LEITE DE VACAS
HOLANDESAS E GIROLANDAS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, sendo o aluno considerado APROVADO, de acordo com a Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Marcela de Rezende Costa
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Elsa Helena Walter de Santana
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Kátia Sivieri
Universidade Estadual Paulista

Dedico tudo a Deus, pois sem
o mesmo, tudo não existiria.

AGRADECIMENTOS

À Gabriela por me inspirar todos os dias.

À Dr^a Marcela por nortear os rumos deste trabalho.

À Dr^a Lina, Dr^a Kátia e Dr^a Regina pela preciosa contribuição.

À Aline pela amizade e toda ajuda.

Ao Jorge Donato pela valiosa cooperação e por me ensinar com sua enorme disposição.

Aos alunos Larissa, Géssica, Pedro e Éverlan pela ajuda.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Você olha para o que existe e se pergunta, por quê? Eu olho para o que não existe e pergunto, por que não?"

Bernard Shaw

BIGNARDI, Paulo Roberto. **Avaliação do perfil físico-químico e de bactérias psicotróficas do leite de vacas holandesas e girolandas**. 2010. 62p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

RESUMO GERAL

A raça é um importante fator que influencia a composição do leite e, conseqüentemente, seu aproveitamento pela indústria. A qualidade do leite também está ligada a sua microbiota. Leite cru com longo tempo de refrigeração pode ter um predomínio de bactérias psicotróficas que, em sua maioria, produzem proteases e lipases termorresistentes, que podem comprometer a qualidade dos produtos lácteos. O objetivo desse estudo foi avaliar os perfis físico-químico (pH, acidez, composição química, capacidade de coagulação) e de bactérias psicotróficas do leite cru das raças bovinas holandesa e Girolando. De cada raça foram analisadas 30 amostras de leite cru para avaliar o perfil físico-químico e 16 amostras para determinar o perfil de bactérias psicotróficas. As amostras de leite foram coletadas após a ordenha completa de animais que estavam entre o 3º e 4º mês de lactação. O leite dos animais da raça Girolando apresentou um maior teor de gordura e um menor tempo de coagulação ($p < 0,05$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as raças para pH, acidez e teores de sólidos totais, de proteína total, de proteína verdadeira, de caseína e de lactose. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no perfil de bactérias psicotróficas entre as raças. A contagem média dessas bactérias foi de $3,8 \times 10^4$ UFC/mL. Bactérias psicotróficas proteolíticas foram isoladas em 53% das amostras. O psicotrófico encontrado com maior freqüência foi a *Pseudomonas fluorescens* (83%). O leite de bovinos Girolando pode ser mais vantajoso para a indústria leiteira, pelo menor tempo de coagulação e, principalmente, maior teor de gordura.

Palavras-chave: leite cru; raças bovinas; composição físico-química; bactérias psicotróficas.

BIGNARDI, Paulo Roberto. **Evaluation of physicochemical and psychrotrophic bacteria profiles of Holstein and Girolando cows milk**. 2010. 62p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

GENERAL ABSTRACT

Breed is an important factor that influences the composition of milk and, therefore, its use by the industry. The quality of milk is also associated to its microbiota. Raw milk with long refrigeration time may have predominance of psychrotrophic bacteria most of which can produce heat resistant proteases and lipases that can compromise the dairy products quality. The aim of this study was to evaluate the physicochemical (pH, acidity, chemical composition and coagulation time) and psychrotrophic bacteria raw milk profiles of holstein and Girolando cow breeds. From each breed, 30 samples of raw milk were analyzed to evaluate the physicochemical profile and 16 samples to determine the psychrotrophic bacteria profile. Samples were collected after complete milking of cows between the 3rd and 4th months of lactation. The milk of Girolando animals had higher fat content and shorter clotting time ($p < 0.05$). There was no significant difference ($p > 0.05$) between the breeds on pH, acidity and total solids, total protein, true protein, casein and lactose contents. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the breeds on their psychrotrophic bacteria profile. Average psychrotrophic bacteria count was 3.8×10^4 CFU/mL. Psychrotrophic proteolytic bacteria were isolated in 53% of the samples. The psychrotrophic found more frequently was *Pseudomonas fluorescens* (83%). Bovine milk of Girolando may be more advantageous for the dairy industry, because of its shorter clotting time and, mainly, higher fat content.

Keywords: raw milk; bovine breeds; physicochemical composition; psychrotrophic bacteria.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos.....	15
CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS DO LEITE BOVINO	16
1 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Leite bovino.....	16
1.2 Fatores que influenciam a composição do leite bovino.....	18
1.3 Raças bovinas leiteiras	20
1.3.1 Raça Holandesa.....	21
1.3.2 Raça Girolando	22
1.4 Microbiologia do leite cru	23
1.4.1 Fatores que influenciam a qualidade microbiológica do leite	24
1.4.2 Microrganismos psicrotróficos do leite	26
1.5 Alterações no leite provocadas por enzimas.....	28
2 REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DO LEITE CRU DE VACAS HOLANDESAS E GIROLANDAS	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Amostragem.....	38
2.2 Análises físico-químicas	38
2.3 Análise de dados	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4 CONCLUSÃO	45
5 REFERÊNCIAS	46

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DO LEITE CRU DE VACAS HOLANDESAS E GIROLANDAS	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Amostragem.....	53
2.2 Análises microbiológicas.....	53
2.3 Análise de dados	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4 CONCLUSÃO	59
5 REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. Mudanças na concentração de gordura (■), de proteínas (●) e de lactose (○) do leite bovino ao longo da lactação. 18
- Figura 2. Faixas de concentração de gordura do leite de animais de quatro raças bovinas.20
- Figura 3. Bovinos leiteiros da raça Holandesa..22
- Figura 4. Bovinos leiteiros da raça Girolando.....23

Capítulo 2

- Figura 1. Perfis eletroforéticos das proteínas do leite cru de vacas holandesas e girolandas43

Capítulo 3

- Figura 1. Número total de isolados de bactérias psicotróficas do leite cru de vacas holandesas e girolandas57

1 INTRODUÇÃO GERAL

A composição do leite é um importante parâmetro de sua qualidade. Sua variação é acompanhada da alteração das características sensoriais (cor, gosto, aroma, textura), nutricionais (valor energético) e tecnológicas do leite, ou seja, a alteração da composição do leite afeta sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos seguros, e que mantenham suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante a vida de prateleira (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998; FOX; McSWEENEY, 1998).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a composição e qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de parições e o estado de saúde do animal. Os fatores extrínsecos, por sua vez, incluem o manejo e a higiene da ordenha, a dieta oferecida, a velocidade e temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento (FOX; McSWEENEY, 1998; SANTOS; FONSECA, 2006; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; ALVES et al., 2007)

O desenvolvimento de microrganismos deteriorantes no leite também limita a sua qualidade. O leite contém muitos substratos que propiciam a proliferação microbiana, mesmo no leite refrigerado. O resfriamento do leite cru pode selecionar bactérias psicrófilas, das quais muitas são produtoras de enzimas termorresistentes que podem afetar negativamente os produtos lácteos produzidos a partir desse leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Em geral, a presença de bactérias psicrófilas no leite cru está associada à contaminação vinda da água, do solo, da vegetação, do material de cama, do úbere do animal e de equipamentos de ordenha e armazenamento do leite cru. O tratamento térmico é capaz de eliminar essas bactérias, mas as enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas durante o armazenamento do leite cru podem ser termorresistentes e comprometer a qualidade do leite fluido e dos produtos lácteos (ZALL, 1985; HAYES; BOOR, 2001; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

A fim de melhorar a produtividade dos rebanhos brasileiros, tem-se utilizado o cruzamento de raças zebuínas, como a Gir, que apresentam boa adaptação às condições tropicais, com raças de origem européia, como a Holandesa, especializadas para a produção de leite, dando origem a raça Girolando (FACÓ et al., 2002).

Apesar de serem muitos os estudos que avaliam o efeito da composição genética Holandês-Zebu sobre características produtivas e reprodutivas (FREITAS et al., 2001; FACÓ et al., 2002; BARBOSA et al., 2008; McMANUS et al., 2008), as características qualitativas do leite produzido por esses animais ainda é pouco estudada. Freitas et al. (2001) e Barbosa et al. (2008), analisaram a quantidade de gordura no leite dos animais. Assim, outros aspectos de qualidade do leite ainda precisam ser estudados. Por isso, nesse estudo objetivou-se avaliar comparativamente o leite de vacas holandesas e girolandas, quanto a algumas características do perfil físico-químico e microbiológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar se há associação entre a raça bovina e as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru.

2.2 Específicos

- Avaliar características químicas e tecnológicas do leite cru das raças holandesa e Girolando.
- Determinar o perfil das bactérias psicrotóxicas do leite cru das raças holandesa e Girolando.

CAPÍTULO 1 - CARACTERÍSTICAS DO LEITE BOVINO

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leite bovino

O leite é uma mistura complexa de várias substâncias em água. Estruturalmente é formado por uma suspensão coloidal de pequenas partículas de caseínas e alguns minerais (micelas), uma emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis, e uma solução de lactose, proteínas hidrossolúveis e sais minerais (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Pode ser uma fonte nutricional importante ou servir de matéria-prima na indústria para a fabricação de inúmeros produtos derivados do leite.

As glândulas mamárias secretam o leite como uma mistura de componentes derivados de precursores da alimentação e do metabolismo animal (GONZÁLEZ et al., 2001). Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), os principais constituintes do leite são a água (87,5%), gordura (3,6%), caseína (3,0%), albumina (0,6%), lactose (açúcar) (4,6%) e sais minerais (cinzas) (0,7%).

