

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

HENRIQUE ESTEVES AMORIM

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE LEITE CRU
REFRIGERADO SOBRE A PRESENÇA DE CMP
(CASEINOMACROPEPTÍDEO)**

Goiânia
2007

HENRIQUE ESTEVES AMORIM

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE LEITE CRU
REFRIGERADO SOBRE A PRESENÇA DE CMP
(CASEINOMACROPEPTÍDEO)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof^o Dr. Celso José de Moura

Co-orientador: Prof^o Dr. Albenones José de Mesquita

Co-orientador: Prof^o Dr. Edmar Soares Nicolau

Goiânia
2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

A524i Amorim, Henrique Esteves.
Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (Caseinomacropéptido) / Henrique Esteves Amorim. – Goiânia, 2007.
57f. : il., color., tabs., figs.

Orientador: Celso José de Moura e Co-Orientadores: Albenones José de Mesquita, Edmar Soares Nicolau.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2007.

Bibliografia : f.44-48.
Inclui apêndices.

1. Leite – Resfriamento 2. Soro de leite (Caseinomacropéptido) 3. Leite – Composição 4. Leite – Bacteriologia 5. Derivado do leite - Processamento I. Moura, Celso José de II. Mesquita, Albenones José III. Nicolau, Edmar Soares IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos V. Título.

CDU : 637.12

HENRIQUE ESTEVES AMORIM

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE LEITE CRU
REFRIGERADO SOBRE A PRESENÇA DE CMP
(CASEINOMACROPEPTÍDEO)**

Dissertação defendida e aprovada em 15 de fevereiro de 2007 pela Banca Examinadora
constituída pelos membros:

Prof^o Dr. Celso José de Moura – UFG

Prof^o Dr. Álvaro Bisol Serafini – UFG

Prof^a Dr^a Daise Aparecida Rossi – UFU

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador, Dr. Celso José de Moura, pela paciência em lidar com minhas incertezas e instabilidades, pelas “brigas” que na verdade eram discussões construtivas e, sobretudo, pela confiança e motivação.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFG que embora de recente implementação tem dado condições para a realização do sonho àqueles que sonham uma ascensão acadêmica e profissional.

Aos colegas, professores e coordenadores do mestrado pelo companheirismo nas aulas e nos trabalhos em laboratório e pelas lições acadêmicas e de vida.

À Ana Carolina Borges Urzedo, Amanda Gabriela Araújo de Oliveira, Danilo Neves de Almeida, Murilo Vasconcelos e Stella Ferreira de Azevedo que me auxiliaram na execução da parte sensorial do trabalho e que, principalmente, souberam representar na Terra o dinamismo e a competência do saudoso colega Renato Machado.

À Ydilla pelo total desprendimento e auxílio técnico nas análises cromatográficas.

À todos do Laticínios LEITBOM pelo total apoio estrutural, operacional e logístico na execução do projeto desta dissertação em laticínio e pelo companheirismo dos seus colaboradores nos momentos de descontração fora da fábrica.

Aos meus pais, Ana Maria da Silva Amorim e Carlos Roberto Campos Amorim, por terem me dado todas as condições para que eu me dedicasse aos estudos e subisse os degraus do sucesso profissional e acadêmico, pelo amor e proteção concedendo-me condições de superar todas as dificuldades da vida e por me motivarem pra que continuasse tentando ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu irmão, a familiares e amigos pelo incentivo em concluir o mestrado.