As proteínas do leite são divididas em caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam cerca de 80% do conteúdo protéico e precipitam quando se acidifica o leite em pH 4,6. Distinguem-se quatro tipos de caseínas conhecidas como frações: α_{S1} -, α_{S2} -, β - e κ -caseínas, que são associadas entre si formando micelas e correspondem ao redor de 41,2%, 10,8%, 36,1% e 11,9% do total de caseínas, respectivamente. As proteínas do soro, as quais somam ao redor de 20% do total de proteínas, permanecem solúveis em pH 4,6. As proteínas do soro compreendem principalmente β -lactoglobulina (50,8%), α -lactoalbumina (19,1%), soroalbumina (6,3%), imunoglobulinas (12,7%) e lactoferrina (1,6%). A proporção entre caseínas e proteínas do soro afeta as características biológicas do leite, mas

também suas características tecnológicas, pois suas diferentes proteínas possuem comportamentos distintos frente aos diversos processos empregados na fabricação dos produtos lácteos (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A gordura está presente na forma de glóbulos, constituídos por um núcleo, composto principalmente de triglicerídeos, protegidos por uma membrana lipoprotéica. A gordura do leite é formada por uma grande variedade de ácidos graxos, sendo que a maioria dos ácidos graxos encontrados, saturados e insaturados, contém de 2 a 20 átomos de carbono em suas cadeias. A proporção entre os diferentes ácidos graxos é afetada por diversos fatores, entre eles a estação do ano, a alimentação e a raça do animal. Essa composição de ácidos graxos influencia o sabor e a textura do leite e derivados, além de afetar sua susceptibilidade à rancidez hidrolítica e oxidativa, e suas características tecnológicas. Outros lipídeos presentes incluem fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A lactose, principal carboidrato do leite, é um dissacarídeo composto por glucose e galactose e participa, juntamente com os íons solúveis (Na^+ , K^+ e Cl^-), da manutenção do equilíbrio entre a pressão osmótica do leite e da glândula mamária. As substâncias minerais do leite são principalmente constituídas por potássio, sódio, cálcio, magnésio, cloro e fosfato, podendo estar solúveis na fase soro, na forma iônica ou complexada, ou associados à micela de caseína, principalmente na forma de fosfato de cálcio (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A propriedade de coagulação do leite (PCL) é uma característica importante e um requerimento básico, por exemplo, para a produção de queijos. As propriedades do leite requeridas para a fabricação de queijos incluem boa reatividade com renina, alta capacidade de formar uma coalhada firme, e boa capacidade de sinérese (De MARCHI et al., 2007). A PCL pode ser afetada por parâmetros físico-químicos, como acidez titulável, contagem de células somáticas, teores de proteína total e caseínas, e de cálcio e fósforo (FORMAGGIONI et al., 2001; SUMMER et al., 2002) e polimorfismo genético das proteínas (CELIK, 2003; WEDHOLM et al., 2006). Além disso, diversos estudos encontraram grande variação

na PCL entre diferentes raças (VERDIER-METZ et al., 1998; WEDHOLM et al., 2006; De MARCHI et al., 2007).

1.2 Fatores que influenciam a composição do leite bovino

Entre os fatores que alteram a composição do leite, o estágio de lactação tem uma influência bastante acentuada na concentração de lactose, gordura e proteínas (Figura 1). Nos primeiros dias após o parto, o colostro tem uma quantidade de proteínas maior que em outros períodos da lactação, além de possuir um perfil protéico diferente, onde a concentração de proteínas do soro se sobressai em relação às caseínas. A lactose tem um decréscimo em sua concentração à medida que o tempo de lactação aumenta; já a gordura e proteínas diminuem nas primeiras 4 a 6 semanas após o parto, porém há um aumento gradativo após este período, especialmente próximo ao final da lactação (FOX; McSWEENEY, 1998).

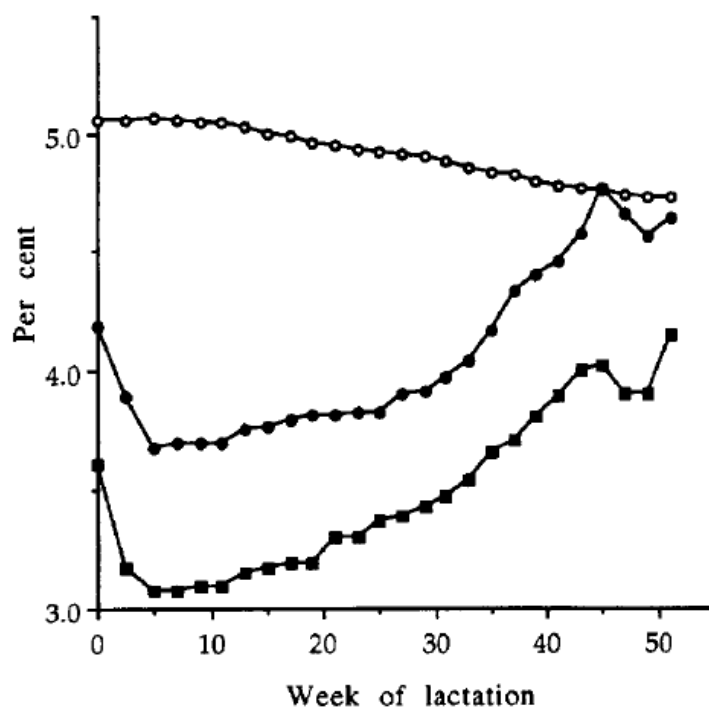


Figura 1. Mudanças na concentração de gordura (■), de proteínas (●) e de lactose (○) do leite bovino ao longo da lactação. Fonte: Fox e McSweeney (1998).

A composição do leite pode também sofrer alterações de acordo com as estações do ano. Em geral, uma maior concentração de gordura no leite acontece em épocas mais frias (FOX; McSWEENEY, 1998) e uma maior concentração de proteínas na primavera (GONZALES et al., 2004).

Já a dieta do animal pode influenciar não somente a composição do leite, aumentando seu valor nutritivo, mas também pode influenciar sua produção (ALVES et al., 2007). A nutrição do animal, que envolve o manejo alimentar e balanceamento das dietas, constitui-se em fatores importantes de mudanças nos teores de gordura e proteína. Santos e Fonseca (2006), citam o consumo de extrato seco, a qualidade e digestibilidade da fibra e a relação de energia e proteína da dieta como os principais fatores nutricionais que afetam a composição do leite. Theurer, Huber, Delgado-Elorduy (1999), relataram que dietas com altos teores de concentrado, ou com fontes de carboidratos mais fermentáveis no rúmen, favorecem a produção de proteína do leite.

Há descrito na literatura, influência na composição e produção de leite pela mastite. O teor de lactose, gordura e caseína sofrem um declínio quando o animal está acometido por esta infecção (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Cunha et al. (2008), encontrou diminuição na produção de leite na presença de mastite subclínica.

Existem outros fatores que podem influenciar a composição do leite como a saúde e idade do animal, variações sazonais e fatores individuais e a raça. Fatores genéticos como diferenças entre espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie, estão associados à variação na composição do leite. Alguns estudos têm identificado genes ligados à síntese de proteínas do leite, e que polimorfismos presentes nestes genes estão associados às diferenças na composição e teor de proteínas, afetando, desta maneira a composição do leite e suas propriedades tecnológicas (GODDARD, 2001).

De acordo com Fox e McSweeney (1998), a raça está associada a mudanças na composição do leite. O teor de gordura é um dos componentes que mais varia entre as raças (Figura 2).

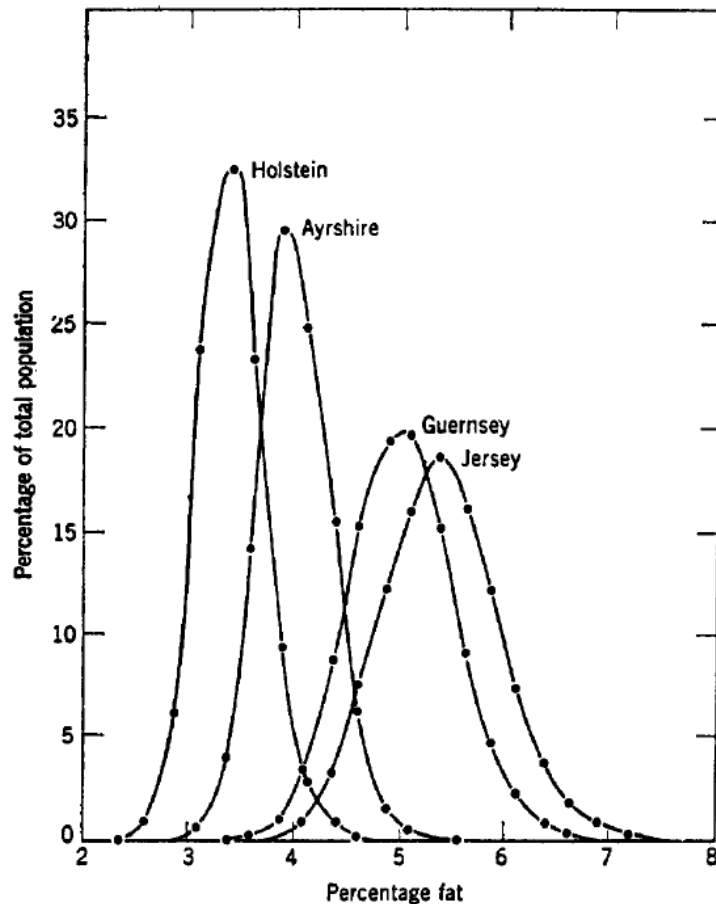


Figura 2. Faixas de concentração de gordura do leite de animais de quatro raças bovinas. Fonte: Fox e McSweeney (1998).

1.3 Raças bovinas leiteiras

As raças mais comumente utilizadas para a produção de leite no mundo são Holandesa preta e branca, Holandesa marrom e branca, Ayrshire, Guernsey e Jersey (McALLISTER, 2002). Esses animais são da espécie gênero *Bos taurus taurus* de alta produção, entretanto, por terem sido selecionados na Europa, estão totalmente adaptados ao clima frio da região (SCHNIER et al., 2003). No Brasil, devido ao clima quente estes animais sofrem um estresse térmico extremamente acentuado (MADALENA, 1998). Visando amenizar o efeito da temperatura no plantel produtor de leite é muito comum a utilização de raças adaptadas ao clima quente.

No Brasil, a maior parte da produção de leite é oriunda da utilização de mestiços zebuínos, com destaque para os resultantes do cruzamento Holandês x Gir (FACÓ et al., 2002), incluindo animais da raça Girolando.