“Torna-te quem tu és.”
Friedrich Nietzsche

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a influência do tempo de estocagem sobre a presença de CMP (caseinomacropéptídeo) em leite cru, a matéria-prima após recepção pelo laticínios foi refrigerada e armazenada em tanque horizontal isotérmico de 20.000 L. O tanque permaneceu lacrado durante as 72 horas de estocagem e neste período permitiu-se o acesso a este apenas para coleta de amostras com intuito de realizar análises físico-químicas, microbiológicas (contagem psicotróficos aeróbios) e de cromatografia em HPLC (para detecção de soro). Após a estocagem por 72 horas o leite cru foi destinado à fabricação de queijo Prato. O queijo Prato foi submetido a análises de umidade, cloreto e pH, rendimento e sensorial pela análise descritiva quantitativa. Constatou-se que o tempo de estocagem é suficiente para a indicação de falso positivo de presença de soro, pela quantificação de CMP, na matéria-prima. Ao longo do tempo de armazenamento o crescimento da contagem de psicotróficos aeróbios, de $2,0 \times 10^5$ até $6,5 \times 10^5$ UFC/mL, está correlacionada estatisticamente com a evolução do teor do soro já que estes microrganismos são os responsáveis pela proteólise da κ -caseína e posterior liberação de CMP. A proteólise promovida por psicotróficos é preocupante para a indústria láctea já que pode indicar falso positivo de adição fraudulenta de soro ao leite cru além de ter uma matéria-prima inadequada para produção de derivados lácteos. As análises físico-químicas e de rendimento de queijo Prato mostram que a utilização de leite cru refrigerado na produção do referido queijo não alterou os padrões de qualidade, identidade e de mercado de tal produto. A análise descritiva quantitativa mostrou queijo Prato produzido com leite cru refrigerado estocado por 72 horas influenciou negativamente nos atributos sabor amargo e elasticidade pela proteólise da caseína.

ABSTRACT

With the objective to evaluate the influence of the stockage time on the presence of CMP (caseinmacropeptide) in raw milk the raw material after reception for the dairy industrie was cooled, 4 °C, and stored in 20.000 L isothermal horizontal tank. The tank remained sealed up during the 72 hours of stockage and in this period the access to this only for collection of samples with intention was allowed to carry through analyses physici-chemistries, microbiological (counting psychrotrophics aerobic) and of chromatography in HPLC (for whey detention). After the stockage for 72 hours raw milk was destined to the manufacture of Prato cheese. The Prato cheese was submitted the analyses of humidity, chloride and pH, sensorial income and for the quantitative descriptive analysis. One evidenced that the time of stockage of 72 hours is enough for the indication of false positive of whey presence. To long of the storage time the growth of the counting of psychrotrophics, $1,99 \times 10^5$ - $6,29 \times 10^5$ UFC/mL, is correlated estatistically with the evolution of the text of the whey since these microrganismos are the responsible ones for proteolysis of κ -casein. Proteolysis promoted by psychrotrophics is preoccupying for the dairy industry since it can indicate false positive of fraudulent addition of whey to raw milk besides having an inadequate raw material for production of milky derivatives. The analyses physici-chemistries and of cheese income Prato show that the cooled raw milk use in the production of related queijo did not modify the quality standards, identity and of market of such product. The quantitative descriptive analysis showed that samples that samples of produced Prato cheese with raw milk cooled stored by 72 hours can negative influence in the attributes flavor bitter taste and elasticity for proteolysis of the casein.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Definição de descritores e referências de extremos de escala adotados na análise descritiva quantitativa para queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado.....	30
Tabela 2	Resultados médios das análises físico-químicas de leite cru refrigerado transportado a granel e recebido em um laticínios do Estado de Goiás no mês de Março de 2006.....	32
Tabela 3	Resultados médios das análises físico-químicas realizadas em amostras de leite cru refrigerado coletadas ao longo do período de estocagem a ~ 11 °C.....	33
Tabela 4	Resultados médios da contagem de células somáticas em leite cru refrigerado em um laticínios do Estado de Goiás no mês de Março de 2006.....	33
Tabela 5	Resultados médios da contagem de bactérias mesófilas aeróbias ao longo do tempo de estocagem de leite cru refrigerado.....	34
Tabela 6	Resultados médios da contagem de bactérias psicrotóxicas aeróbias ao longo da estocagem do leite cru refrigerado.....	36
Tabela 7	Resultados médios do teor de soro em leite cru refrigerado estocados a ~11 °C estocados por 72 horas.....	38
Tabela 8	Resultados médios das análises físico-químicas das amostras de queijo Prato.....	40
Tabela 9	Resultados médios do rendimento industrial queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado estocado por 72 horas a ~11 °C.....	41
Tabela 10	Pontuação média atribuída por 15 provadores às propriedades sensoriais aparência, sabor e textura de queijos Pratos fabricados com leite refrigerado a 11 °C por 72 horas pela Análise Descritiva Quantitativa.....	41

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma de condução do experimento.....	25
Figura 2	Fluxograma do processamento do queijo Prato fabricado por um laticínios no estado de Goiás laticínios com leite cru refrigerado estocado a 11 °C por 72 horas.....	26
Figura 3	Evolução do pH em função da contagem de mesófilos aeróbios.....	35
Figura 4	Percentual de soro em leite cru refrigerado em função da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias.....	36
Figura 5	Prospectiva do percentual de soro em função da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias em leite cru refrigerado estocado a 11 °C.....	37
Figura 6	Influência do tempo de estocagem sob refrigeração a ~11 °C sobre a contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias.....	37
Figura 7	Curva padrão para determinação da concentração de soro em leite fluido.....	38
Figura 8	Evolução do percentual de soro em leite cru refrigerado ao longo do tempo de estocagem.....	39
Figura 9	Prospectiva da evolução do teor de soro ao longo do tempo de estocagem.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 QUALIDADE DO LEITE.....	14
2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	15
2.2.1 Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA)	15
2.2.2 Instrução normativa nº 51	16
2.3 REFRIGERAÇÃO DO LEITE.....	16
2.4 MICROBIOLOGIA DO LEITE.....	17
2.4.1 Fontes de contaminação microbiana	17
2.4.2 Mastite e contagem de células somáticas (CCS)	18
2.4.3 Bactérias psicrótroficas aeróbias	19
2.5 AÇÃO DE MICRORGANISMOS E DE SEUS METABÓLITOS NO LEITE.....	21
2.6 CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP).....	23
2.6.1 Origem do CMP	23
2.6.2 Determinação de CMP	24
2.6.3 Limite permitido de CMP em leite cru	24
2.7 QUEIJO PRATO.....	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAL.....	27
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU.....	29
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU.....	29
4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	29
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE SORO NO LEITE.....	30
4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO PRATO.....	30
4.7 ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO PRATO.....	30
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE LEITE CRU.....	34
5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) DO LEITE CRU.....	35
5.3 CONTAGEM MICROBIANA.....	36
5.3.1 Bactérias mesófilas aeróbias	36
5.3.2 Bactérias psicrótroficas aeróbias	37
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE SORO NO LEITE.....	39
5.5 ANÁLISE DO QUEIJO PRATO FABRICADO COM O LEITE CRU REFRIGERADO.....	42
5.5.1 Análises físico-químicas	42
5.5.2 Rendimento industrial de queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado	42
5.5.3 Análise descritiva quantitativa	43

6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICES	51

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite bovino abrange aspectos microbiológicos e físico-químicos desde a lactação até o processamento e comercialização. Estes fatores devem estar interligados de maneira a atender as exigências do mercado e a legislação vigente.

Tradicionalmente no Brasil, o grande problema enfrentado com leite era a acidificação devida ao desenvolvimento de microrganismos mesofílicos que produzem ácido láctico. No entanto, com a refrigeração, cria-se um ambiente favorável a outro grupo de microrganismos que podem se desenvolver no leite refrigerado que são as bactérias psicrotróficas aeróbias. O crescimento de microrganismos psicrotróficos no leite pode gerar um novo problema devido a ação de enzimas por eles liberadas. Estas enzimas são lipases e proteases capazes de resistir às temperaturas de tratamento térmico normalmente utilizadas no processamento de leite.

A proteólise causada por enzimas microbianas presentes em leite com alta contagem de bactérias psicrotróficas podem levar a problemas como redução no rendimento em produtos, alterações negativas no sabor e aroma, redução no tempo de prateleira dos produtos. Além desses problemas, leite fluido (UAT) ou em pó podem apresentar resultados positivos para caseinomacropéptido (CMP). Este peptídeo é originado tradicionalmente da hidrólise da k-caseína na posição 105-106 quando da fabricação de queijos. Hidrólise promovida por microrganismos e enzimas microbianas podem ocorrer em pontos próximos ou até nessa mesma posição levando a liberação do CMP. A presença de CMP em produtos lácteos indica presença de soro porém a hidrólise enzimática de origem microbiana pode também apresentar o mesmo resultado, sem que na verdade, o leite tenha sido adicionado de soro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE DO LEITE

Em praticamente todo o território brasileiro é praticada a atividade leiteira. O sistema agro-industrial da cadeia do leite tem grande peso social e por isto representa um dos segmentos mais importantes do agronegócio. Em mais de um milhão de propriedade rurais envolvidas na produção primária há o envolvimento de mais de três milhões de trabalhadores e agrega 6 bilhões de reais à agropecuária nacional (MÜLLER, 2002).