1.3.1 Raça Holandesa

A vaca holandesa é a raça mais difundida no mundo, presente em mais de 50 países, sendo considerado sinônimo de gado leiteiro. O Brasil possui mais de 2 milhões de animais registrados. Possui eficiência produtiva comprovada e resistência às enfermidades, além de uma excelente relação custo x benefício: qualidade e quantidade, sendo a raça matriz para cruzamentos absorventes ou de raças compostas (VALENTE et al., 2001; SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007).

Alguns afirmam que a raça foi domesticada há 2.000 anos nas terras planas e pantanosas da Holanda setentrional e da Alemanha. Eram animais de origem grega, de acordo com ilustrações antigas (VALENTE et al., 2001). No Brasil, não há consenso de uma data de introdução da raça, mas acredita-se que foi trazido ao país, por volta de 1535, período em que o Brasil foi dividido em capitânicas hereditárias (ALBUQUERQUE; COUTO, 2001).

Existem variações entre animais na mesma raça, entretanto, a cor da pelagem quase sempre serve para distinguir animais da mesma raça (VALENTE et al., 2001). De acordo com Durães et al. (2001), há dois tipos de gado Holandês principais, o preto e branco, e vermelho e branco (Figura 3).

Essa raça apresenta ainda as seguintes características: idade para a primeira cobertura de 16 a 18 meses; idade para o primeiro parto de 25 a 27 meses; duração da gestação de 261 dias a 293 dias (média de 280 dias) e intervalo entre partos de 15 a 17 meses (McALLISTER, 2002; SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007). A composição média do leite de vacas da raça holandesa é 3,5% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,5% de lactose e 0,7% de cinzas (BOTARO et al., 2009; RIBAS et al., 2004; TEIXEIRA; FREITAS; BARRA, 2003).



Figura 3. Bovinos leiteiros da raça Holandesa. Fonte: World Holstein Friesian Federation (2010).

1.3.2 Raça Girolando

Essa raça é oriunda do cruzamento do Gir com o Holandês, em que, procurou-se preservar a rusticidade do Gir com a produtividade da raça holandesa. A reprodução dos animais ocorreu rapidamente, mas de forma desordenadamente e atualmente, encontra-se o Girolando em todos os estados do país. Muitos consideram a superioridade do Girolando indiscutível, que além de ter conjugado a rusticidade do Gir e a produção do Holandês, adicionou características desejáveis das duas raças em um único tipo animal, fenotipicamente soberano, com qualidades imprescindíveis para produção leiteira nos trópicos (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007).

Dada a importância dos cruzamentos Holandês x Gir no panorama da produção de leite nacional, o Ministério da Agricultura, juntamente com as Associações representativas, traçaram as normas para a formação da raça Girolando - Gado Leiteiro Tropical (5/8 Holandês + 3/8 Gir) (BRASIL, 1992).

Então, em 1989, a então Assoleite, hoje Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, ganhou abrangência nacional e conseguiu junto ao Ministério da Agricultura delegação para conduzir o programa para formação da raça

bovina Girolando em todo o Brasil. E em 1996, o Ministério da Agricultura oficializou a raça Girolando (Portaria 79 de 01 de fevereiro de 1996) (FACÓ et al., 2002).

É uma raça que não possui suas características totalmente definidas, tendo variações na pelagem, produção e na sua conformação (Figura 4) (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007). O leite de animais da raça Girolando tem composição média de 4,0% de gordura, 3,52% de proteína, 4,8% de lactose, 0,7% de cinzas e 13,02% de sólidos totais (FONSECA; SANTOS, 2000).



Figura 4. Bovinos leiteiros da raça Girolando. Fonte: Girolando Brasil (2010).

1.4 Microbiologia do leite cru

O leite contém muitos nutrientes, servindo de substrato para o desenvolvimento de numerosas espécies bacterianas. Por isso, o leite se deteriora rapidamente a temperatura ambiente (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A microflora bacteriana do leite *in natura* pode variar consideravelmente em número e espécies. O leite contém normalmente bactérias que colonizam o úbere, mas pode haver contaminação provocada pelo homem através dos métodos de criação dos animais e se os padrões de higiene na hora da ordenha não forem seguidos. A qualidade microbiológica também é dependente da saúde do animal (ZALL, 1985).

A maioria dos microrganismos encontrados no leite é classificada como mesófilos, com temperatura ótima de crescimento de 30 a 45 °C. Porém pode se encontrar uma microbiota considerada psicotrófica, ou seja, se desenvolvem em temperaturas de refrigeração (4 a 7 °C), mesmo não sendo sua temperatura ótima de crescimento (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998). Antunes et al. (2002) relataram a presença de microrganismos psicotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura*, os quais em condições de refrigeração, multiplicam-se mais rapidamente do que o restante da microbiota, tornando-se predominante.

A presença de várias espécies de microrganismos no leite cru é indesejável, porque eles podem ser patogênicos, ou porque seu crescimento resulta em transformações indesejáveis no leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Os microrganismos deteriorantes que podem ser encontradas no leite cru incluem principalmente espécies de bactérias ácido-lácticas, como os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Eles crescem rapidamente no leite, especialmente acima de 20 °C, acidificando o leite se mantido sem resfriamento e ocasionando agregação das caseínas. Outra classe de microrganismos deteriorantes do leite é a dos psicotróficos, que inclui os gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes*. Os psicotróficos, apesar de serem mesófilos, podem crescer em temperaturas baixas, até mesmo abaixo de 4 °C. A maioria destes microrganismos produz lipases e proteases que conferem sabores indesejáveis no leite e afetam suas propriedades tecnológicas (CEMPÍRKOVÁ, 2002; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O leite cru é, normalmente, conservado refrigerado antes do processamento, o que torna o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos uma das principais preocupações para a indústria de laticínios atualmente (BRASIL, 2002).

1.4.1 Fatores que influenciam a qualidade microbiológica do leite

As fontes de contaminação bacteriana do leite cru podem ser divididas em três categorias: ambiente, úbere e equipamentos de ordenha. As fontes ambientais incluem água, solo, vegetação e material de cama. Em geral, a

contaminação por psicrotróficos tem sido associada com o material de cama, água não tratada, solo e vegetação. Os procedimentos pré-ordenha, que não contemplem a adequada higienização do úbere e tetos, podem resultar na introdução de vegetação, solo, material de cama e seus microrganismos associados para o leite. Uma limpeza e secagem do úbere, imediatamente antes da ordenha reduzem o número total de bactérias (HAYES; BOOR, 2001).

A contaminação bacteriana de dentro do úbere é frequentemente um resultado de mastite, uma inflamação do úbere, que pode resultar em altos níveis de bactérias sendo transferidas para o leite. Embora a microflora de um úbere saudável possa estar no leite cru, estes microrganismos geralmente não causam aumentos significativos na contagem total de bactérias (ZALL, 1985; HAYES; BOOR, 2001).

As fontes de contaminação mais comuns associadas com equipamento de ordenha incluem máquinas de ordenha, tubulações de leite, tanques de expansão e tanques de transporte. Uma higienização ineficaz destes equipamentos podem deixar resíduos de leite e proporcionar um excelente ambiente para o crescimento microbiano. As bactérias se multiplicam nesse resíduo e podem contaminar o leite que passa pelo equipamento (HAYES; BOOR, 2001).

Longos períodos de resfriamento do leite cru, antes do tratamento térmico, podem levar a um aumento exponencial das bactérias psicrotróficas, que são eliminadas com a pasteurização ou esterilização, porém suas enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes permanecem ativas no leite e produtos derivados desse leite (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Existem ainda no leite sistemas antimicrobianos naturais, que conferem proteção as glândulas mamárias contra infecções e contra a proliferação bacteriana descontrolada no leite. Este sistema é composto por células polimorfonucleares, que fagocitam as bactérias, além de imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase (COUSINS; BRAMLEY, 1985). Tem sido bastante estudado o polimorfismo genético entre raças bovinas de proteínas como a k-caseína, a β -lactoglobulina (BOTARO et al., 2007; BOTARO et al. 2009), pelo interesse tecnológico que envolve essas moléculas. Mas pouco se sabe ainda sobre possíveis variações na concentração, atividade e polimorfismos de compostos como a lactoferrina, a lactoperoxidase e as imunoglobulinas. Por isso, a raça pode ser um fator relevante no que diz respeito ao perfil microbiológico do leite cru.

1.4.2 Microrganismos psicrotróficos do leite

Os microrganismos psicrotróficos não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos. Em leite e produtos derivados compreendem aproximadamente 15 gêneros diferentes (SUHREN, 1989). Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Dentre as bactérias Gram-negativas encontram-se *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp, já entre as bactérias Gram-positivas estão *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicrotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite (SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Uma importante característica dos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos (MUIR, 1996; BRANDÃO, 2000; CUNHA; SANTOS; FONSECA, 2003).

De acordo com Sorhaug e Stepaniak (1997), um dos principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria-prima mantida a 7 °C ou menos por períodos prolongados, é a multiplicação da microbiota psicrotrófica contaminante, produtora de proteases termoestáveis. A inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termorresistência (ZALL; CHAN, 1981).

O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicrotróficos, representa aproximadamente 10% da microbiota do leite recém-ordenhado (MUIR, 1996), sendo que sob condições de refrigeração este gênero se sobressai rapidamente na microbiota tanto do leite cru como do leite pasteurizado (SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Este gênero é representado por espécies que

apresentam curtos tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7 °C (4-12 horas) e uma temperatura mínima de crescimento de até -10 °C (MUIR, 1996).

Há muitos anos se estuda as enzimas microbianas no leite, Adams, Barach e Speck (1976) estudaram a resistência térmica de proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas*. A destruição de 90% das proteases pode ser atingida a 72 °C por 4 a 5 horas, tratamento considerado altamente prejudicial ao leite. Griffiths, Philips e Muir (1981), isolando bactérias psicrófilas de produtos de laticínios, observaram a resistência térmica de suas proteases e lipases ao tratamento de 77 °C por 17 segundos e 140 °C por 5 segundos.

Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelificação do leite longa vida (COUSIN, 1982; KOHLMANN *et al.*, 1991; MUIR, 1996).

Pseudomonas ssp. são grandes contribuidores para a contaminação de leite cru e pasteurizado, pois tem sido associado ao ambiente (água e vegetação) e equipamentos. Este microrganismo pode prejudicar a qualidade do leite por dois caminhos: (1) eles produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas no leite cru durante a estocagem e muitas destas enzimas podem resistir a temperaturas de pasteurização (72 °C/15 s) ou UHT (*Ultra High Temperature*) (138 °C/2 s ou 149 °C/10 s); e (2) podem contaminar o leite após o tratamento térmico (MUIR, 1996).

As espécies de *Pseudomonas* mais comumente isoladas em leite são *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. putrefaciens*, e menos frequentemente *P. aeruginosa* (HAYES; BOOR, 2001). Muitos estudos têm encontrado a *P. fluorescens* com maior frequência; sua capacidade de formar biofilmes em equipamentos e utensílios, além da multiplicação em temperaturas de refrigeração, são fatores que podem justificar esse predomínio (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; HOLM *et al.*, 2004; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; ARCURI *et al.*, 2008).

1.5 Alterações no leite provocadas por enzimas

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

Segundo Lorenzetti (2006) há vários tipos de proteases presentes no leite bovino, algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal, sendo que, a concentração destas enzimas depende da raça do animal, da alimentação, do estágio da lactação e de doenças como a mastite. As principais proteases endógenas do leite são plasmina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas de leucócitos (células somáticas).

A ação das proteases bacterianas, originárias, em sua maioria, pelas bactérias psicotróficas presentes no leite cru está relacionada com a hidrólise das caseínas, principalmente κ -caseína e β -caseína (ORDÓÑEZ, 2005). A maior parte das enzimas proteolíticas microbianas são termorresistentes e, conseqüentemente, podem continuar atuando lentamente sobre as proteínas durante o armazenamento do leite longa vida (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996). Isso pode provocar a geleificação desse leite, diminuindo sua vida de prateleira. Outros defeitos provocados por estas enzimas incluem alteração de sabor e odor no leite e diversos produtos derivados, além de prejuízo na firmeza do coágulo na fabricação de queijos, diminuindo seu rendimento (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

2 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 823-827, 1976.

ALBUQUERQUE, L. C.; COUTO, M. A. C. L. **Raça Holandesa**. Minas Gerais, 2001. Disponível em: <www.cienciadoleite.com.br>. Acesso em: 29 nov. 2010.

ALVES, A. C. N.; MATTOS, W. R. S.; SANTOS, F. A. P.; LIMA, M. L. P.; PAZ, C. C. P.; PEDROSO, A. M. Substituição parcial de silagem de milho por farelo de glúten de milho desidratado na alimentação de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 590-1596, 2007.

ANTUNES, V. C. ; SIQUEIRA JUNIOR, W. M. ; VALENTE, P. P. ; BARROS, A. P. ; CONDE, C. B. C. ; ROSA, R. ; BERTOLDI, M. C. ; SARAIVA, C. ; FERREIRA, C. L. L. F. Contagem total de microrganismos mesófilos e de psicotróficos no leite cru e pasteurizado, transportado via latão ou granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p.198-201, 2002.

ARCURI, E. F. SILVA, P.D; BRITO, M. A. V. P; BRITO, R. F. B.; LANGE, C. C; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p. 2250-2255, 2008.

BARBOSA, S. B. P; SEVERINO, B. P.; RAMALHO, R. P.; MONARDES, H. G.; DIAS, F. M.; SANTOS, D. C.; BATISTA, A. M. V. Milk and fat production of crossbred Holstein-Gir cows (*Bos Taurus taurus*-*Bos taurus indicus*) in the Agreste region of the Brazilian state of Pernambuco. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 468-474, 2008.

BOTARO, B. G; LIMA, Y. V. R.; CORTINHAS, C. S.; SILVA, L. F. P.; RENNÓ, F. P.; SANTOS, M. V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2447-2454, 2009.

BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 51 de 18 de setembro de 2002. 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**, Brasília, 2002.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Agropecuária – Coordenação de Produção Animal. **Normas para formação da raça Girolando**. Brasília, DF: 1992. 31p.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. **Internation Dairy Journal**, v. 7, n. 2-3, p. 129-140, 1996.

CELIK, S. β -Lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 727-731, 2003.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinaty Medicine Czech**, v. 47. p. 227-233, 2002.

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

COUSIN, M. A. Presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland dairy products. **The Australian Journal of Dairy Techonology**. v. 37, p. 147, 1982.

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology: the microbiology of milk**, V. 1, Cap. 4. London: Elsevier Applied Science Publishers. 1985

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotróficas. **Indústria de laticínios**, v. 1, Jul/ago, p. 71-73, 2000.

DE MARCHI, M.; DAL ZOTTO, R.; CASSANDRO, M.; BITTANTE, G. Milk coagulation ability of five dairy cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3986-3992, 2007.

DURÃES, M. C.; VALENTE, J.; FREITAS, A. F.; TEIXEIRA, N. M.; BARRA, R. B. Diferenças entre produções de leite e de gordura de vacas PC e PO de raça Holandesa no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.701-707, 2001.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000.

FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R.; MOURA, A. A. A. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 1944-1952, 2002.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FORMAGGIONI, R; MALACARNE, M.; SUMMER, A.; FOSSA, E.; MARIANI, P. Milk with abnormal acidity. The role of phosphorus content and the rennet-coagulation properties of Italian Friesian herd milk. **Annali della Facolta di Medicina Veterinaria**, v. 21, p. 261–268, 2001.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional. 1998.

FREITAS, M. S.; DURÃES, M. C.; FREITAS, A. F.; BARRA, R. B. Comparação da produção de leite e de gordura e da duração da lactação entre cinco “graus de sangue” originados de cruzamentos entre Holandês e Gir em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p.708-713, 2001.

GIROLANDO BRASIL. Disponível em: <<http://www.Girolandobrasil.com.br>>. Acesso em: 31 nov. 2010.

GODDARD, M. Genetics to improve milk quality. **Australian Journal of Dairy Technology**. Sidney, v.56, n.2, p.166-170, 2001.

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

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289-303, 1981.

GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; GOMES, J. F.; STUMPF JR, W.; SILVA, M. A. Avaliação da qualidade do leite nos diferentes meses do ano na bacia leiteira de Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, 2004 .

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteras**. 2001. 77 f. Biblioteca Setorial da UFRGS, Porto Alegre, 2001. Disponível em: <http://rho.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografias/soraia/anais.pdf>. Acesso em: 07 out. 2010.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw Milk and Fluid Milk Products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2ed. New York: Marcel Decker. 2001.

HOLM, L. J.; JEPSEN, L.; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1151-1157, 2004.

HOLSTEIN FRIESIAN FEDERATION. Disponível em: <<http://www.whff.info>>. Acesso em: 31 nov. 2010.

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

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos no leite cru de dois estados da região sul**. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Curitiba, 2006.

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 49, p. 24-32, 1996.

MADALENA, F.E. Lucrando com os cruzamentos: a expansão do F1. In: Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2, 1998, Uberaba. **Anais...** Uberaba, 1998. p.121-126.

McALLISTER, A.J. Is crossbreeding the answer to questions of dairy breed utilization? **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2352-2357, 2002.

MCMANUS, C.; TEIXEIRA, R. A.; DIAS, L. T.; LOUVANDINI, H.; OLIVEIRA, E. M. B Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas e mestiças Holandês x Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p.819-823, 2008.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artimed, 2005.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p.645-651, 2006.

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

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314p.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. **Produção de Bovinos – tipo leite**. Vitória: UFES. Boletim técnico. 2007.

SCHNIER, C.; HIELM, S.; SALONIEMI, H.S. Comparison of milk production of dairy cows kept in cold and warm loose-housing systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, n. 4, p. 295-307, 2003.

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

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

SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARTUZZI, F.; MARIANI, P. Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production. **Annali della Facolta di Medicina Veterinaria**, v. 22, p. 163–174, 2002.

THEURER, C. B.; HUBER, J. T.; DELGADO-ELORDUY, A. Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n.9, p.1950-1959. 1999.

VALENTE, J.; DURÃES, M. C.; MARTINEZ, M. L.; TEIXEIRA, N. M. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de leite, 2001.

VERDIER-METZ, I.; COULON, J. B.; PRADEL, P.; VIALLO, C.; BERDAGUÉ, J. L. Effect of forage conservation (hay or silage) and cow breed on the coagulation properties of milks and on the characteristics of ripened cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 9-21, 1998.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2ed, Boca Raton: CRC Press. 2006.

WEDHOLM, A. LARSEN, L.B.; LINDMARK-MANSSON, H.; KARLSSON, A. H.; ANDRÉN, A. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3296-3305, 2006.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 7, p. 1540-1544, 1981.

ZALL, R. R. Control and destruction of micro-organisms. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology: the microbiology of milk**. v. 1, cap. 3. London: Elsevier Applied Science Publishers. 1985.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DO LEITE CRU DE VACAS HOLANDESAS E GIROLANDAS

RESUMO

A raça é um importante fator que influencia a composição do leite, o que pode afetar a qualidade dos produtos lácteos e a produtividade das indústrias. Este estudo teve como objetivo avaliar as características físico-químicas do leite de bovinos das raças Girolando e holandesa. Foram coletadas 30 amostras de leite cru de cada raça após a ordenha completa dos animais, que estavam entre o 3º e 4º mês de lactação. Foram avaliados pH, acidez, composição química, perfil protéico e capacidade de coagulação. O leite dos animais da raça Girolando apresentou um maior teor de gordura ($p < 0,05$) e um menor tempo de coagulação ($p < 0,05$). Não foi encontrada diferença significativa entre as raças para pH, acidez, perfil protéico e teores de sólidos totais, de proteína total, de proteína verdadeira, de caseína e de lactose. Pelas características apresentadas, o leite do Girolando parece ser uma opção vantajosa para a indústria leiteira na fabricação de queijos, creme de leite e manteiga em relação ao leite de animais holandeses.