O consumidor brasileiro recentemente foi surpreendido pela enorme e diversificada oferta de produtos lácteos importados, e nisto a globalização foi uma das grandes responsáveis. O cliente vem se tornando mais exigente em relação à qualidade dos alimentos oferecidos e acompanhando este quadro, os laticínios têm se modernizado e exigido do produtor primário uma matéria-prima, leite *in natura*, de melhor qualidade para se tornarem mais competitivos no mercado (MACHADO; PEREIRA; SARRIES, 2000).

Müller (2002) observou que as cooperativas e laticínios iniciaram a implementação de programas de pagamento do leite por qualidade tendo como base as análises de crioscopia, prova da redutase e contagem global de microrganismos aeróbios mesófilos. Em alguns casos incluíram também a contagem de células somáticas. Infelizmente, algumas cooperativas e laticínios ainda têm priorizado a quantidade em detrimento da qualidade do leite *in natura* oferecido pelos produtores.

Sobre a qualidade do leite, Zocche et al. (2002) afirma-se que se deve levar em consideração as características sensoriais, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas, sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana.

De acordo com Rogick (1981) para se obter leite em condições satisfatórias deve-se atentar para a saúde dos animais, as condições higiênicas da estrutura e das instalações de onde é feita a ordenha e as condições de saúde e asseio do vaqueiro. Müller (2002) acrescentou que a qualidade do leite *in natura* é influenciada por fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à armazenagem do leite.

De acordo com Fontes (1996) o controle higiênico como forma de controlar as condições de higiene do leite o método analítico mais usado é a contagem bacteriana pois daí

pode-se inferir sobre a sua integridade microbiológica e assim decidir pelo destino da matéria-prima.

O volume e a sazonalidade da produção da cadeia láctea são critérios valorizados no pagamento do produto apesar de não estarem intrinsecamente relacionados com a qualidade do leite. Os meses do ano afetam a composição química do leite e a ocorrência da mastite relacionados, respectivamente, às variações de disponibilidade e qualidade dos alimentos e às condições climáticas favoráveis aos microrganismos. A pequena variação sazonal proporciona um melhor planejamento por parte da indústria e a minimização da ociosidade do parque industrial em determinadas épocas do ano (GONZALEZ et al., 2004).

Dentro deste contexto foi implantado recentemente normas nacionais de melhoria da qualidade do leite condensadas principalmente pelo Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) e pela Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002)

2.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

2.2.1 Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA)

Em 29 de março de 1952 o governo brasileiro por meio do decreto nº 30.691 aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, o RIISPOA.

O RIISPOA define o leite como produto de ordenha completa, ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. E o artigo 493 impunha que o leite devia ser mantido em tanque com água corrente sob refrigeração a 10° C e, pelo artigo 494, se o leite tivesse fins industriais poderia ser mantido até o dia seguinte antes de ser enviado ao estabelecimento processador. Para leite sem refrigeração permitia-se prazo máximo de 6 horas entre a ordenha e a chegada ao estabelecimento industrial. Permitia-se a coleta em carro-tanque desde que o leite estivesse mantido a no máximo 10° C. Ainda à época da aprovação do regulamento permitia-se a produção e distribuição de leite cru desde que distribuído até 3 horas após o término da ordenha. Para os diversos tipos de leite, de consumo ou industrial, foram fixados 5 °C para refrigeração no posto e posterior transporte à usina ou entreposto usina; para conservação no entreposto-usina antes da pasteurização; na refrigeração após pasteurização: sob conservação em câmara fria (BRASIL, 1952).

Em 10 de outubro de 1969 por meio do decreto nº 923 o Presidente da República decretou a proibição da venda de leite cru para consumo direto da população (BRASIL, 1969). Deste modo revogou-se o artigo do RIISPOA que permitia a comercialização e distribuição de leite *in natura*.

2.2.2 Instrução normativa nº 51

Em 18 de setembro de 2002 foi publicada a Instrução Normativa nº 51 pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002) atendendo assim, a pressão do consumidor mais exigentes interno por produtos de melhor qualidade e dos laticínios que exigiam normas de controle da produção e distribuição de leite e seus derivados que possibilitavam atender às normas do mercado estrangeiro, sobretudo o Europeu.

Antes da Instrução Normativa nº 51 não se exigia do produtor nacional a granelização do leite. A granelização consiste no recolhimento do leite em caminhões isotérmicos construídos internamente com aço inoxidável diretamente de tanques de expansão direta ou dos latões contidos nos refrigeradores de imersão. Tal norma preconiza que o tanque de expansão direta seja capaz de refrigerar a leite até temperatura inferior a 4° C no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha e que o tanque de refrigeração por imersão seja eficiente em refrigerar o produto até temperatura de 7° C no tempo máximo de 3 horas após a ordenha. O tempo entre a ordenha e a recepção no laticínio que vai beneficia-lo não deve ser superior a 48 horas, porém recomendando um tempo não superior a 24 horas.

Caso o leite refrigerado passe da propriedade rural para um posto de refrigeração este deve ser refrigerado até 4° C em resfriadores a placas e com permanência no estabelecimento por no máximo 6 horas. Na propriedade rural ou tanque comunitário a temperatura máxima de conservação é de 7° C e no estabelecimento processador é de no máximo 10° C.

2.3 REFRIGERAÇÃO DO LEITE

A estocagem de leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil, na década de 90 e, esta prática reduz os custos operacionais de produção, incluindo a deterioração do leite por ação da acidificação de bactéria mesofílicas aeróbias (PINTO, MARTINS e VANETTI, 2006).

Nero et al. (2005) evidenciaram a importância da refrigeração na conservação da produção leiteira, fator primordial da Instrução Normativa nº 51. Em Londrina coletaram

amostras de leite refrigeradas provenientes de uma grande usina de beneficiamento e amostras de vários pequenos laticínios que absorviam a produção sem exigirem a padronização na conservação e transporte do leite. Em relação às amostras refrigeradas, 88% apresentaram contagem de aeróbios mesófilos menores do que 10^6 UFC/mL, ou seja, dentro do padrão da Instrução Normativa nº 51. Em relação às amostras não refrigeradas, 56,5 % contagens de mesófilos aeróbios acima de 10^6 UFC/mL.

Santos, Carvalho e Abreu (1999) afirmam que temperaturas acima de 4°C favorecem a multiplicação de microrganismos psicrotróficos. Isso assume grande importância uma vez que podem ser produtores de proteases e lipases, enzimas que comprometem a qualidade da matéria-prima e do produto beneficiado já que estas enzimas são termo-resistentes.

A influência da temperatura durante o transporte sobre a contagem de mesófilos aeróbios e de coliformes totais foi detectada por Santos (2002). Em seu trabalho de dissertação para amostras transportadas a granel, sob refrigeração a 4,5° C, observou contagem 7 vezes menor para contagem de mesófilos aeróbios e de 10 vezes menor para contagem de coliformes fecais em relação a amostras transportadas a temperatura média ambiente, 18,5 ° C.

2.4 MICROBIOLOGIA DO LEITE

2.4.1 Fontes de contaminação microbiana

Deve-se atentar para a produção higiênica do leite tanto a nível de fazenda quanto a de indústria. Por mais que se tenham boas condições sanitárias de produção do leite e seus derivados imprescindivelmente haverá microrganismos contaminantes. Alguns inofensivos à saúde e outros capazes de causar vários tipos de doenças (OLIVEIRA; GALLO; CARVALHO, 1994).

Ao ser secretado nos alvéolos da glândula mamária o leite é isento de contaminação, sob condições fisiológicas normais. Mas, ao ser eliminado, o leite pode se contaminar por um pequeno e bem definido número de microrganismos, oriundos dos canais lactíferos, sistema da glândula e canal do teto (BRITO, 1999; FONSECA; SANTOS, 2000).