Palavras-chave: raças bovinas; análises físico-químicas; propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

Breed is an important factor that influences the composition of milk, what can affect dairy products quality and industry productivity. This study aimed to evaluate the physicochemical characteristics of bovine milk from Girolando and Holstein breeds. From each breed, 30 samples of raw milk were collected after the complete milking of the animals, which were between 3rd and 4th month of lactation. Acidity, pH, chemical composition, protein profile and clotting capacity were evaluated. The Girolando's milk had higher fat content and shorter clotting time ($p < 0.05$). There was no significant difference between races for pH, acidity, protein profile and total solids, total protein, true protein, casein and lactose contents. Therefore, milk of the Girolando could be more advantageous than the Holstein's milk to the dairy industry for manufacture of cheese, cream and butter.

Keywords: bovine breeds; physicochemical analyses; technological properties.

1 INTRODUÇÃO

A composição é um dos principais parâmetros que determina a qualidade do leite. Sua variação é acompanhada de alterações sensoriais, nutricionais e tecnológicas do leite. Além disso, mudanças na composição do leite afetam sua utilização como matéria-prima para a fabricação de produtos lácteos (FOX; McSWEENEY, 1998).

Há uma crescente demanda por produtos lácteos de alta qualidade, levando a uma tendência progressiva de adaptação, por parte da indústria leiteira, a essas exigências do mercado consumidor. Países como a França, Austrália, Nova Zelândia e Canadá desde a década de 80 já remuneram o produtor pelo teor de gordura e proteína (WILLIAMS; JACHNIK, 1991). No Brasil, a remuneração extra ao produtor de leite por teores mais elevados de gordura e proteína já ocorre em algumas indústrias, principalmente a partir dos critérios de qualidade propostos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002). Além disso, torna-se importante a análise de leite individual para monitorar sua qualidade e identificar problemas, a fim de auxiliar os programas de melhoramento genético (visando à seleção de animais que produzam mais sólidos), manejo nutricional e controle e prevenção de mastite.

A composição físico-química do leite pode variar segundo fatores como a individualidade, dieta do animal, estágio de lactação, o número de parições, idade, estação do ano e processos patológicos (mastite) (WEISS et al., 2002; CUNHA, 2008). Outros fatores como o polimorfismo genético das proteínas do leite, variação sazonais (TEIXERIA et al., 2003) e a raça dos animais (AULDIST et al., 1998; ARUNVIPAS; DOHOO; VANLEEUEWEN, 2003) também estão associados a mudanças na composição do leite.

Na tentativa de melhorar a produtividade, tem-se utilizado o cruzamento de raças zebuínas, como a Gir, que apresentam boa adaptação às condições tropicais, com raças de origem européia, como a Holandesa, especializadas para a produção de leite. No Brasil, a maior parte da produção de leite é oriunda da utilização de mestiços zebuínos, com destaque para os resultantes do cruzamento Holandês x Gir, incluindo o Girolando (FACÓ et al., 2002).

Dada à importância deste tipo racial no panorama da produção de leite nacional, em 1989, o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1992), traçaram as normas para a formação da raça Girolando - Gado Leiteiro Tropical (5/8 Holandês + 3/8 Gir-bi-Mestiço). E em 1996, o Ministério da Agricultura oficializou a raça Girolando (FACÓ et al., 2002). Apesar de serem muitos os estudos que avaliam o efeito da composição genética Holandês-Zebu sobre a produção de leite e a duração da lactação (FREITAS et al., 2001; FACÓ et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2002; BARBOSA et al., 2008; HERRERA et al., 2008; McMANUS et al., 2008), as características qualitativas do leite produzido por esses animais, ainda é pouco estudada (BARBOSA et al., 2008; BOTARO et al., 2009).

Sabe-se que a proporção entre os constituintes do leite determina, em grande parte, o sabor, o valor nutritivo, a possibilidade de desenvolvimento de microrganismos e as reações químicas que ocorrem (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998). Por tanto, percebe-se a importância em conhecer as características físico-químicas dos leites para sua industrialização adequada e posterior comercialização, tanto como leite fluido como produtos lácteos.

Esse estudo teve como objetivo comparar o perfil físico-químico do leite de vacas das raças holandesa e Girolando.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Para as avaliações foram utilizados 30 animais da raça holandesa e 30 animais da raça Girolando, saudáveis, criados em condições extensivas similares e controladas na Fazenda Experimental da UNOPAR, Tamarana-PR. Foram coletadas amostras individuais de leite cru após a ordenha completa desses animais, que estavam entre o 3º e 4º mês de lactação. As amostras de leite foram transportadas e mantidas refrigeradas, por um período máximo de 16 h até o início da realização das análises.

2.2 Análises físico-químicas

Os leites foram analisados quanto: composição centesimal (teores de proteína, gordura, cinzas, lactose e sólidos totais), pH, acidez titulável, teor de caseínas, perfil protéico através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE e Urea-PAGE), e capacidade de coagulação por renina.

O perfil protéico dos leites foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida, através da técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e Uréia-PAGE (AHMED, 2005), utilizando uma unidade vertical Mini Protean III xi (Bio-Rad®). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma®). As classes de proteínas foram determinadas de acordo com seu peso molecular por comparação com um padrão (*Precision Plus Unstained Protein Standard*, Bio-Rad®). A quantificação das bandas foi realizada por densitometria, utilizando o *software* LabImage 1D (Loccus Biotecnologia®)

O tempo de coagulação por renina foi determinado através da metodologia para avaliar o poder coagulante do coalho descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006), a qual se fundamenta na determinação do tempo de coagulação de um volume de leite, a 35 °C, por uma

quantidade de coalho conhecida. O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber de acordo com Kosikowski e Mistry (1997).

As demais análises foram realizadas seguindo os procedimentos da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2003). O pH dos leites foram mensurado utilizando-se um potenciômetro de imersão previamente calibrado. A acidez foi determinada através de titulação com solução Dornic utilizando fenolftaleína como indicador. O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, sendo que a proteína total foi determinada multiplicando o valor de NT por 6,38. O teor de nitrogênio não protéico (NNP) foi determinado pelo método do nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético a 12% e o teor de nitrogênio não caseíco (NNC) pelo teor nitrogênio solúvel em pH 4,6. A concentração de caseína foi calculada pela fórmula $\text{Caseína (\%)} = (\text{NT} - \text{NNC}) \times 6,38$ e a de proteína verdadeira (PV) pela fórmula $\text{PV (\%)} = (\text{NT} - \text{NNP}) \times 6,38$. O teor de cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla a 550 °C, e o teor de sólidos totais por secagem em estufa à temperatura de 105 °C até peso constante. O teor de lactose foi calculado pela seguinte fórmula: $\text{Lactose (\%)} = \text{teor de sólidos totais} - (\text{teor de gordura} + \text{teor de proteína} + \text{teor de cinzas})$. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

2.3 Análise de dados

O efeito da raça sobre os parâmetros analisados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Statística (STATSOFT, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados os valores médios dos resultados das análises físico-químicas de acordo com a raça do animal.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas dos leites das raças holandesa e Girolando.

Parâmetros	Raça Holandesa	Raça Girolando
Tempo de coagulação (s)	180 ± 70 ^a	146 ± 59 ^b
Acidez (°D)	16,99 ± 1,83 ^a	16,50 ± 2,23 ^a
pH	6,71 ± 0,08 ^a	6,74 ± 0,09 ^a
Sólidos totais (%)	11,52 ± 0,89 ^a	11,93 ± 1,51 ^a
Gordura (%)	3,57 ± 0,58 ^b	3,96 ± 0,86 ^a
Proteína total (%)	3,05 ± 0,51 ^a	3,12 ± 0,49 ^a
Proteína verdadeira (%)	2,84 ± 0,70 ^a	2,91 ± 0,81 ^a
Caseínas (%)	2,53 ± 0,89 ^a	2,57 ± 0,84 ^a
Lactose (%)	4,49 ± 1,26 ^a	4,68 ± 1,36 ^a
Cinzas (%)	0,62 ± 0,07 ^a	0,63 ± 0,08 ^a

^{ab} Valores com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

A propriedade de coagulação do leite, a partir da acidificação ou por ação enzimática constitui a principal característica para a produção de queijos (SOUZA, 2001). Neste trabalho o leite de vacas girolandas apresentou um menor tempo de coagulação, em relação à holandesa ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado por uma tendência do leite de Girolando apresentar, neste estudo, uma quantidade maior de proteína total e caseína. O menor tempo de coagulação do leite pode representar uma economia para as indústrias, de queijos, considerando que o volume de coalho a ser utilizado poderia ser reduzido.

Os resultados demonstraram que a acidez titulável e o pH do leite cru não diferiram entre as raças ($p > 0,05$). Em contrapartida, Botaro et al. (2009) encontraram uma maior acidez em leite originado da raça Girolando, em

comparação com a raça holandesa, possivelmente devido a maior quantidade de proteína encontrada no leite do Girolando.

O pH normal do leite é ligeiramente ácido, variando entre 6,6 e 6,8. Constitui um dos principais fatores que influenciam o processo de coagulação do leite, determinam a conformação das proteínas, a atividade das enzimas e a dissociação dos ácidos presentes no leite (BROWN, 1999).

Já a acidez titulável preconizada pela IN 51 (BRASIL, 2002) se encontra entre 14 a 18 °D. A média aritmética de ambas as raças, apresentou-se dentro desses limites, porém houve algumas amostras com valores maiores. A determinação da acidez é um dos testes usados na indústria para classificar o leite quanto sua qualidade microbiológica e também como um parâmetro de controle durante a manufatura de produtos como queijos e iogurtes (FOX; McSWEENEY, 1998).

A acidez titulável do leite é devida à presença de caseínas, fosfatos, albumina, dióxido de carbono, citratos e de ácido láctico (devido à fermentação da lactose pelas bactérias lácticas) (SANTOS; FONSECA, 2006). O leite cru recém ordenhado não contém mais do que 0,002% de ácido láctico (o que, expresso em °D, daria 0,2 °D). O aumento da acidez titulável deve-se normalmente à produção de ácido láctico a partir de lactose por microrganismos (SOUZA; DALLA ROSA; ZACHIA-AYUB, 2003).

Ruiz, Serrano e Crespo (1995), sugeriram que a acidez associada ao conteúdo de caseína no leite ficaria entre 16 a 18 °D. Eventualmente essa faixa pode ser mais ampla, dependendo da individualidade e da raça do animal, sem necessariamente a um aumento de ácido láctico. Em geral, as raças que apresentam um teor maior de caseína e fosfato no leite mostram também uma acidez aparente mais alta. Tal leite é idêntico em qualidade àquele que mostra menor acidez aparente. Daí a necessidade de bastante critério no julgamento da qualidade de um leite, simplesmente através da prova de acidez titulável. (FOX; MCSWEENEY, 1998).

O teor de gordura do leite cru das vacas da raça Girolando apresentou-se maior, e diferiu significativamente do teor gorduroso do leite das vacas holandesas ($p < 0,05$), o que confirma que a gordura é um dos parâmetros que

mais variam entre as raças (FOX; MCSWEENEY, 1998). Porém, o resultado não esteve em concordância com Botaro et al. (2009), que não encontraram diferença entre as raças. O valor médio de gordura no presente estudo para a raça holandesa e Girolando foi de 3,57% e 3,96%, respectivamente, enquanto que Botaro et al. (2009) encontraram 3,30% e 3,25%. Teixeira, Freitas e Barra (2003), encontraram valores de gordura para a raça holandesa de 3,56%, enquanto que Ribas et al. (2004) relataram um valor de 3,69%. Barbosa et al. (2008) encontraram um teor de 4,07% de gordura em vacas girolandas.

A gordura no leite, além de conferir um agregado valor nutritivo, é visto como um parâmetro de qualidade, tanto que há pagamento diferenciado para o produtor com leite de alto teor de gordura (WILLIAMS; JACHNIK, 1991). A concentração de gordura no leite é um fator tecnológico importante para a fabricação de produtos lácteos, pois influenciam no rendimento, textura, coloração e sabor destes (VALLE et al., 2004). Leite rico em gordura pode ser utilizado para produção de queijo com um alto teor de lipídeos, como o Gorgonzola e o Parmesão (FOX; COGAN; GUINEE, 2000), ou então para a obtenção de grande proporção de creme de leite através de seu desnate. O creme de leite, por sua vez, pode ser utilizado na produção de sorvetes e de manteiga, dentre outros produtos.

Tanto os teores de proteína total, quanto de proteína verdadeira e de caseínas não diferiram significativamente entre as raças ($p>0,05$). Botaro et al. (2009), encontraram valores maiores de proteína na raça holandesa (3,13%) em comparação a girolanda (3,09%), com diferença significativa entre as raças. A proteína total do leite cru de vacas da raça holandesa detectados neste estudo foi de 3,05% e o de vacas da raça Girolando de 3,11%. Ao comparar com estudos sobre vacas holandesas, o resultado encontrado foi menor ao valor descrito por Teixeira, Freitas e Barra (2003) de 3,15%, e de Ribas et al. (2004), que foi de 3,24%.

Assim como a gordura, o teor protéico tem elevada importância nutritiva por sua composição rica de aminoácidos, além de servir como parâmetro tecnológico de qualidade para a fabricação de queijos, entre as quais, destacam-se as caseínas do leite, que compõe a maior parte do seu conteúdo protéico (FOX; MCSWEENEY, 1998).

Sabe-se que as caseínas estão dispostas em micelas, e que cada caseína possui solubilidade diferente, o que determina, entre outros fatores, suas

características e funções. Por isso, a proporção entre as proteínas do leite, especialmente as caseínas, podem afetar as propriedades biológicas do leite, bem como, suas propriedades tecnológicas (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Ao avaliar o perfil protéico do leite (caseínas α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN), pelos métodos Urea-PAGE e SDS-PAGE, foi demonstrado não haver diferença entre as raças ($p > 0,05$) (Figura 1)

Tradicionalmente, o método Uréia-PAGE tem sido utilizado no estudo das proteínas do leite, porém possui baixa resolução, principalmente na região da α_{S1} , além de não detectar a κ -caseína. Ao contrário, o método SDS-PAGE tem melhor resolução e é capaz de detectar as quatro caseínas (PARDO; NATALUCCI, 2002), dando faixas distintas correspondentes, na ordem crescente de mobilidade, α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN. Nota-se que na técnica de SDS-PAGE, a α_{S1} -CN e β -CN se comportam de forma atípica, dando valores maiores de peso molecular, pela complexação de suas moléculas com a molécula de SDS (TREMBLAY et al., 2003).

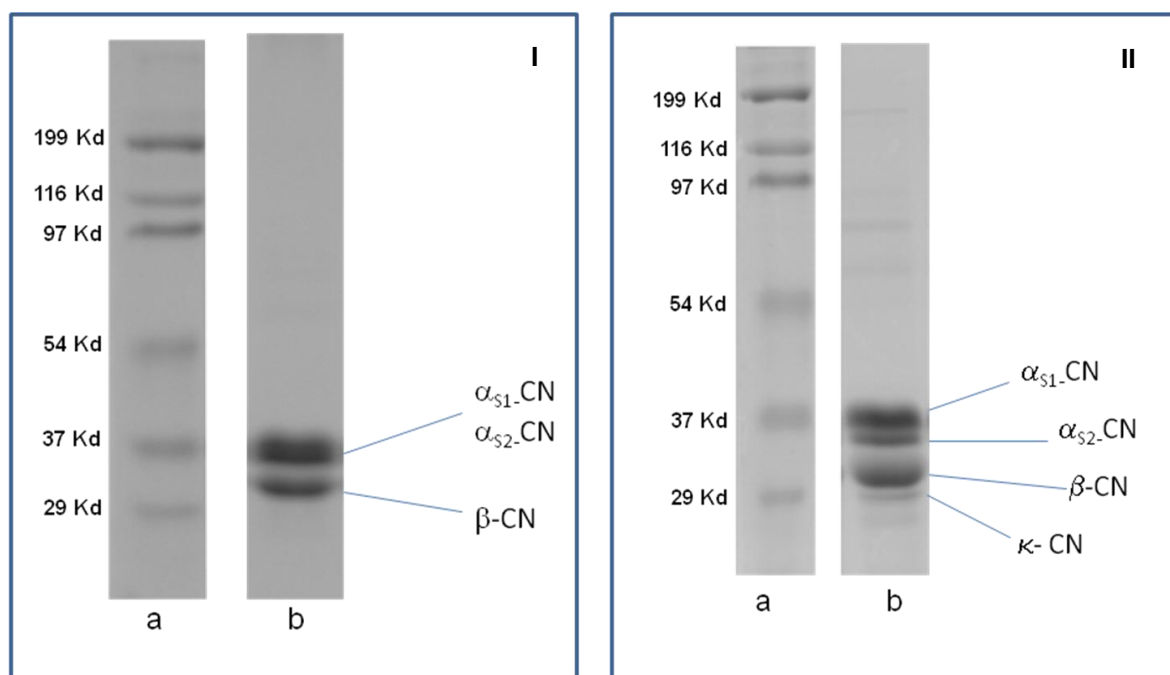


Figura 1. Perfis eletroforéticos das proteínas do leite cru de vacas holandesas e girolandas: I - Urea-PAGE; II - SDS-PAGE; a- padrão de peso molecular; b- leite cru analisado.

Em relação aos sólidos totais, o leite das vacas Girolando apresentou um teor de 11,93% e o das holandesas de 11,52% ($p>0,05$). Já Botaro et al. (2009), demonstraram valores maiores de sólidos totais para a raça holandesa (11,84%), em relação a Girolando (11,76%). Mesmo que o teor de sólidos totais não tenha diferido estatisticamente entre as raças, a tendência de maior teor no leite do Girolando deve-se, possivelmente, a maior concentração de gordura, o que pode representar um importante fator para a fabricação de concentrados do leite, como leite em pó, creme de leite e manteiga. Isso significa uma economia para a indústria, pois, sabe-se que a diminuição de 0,5 unidade percentual de sólidos totais pode significar perda de até cinco toneladas de leite em pó para cada milhão de litros de leite processados (FONSECA; SANTOS, 2000).

O teor de lactose do leite cru de animais da raça holandesa e Girolando foram 4,59% e 4,43% ($p>0,05$), respectivamente. Botaro et al. (2009), encontraram 4,44% para a raça holandesa e 4,47% para a Girolando. A lactose constitui o principal carboidrato do leite, é essencial para fabricação de produtos lácteos fermentados, afeta a textura de certos produtos concentrados, está envolvida na mudança de cor e sabor induzidas pelo calor em produtos altamente aquecidos, e contribui para o valor nutritivo dos produtos lácteos (FOX; MCSWEENEY, 1998).

O teor de cinzas do leite não apresentou diferença entre as raças ($p>0,05$). As cinzas refletem o conteúdo mineral do leite: fosfatos, citratos, cloratos, sulfatos, carbonatos e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Os principais elementos minerais do leite são importantes na nutrição, na preparação, processamento e armazenamento de produtos lácteos, devido à sua marcante influência sobre a conformação e a estabilidade das proteínas do leite, especialmente as caseínas, e, em menor medida, a estabilidade dos lipídios e a atividade de algumas enzimas endógenas (FOX; MCSWEENEY, 1998; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

4 CONCLUSÃO

No presente estudo o leite do Girolando diferiu do Holandês no teor de gordura e no tempo de coagulação. Já pH, acidez titulável, perfil protéico e os teores de sólidos totais, de proteínas (total, verdadeira e caseína) e de lactose não demonstraram associação com a raça. O leite da raça girolanda pode apresentar um melhor aproveitamento industrial na elaboração de alguns produtos lácteos, como queijos, creme de leite e manteiga.

5 REFERÊNCIAS

AHMED, H. **Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ARUNVIPAS, P.; DOHOO, I.R.; VANLEEUEWEN, J.A. The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, n.1-2, p.83-93, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

AULDIST, M.J.; WALSH, B.J.; THOMSON, N.A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. **Journal of Dairy Research**, v.65, n.3, p.401-411, 1998.

BARBOSA, S. B .P.; RAMALHO, R. P.; MONARDES, H. G.; DIAS, F. M.; SANTOS, D. C.; BATISTA, A.M.V. Milk and fat production of crossbred Holstein-Gir cows (*Bos Taurus taurus*-*Bos taurus indicus*) in the Agreste region of the Brazilian state of Pernambuco. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 468-474, 2008.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998.

BOTARO, B. G; LIMA, Y. V. R.; CORTINHAS, C. S.; SILVA, L. F. P.; RENNÓ, F. P.; SANTOS, M. V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2447-2454, 2009.

BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dez. de 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 51 de 18 de setembro de 2002. 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**, Brasília, 2002.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Agropecuária – Coordenação de Produção Animal. **Normas para formação da raça Girolando**. Brasília, DF: 1992. 31p.

BROWN, R. J. Milk coagulation and protein denaturation. In: JENNES, R.; WONG, N. P.; MARTH, E. H.; KEENEY, M. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3 ed, Gaithersburg: Aspen, 1999.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. Vol.1. Cap. 5. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. 3.ed. Londres: Blackie Academic & Professional. 2003.

FACÓ, O; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R.; MOURA, A. A. A. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 1944-1952, 2002.

FREITAS, M. S.; DURÃES, M. C.; FREITAS, A. F.; BARRA, R. B. Comparação da produção de leite e de gordura e da duração da lactação entre cinco “graus de sangue” originados de cruzamentos entre Holandês e Gir em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p.708-713, 2001.

FOX, P. F.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers. 2000.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional. 1998.

GUIMARÃES, J. D.; ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; SILVA, M. R.; COSTA, F. M. J.; ZAMPERLINI, B. Eficiências reprodutiva e produtiva em vacas das raças Gir, Holandês e cruzadas Holandês x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.641-647, 2002.

HERRERA, L. G. G.; FARO, L.; ALBUQUERQUE, L. G.; TONHATI, H.; MACHADO, C. H. C. Parâmetros genéticos para produção de leite no dia do controle e para produção de leite até 305 dias nas primeiras lactações de vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1774-1780, 2008.

KOSIKOWSKI, F.V.; MISTRY, V.V. **Cheese and fermented milk foods**. 3.ed. Westport: FV Kosikowski, LLC, 1997. v.1 e 2.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, n.5259, p. 680-685, 1970.

MCMANUS, C. TEIXEIRA, R. A.; DIAS, L. T.; LOUVANDINI, H.; OLIVEIRA, E. M. B. Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas e mestiças Holandês x Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p.819-823, 2008.

PARDO, M. F.; NATALUCCI, C. Electrophoretic analysis (tricine-SDS-PAGE) of bovine caseins. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, vol. 21, n. 1, p.57-60, 2002.

RIBAS, N. P.; HARTMANN, W. ; MONARDES, H. G. ; ANDRADE, U. V. C. Sólidos

totais do leite em amostras de tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 2343-2350, 2004.

RUIZ, M. L.; SERRANO, A.; CRESPO, J. G. Producción y composición química de la leche de cabra verata. **Alimentaria**, v. 263, p. 53-58, 1995.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006.

SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.3, p. 260-266, 2003.

SOUZA, T. C. **Alimentos: propriedades físicoquímicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2001.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

TEIXEIRA, N. M.; FREITAS, A. F.; BARRA, R. B. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 491-499, 2003.

TREMBLAY, L.; LAPORTE, M. F.; LÉONIL, J.; DUPONT, D.; PAQUIN, P. Quantitation of proteins in milk and milk products. Vol.1. Cap. 2. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. 3.ed. Londres: Blackie Academic & Professional. 2003.

VALLE, J. E.; CAMPOS, S. D. S.; YOTSUYANAGI, K; SOUZA, G. Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p. 669-673, 2004.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2ed, Boca Raton: CRC Press. 2006.

WEISS, D.; HILGER, M.; MEYER, H. H. D.; BRUCKMAIER, R. M. Variable milking intervals and milk composition. **Milchwissenschaft**, v.57, n.5, p. 246-249, 2002.

WILLIAMS, R. E; JACHNIK, P. Fat: solids not-fat price ratio: international comparisons. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.266, p.36-42. 1991.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS DO LEITE CRU DE VACAS HOLANDESAS E GIROLANDAS

RESUMO

A qualidade do leite está diretamente ligada a sua microbiota. Leite cru refrigerado pode ter um predomínio de bactérias psicotróficas, que em sua maioria, produzem proteases e lipases termorresistentes. Essas enzimas podem comprometer a qualidade dos produtos lácteos. Esse estudo teve como objetivo avaliar o perfil de bactérias psicotróficas do leite bovino de animais das raças holandesa e Girolando. Foram coletadas 16 amostras de leite cru de cada raça após a ordenha completa dos animais, os quais estavam entre o terceiro e quarto mês de lactação. Foi realizada a contagem de bactérias psicotróficas, e o isolamento e identificação das bactérias psicotróficas proteolíticas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as raças no perfil de bactérias psicotróficas do leite cru. A contagem média de bactérias psicotróficas foi de $3,8 \times 10^4$ UFC/mL. Foram isoladas bactérias psicotróficas proteolíticas em 53% das amostras. O psicotrófico encontrado com maior frequência foi a *Pseudomonas fluorescens* (83% dos proteolíticos). Nesse estudo não foi encontrada associação entre o desenvolvimento de bactérias psicotróficas no leite cru e a raça dos animais.

Palavras-chave: raças bovinas; enzimas microbianas; psicotróficos; proteólise.

ABSTRACT

Milk quality is directly associated to its microbiota. Raw refrigerated milk can have a high prevalence of psychrotrophic bacteria, which most can produce heat resistant proteases and lipases. These enzymes can compromise the dairy products quality. This study has as objective to evaluate the psychrotrophic bacteria profile of bovine raw milk from Holstein and Girolando breeds. From each breed, 16 samples of raw milk were collected after complete milking of the animals, which were between 3rd and 4th month of lactation. Psychrotrophic bacteria count, and proteolytic psychrotrophic bacteria isolation and identification were carried out. Significant difference were not found ($p>0.05$) between the breeds on their raw milk psychrotrophic bacteria profile. Average psychrotrophic bacteria count was 3.8×10^4 CFU/mL. Proteolytic psychrotrophic bacteria were isolated in 53% of the samples. The proteolytic psychrotrophic found more frequently was *Pseudomonas fluorescens* (83% of the proteolytic bacteria). Association between the psychrotrophic bacteria development in raw milk and the animals breed was not found in this study.

Keywords: bovine breeds; microbial enzymes; psychrotrophic; proteolysis.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da maioria dos produtos lácteos está diretamente relacionada com a qualidade microbiana do leite cru utilizado como matéria-prima. Dependendo da temperatura, condições e extensão da estocagem do leite, vários grupos de microrganismos podem passar por um período de crescimento intensivo, produzindo altas concentrações de enzimas, particularmente lipases e proteases (SANTOS; FONSECA, 2003).

Dentre esses grupos, destacam-se os microrganismos psicotróficos que, embora sejam destruídos pela pasteurização, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes ao calor. Contagens de psicotróficos maiores do que 10^6 UFC/mL estão associadas a uma atividade dessas enzimas suficiente para causar efeitos prejudiciais ao leite. (SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Não há uma contagem crítica específica estabelecida no Brasil referente à contagem de psicotróficos no leite cru, apenas uma indicação de que a contagem de psicotrófico não deve ultrapassar 10% da contagem de mesófilos (BRASIL, 2002). Entretanto, com base na literatura, uma contagem superior a 10^6 UFC/mL é prejudicial aos produtos lácteos (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2005).

A maior parte dos psicotróficos encontrados no leite cru é proveniente da falta de procedimentos adequados de higienização dos ordenhadores, dos animais e dos equipamentos de ordenha, bem como de água contaminada e mastite (HAYES; BOOR, 2001). Outro fator relevante que aumenta o número de psicotróficos no leite cru é o longo período de refrigeração antes do tratamento térmico, pela capacidade destes microrganismos se proliferarem em temperaturas de refrigeração (MUIR, 1996; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2005). Como o leite cru é, normalmente, conservado refrigerado antes do processamento, isso propicia o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos, uma das principais preocupações para a indústria de laticínios atualmente.

Existem no leite sistemas antimicrobianos naturais, que conferem proteção às glândulas mamárias contra infecções e contra a proliferação bacteriana descontrolada no leite. Este sistema é composto por leucócitos polimorfonucleares,

que fagocitam as bactérias, e moléculas como imunoglobulinas, lactoferrina e lactoperoxidase (COUSINS; BRAMLEY, 1985). Tem sido bastante estudado o polimorfismo genético entre raças bovinas de proteínas como a k-caseína, a β -lactoglobulina, pelo interesse tecnológico que envolve essas moléculas (BOTARO et al., 2007; BOTARO et al. 2009). Porém, ainda pouco se sabe sobre possíveis variações na concentração, atividade e polimorfismos de compostos como a lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas. Por isso, a raça pode ser um fator relevante no que diz respeito ao perfil microbiológico do leite cru

A microbiota psicotrófica contaminante do leite inclui espécies de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (COLLINS, 1981; COUSIN, 1982; MATTA; PUNJ, 1999; MURPHY; BOOR, 2000; ARCURI et al., 2008).

O gênero *Pseudomonas*, normalmente, representa 10% da microbiota do leite recém-ordenhado, mas em condições de refrigeração pode se tornar predominante (MUIR, 1996; SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Este gênero é representado por espécies que apresentam curtos tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7°C (4-12 horas) e uma temperatura mínima de crescimento de até -10°C (MUIR, 1996). Talvez por isso, tem sido o gênero isolado com maior frequência no leite cru (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000).

A maioria das bactérias psicotróficas não sobrevive à pasteurização, porém, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir até mesmo ao tratamento UHT. A presença de enzimas termoestáveis no leite cru é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT devido à sua estocagem à temperatura ambiente por longos períodos de tempo, o que pode levar a gelificação do leite. Outros defeitos causados por essas enzimas incluem alterações de sabor e odor em diversos produtos e redução do rendimento dos queijos (SORHOUG & STEPANIAK, 1997; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

O objetivo do presente estudo foi avaliar as bactérias psicotróficas e psicotróficas proteolíticas do leite cru de vacas das raças holandesa e Girolando.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram analisadas amostras de leite cru de 16 animais da raça holandesa e 16 animais da raça Girolando, saudáveis, criados em condições similares e controladas na Fazenda Experimental da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Tamarana-PR. Foram coletadas amostras individuais de leite cru após a ordenha completa desses animais, que estavam entre o 3º e 4º mês de lactação. As amostras de leite foram colocadas em frascos estéreis, transportadas e mantidas refrigeradas por um período máximo de 16 h até a realização das análises.

2.2 Análises microbiológicas

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias psicrotróficas com isolamento e identificação das psicrotróficas proteolíticas.

Alíquotas de 1 mL de cada amostra de leite cru foram diluídas seriadamente em água peptonada estéril (0,1%), semeadas em placas contendo PCA (*Plate Count Agar*), e incubadas a $6,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ por 10 dias para contagem de bactérias psicrotróficas (BRASIL, 2003). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL (ANDREWS, 2001). Foram selecionadas de três a cinco colônias das bactérias psicrotróficas, a partir das placas das maiores diluições de amostras de leite cru. Essas colônias foram semeadas em ágar leite e incubadas durante 24 h a 37 °C, para avaliação de atividade proteolítica. A presença de halos de clarificação ao redor dos isolados foi indicativo de atividade proteolítica (NÖRNBERG et al., 2009). Os isolados com a presença destes halos foram caracterizados quanto à morfologia e coloração de Gram, e identificados bioquimicamente através do sistema API 20NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França).

2.3 Análise de dados

O efeito da raça sobre os parâmetros analisados foram avaliados através de análise de variância e teste do Qui-quadrado, ambos ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Statistica (STATSOFT, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem média de bactérias psicrotróficas nas amostras de leite cru analisadas das raças holandesa e Girolando foi de $3,8 \times 10^4$ UFC/mL, apresentando-se dentro do limite crítico apresentado na literatura que é de 10^6 UFC/mL. Um acréscimo da atividade enzimática microbiana proteolítica e lipolítica tem sido associado a contagens superiores a 10^6 UFC/mL (SORHAUG; STEPANIAK, 1997; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2005).

O leite cru proveniente de animais da raça holandesa obteve uma contagem média de $5,4 \times 10^4$ UFC/mL, enquanto que o leite cru de animais da raça Girolando $2,4 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 1). Porém, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas do leite cru de vacas holandesas e girolandas

Parâmetros	Raça holandesa	Raça Girolando
Bactérias psicrotróficas (UFC/mL)	$5,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
Isolados não proteolíticos (%)	70	72
Isolados proteolíticos (%)	30	28
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (% do total de proteolíticos)	86	78
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (% do total de proteolíticos)	14	11
<i>Pseudomonas luteola</i> (% do total de proteolíticos)	0	11

O número de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru está relacionado, principalmente, às condições higiênicas na produção, ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado (MUIR, 1996; HAYES; BOOR, 2001). Santos et al. (2009), encontrou aumento do número de bactérias psicrotróficas e

psicrotróficas proteolíticas com o aumento do tempo de refrigeração do leite cru. Sabe-se que o armazenamento do leite cru na propriedade rural não deve ultrapassar 48 h (BRASIL, 2002). Tempos de estocagem maiores que os permitidos pela legislação brasileira estão associados à capacidade de armazenamento dos tanques de expansão, os quais permitem a estocagem do leite cru refrigerado por longos períodos, reduzindo, com isso, os custos com o transporte.

Uma contagem baixa de psicrotróficos no leite é de fundamental importância para sua qualidade, pois a produção de enzimas por esses microrganismos resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que limitam a vida de prateleira dos produtos lácteos (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

Foram isoladas bactérias psicrotróficas proteolíticas em 17 (53%) das 32 amostras de leite cru analisadas, sendo que todas foram identificadas como Gram-negativas. Muitos trabalhos mostram um predomínio de bactérias Gram-negativas na microbiota proteolítica do leite (MUIR, 1996; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; SANTOS; FONSECA, 2003; ARCURI et al., 2008; NÖRNBERG et al., 2009).

No total, obteve-se 138 isolados de psicrotróficos, dos quais 70 eram de leite de vacas holandesas e 68 de girolanda. A frequência de isolados com atividade proteolítica foi de 30% para a raça holandesa e 28% para a raça girolanda, sem diferença estatística entre as raças ($p > 0,05$) (Tabela 1). A espécie isolada com maior frequência foi a *Pseudomonas fluorescens*, 83% ($n=33$) dos isolados proteolíticos, seguidos de *Acinetobacter calcoaceticus* (13%) e *Pseudomonas luteola* (5%) (Figura 1). Diversos estudos revelam uma maior frequência de *P. fluorescens* em amostras de leite cru refrigerado, e pode-se atribuir este resultado ao menor tempo de geração dessa espécie em temperaturas de refrigeração, e sua capacidade de formar biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; HOLM et al., 2004; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; ARCURI et al., 2008).

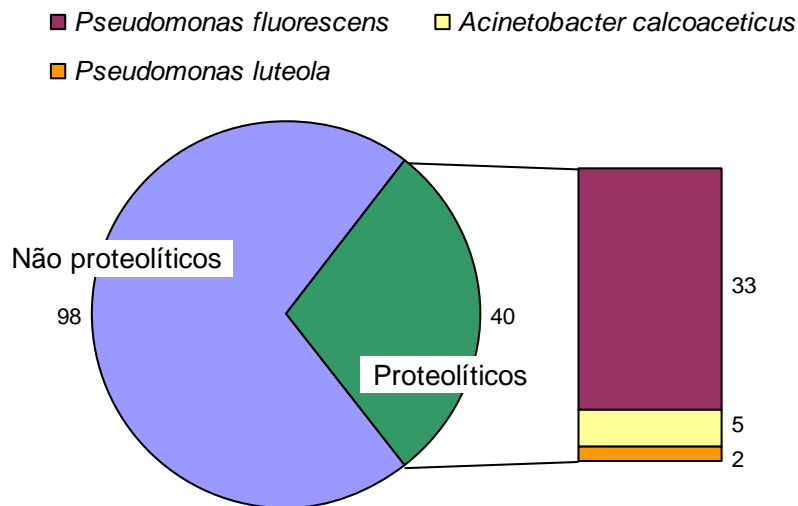


Figura 1. Número total de isolados de bactérias psicrotróficas do leite cru de vacas holandesas e girolandas

A frequência das espécies de agentes proteolíticos foi semelhante no leite das duas raças pesquisadas ($p > 0,05$), a diferença foi o isolamento da *P. luteola* apenas no leite das girolandas. Em relação à raça, 86% dos isolados proteolíticos no leite das vacas holandesas foram identificados como *Pseudomonas fluorescens* e 14% como *Acinetobacter calcoaceticus*. Já no leite das vacas Girolando, 78% dos isolados proteolíticos foram identificados como *P. fluorescens*, 11% como *Acinetobacter calcoaceticus* e 11% como *P. luteola* (Tabela 1).

Segundo Muir (1996), o gênero *Pseudomonas* representa 10% do leite recém ordenhado, e pode se tornar predominante em leite refrigerado. Fagundes et al. (2006), encontrou *Pseudomonas ssp* nas superfícies dos tetos e superfície dos equipamentos, ressaltando a importância de procedimentos adequados de higienização. Além disso, a água que abastece todas as etapas da ordenha é uma fonte importante de contaminação por esse gênero bacteriano (COUSIN; BRAMLEY, 1985).

Pseudomonas ssp. é considerado um agente causador de deteriorização do leite refrigerado, por produzir enzimas extracelulares com atividade proteolítica e lipolítica (MUIR, 1996; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; SANTOS; FONSECA, 2003; ARCURI et al., 2008; NÖRNBERG et al., 2009). Os problemas ou

defeitos atribuídos a este gênero são rancidez, sabor amargo, sabor de fruta, geleificação em leite UHT, instabilidade térmica do leite, instabilidade do leite ao etanol, resultado falso-positivo na pesquisa por fraude de leite com soro por meio da dosagem do ácido siálico e redução no rendimento na fabricação de queijos (COUSIN, 1982; KOHLMANN *et al.*, 1991; CHAMPAGNE *et al.*, 1994; CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996; SORHOUG; STEPANIK, 1997; CHEN; DANIEL.; COOLBEAR, 2003).

4 CONCLUSÃO

Não houve diferença entre as raças holandesa e Girolando na contagem e no perfil de bactérias psicotróficas do leite cru. Os leites analisados apresentaram contagem de bactérias psicotróficas abaixo do limite crítico de 10^6 UFC/mL que está associado à elevada atividade proteolítica. Foram encontradas bactérias proteolíticas no leite da maioria dos animais (53%), sendo que *Pseudomonas fluorescens* foi a bactéria com maior frequência (83% das espécies proteolíticas identificadas).

5 REFERÊNCIAS

ANDREWS, A.T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, v.50, n.1, p.45–55, 1983.

ARCURI, E. F. SILVA, P.D; BRITO, M. A. V. P; BRITO, R. F. B.; LANGE, C. C; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p. 2250-2255, 2008.

BOTARO, B. G; LIMA, Y. V. R.; CORTINHAS, C. S.; SILVA, L. F. P.; RENNÓ, F. P.; SANTOS, M. V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2447-2454, 2009.

BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62. **Diário Oficial da União**, Brasília, N. 432, Seção 1 - Anexo I, p. 21-35. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 51 de 18 de setembro de 2002. 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**, Brasília, 2002.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 2-3, p. 129-140, 1996.

CHAMPAGNE, C. P.; C. P ; LAING, R. R. ; MAFU, A. A. ; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.34, p.1-30, 1994.

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

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal Dairy Research**, v. 64, p. 157-160, 1981.

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

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**. v. 1, cap. 4. London: Elsevier Applied Science Publishers. 1985.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000.

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

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw Milk and Fluid Milk Products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. 2ed. New York: Marcel Decker. 2001.

HOLM, L. J.; JEPSEN, L.; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1151-1157, 2004.

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

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **Internation Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 59-62, 1999.

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 24-32, 1996.

MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, p. 606-611, 2000.

NÖRNBERG, M. F. B. L; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p.41-46, 2010.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p.645-651, 2006.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n.4, p. 1237-1245, 2009.

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

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

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.