Quando o animal está sadio a contaminação microbiana do leite varia entre 5×10^3 a 2×10^4 UFC/mL (PRATA, 2001). Em virtude das interações entre os fatores responsáveis por sua contaminação, o leite ao sair da glândula mamária, pode apresentar contagem bacteriana inicial variável: desde valores abaixo de 10^3 UFC/mL até acima de 10^6 UFC/mL. A população microbiana total do leite cru varia de acordo com a contaminação inicial proveniente do interior da glândula mamária, exterior do úbere e tetos, superfícies dos equipamentos e condições de armazenamento (BRAMLEY; McKINNON, 1990).

O interior da glândula mamária, exterior do úbere e teto, e a superfície dos equipamentos e utensílios de ordenha constituem as principais fontes de contaminação (MURPHY; BOOR, 1998). A temperatura e umidade ambiente afetam o crescimento microbiano e, portanto, podem influenciar a contaminação do leite (HOGAN et al., 1988). A contagem de células somáticas (CCS) do leite de uma vaca indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária. Já a CCS do leite do tanque de resfriamento do rebanho indica a incidência média de mastite no rebanho (PAULA et al., 2004).

2.4.2 Mastite e contagem de células somáticas (CCS)

Mastite é uma reação inflamatória no úbere da vaca, comumente causada por infecção bacteriana. Leite proveniente de vacas infectadas é caracterizado pelo incremento de CCS. Todos os componentes do leite são afetados pela mastite (RYAN et al., 2000).

Células somáticas do leite são células de defesa do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater os agentes causadores da mastite, podendo ser, também, células secretoras descamadas. No entanto, em uma glândula mamária infectada, as células de defesa correspondem entre 98 e 99% da células encontradas no leite (PAULA, et al., 2004). As células somáticas do leite de vacas saudáveis correspondem a leucócitos ou neutrófilos, macrófagos e linfócitos em proporções de aproximadamente 12%, 60% e 28% respectivamente, além das células epiteliais (LARSEN et al. ; 2004).

Elevada CCS em leite de tanques além de indicar más condições das glândulas mamárias das vacas ordenhadas pode determinar perdas de rendimento durante processamento. CCS indica boa saúde da glândula mamária dos animais do rebanho e segurança em termos processamento (PAULA et al., 2004).

Durante a mastite a rede de síntese de caseína e gordura na glândula mamária é geralmente diminuída, mas resultados mostram que há aumento do percentual de gordura e de

proteína após a fase de infecção. Este aumento se deve muito mais à diminuição do volume de produção do leite (cerca de 30%) após a infecção, do que pela síntese destes componentes (RYAN et al., 2000).

PRADA E SILVA et al. (2000) constataram que na comparação de amostras de leite com diferentes contagens de células somáticas, o aumento destas está relacionado com uma redução da concentração de lactose, mas não possui relação com a concentração de sólidos totais. Observou também, que há uma correlação positiva do crescimento do número de células somáticas com o teor de gordura e de proteína (PEREIRA et al., 1999).

A presença de mastite constitui uma importante fonte responsável pela elevação da contagem bacteriana, principalmente quando causada por *Streptococcus agalactiae* ou quando ocorrem casos clínicos causados por *Escherichia coli* ou *Streptococcus uberis* (FONSECA; SANTOS, 2000). Entre os patógenos causadores de mastite, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., principalmente *Streptococcus agalactiae*, e as bactérias do grupo coliforme causam as maiores elevações da CCS (BUENO, 2004).

As condições higiênicas dos ordenhadores e a estrutura da linha do leite cria condições para a proliferação e multiplicação dos *Staphylococcus aureus*. Entende-se como a estrutura da linha do leite a logística de coleta do leite ordenhado, acondicionamento em tanques ou latões, e o tempo e a temperatura do leite acondicionado antes e durante o transporte (BUENO, 2004).

De acordo com Assumpção et al. (2003) *Staphylococcus aureus* é responsável por um dos tipos mais freqüentes de intoxicação alimentar, comumente veiculada por leite e derivados. Durante sua multiplicação nesses produtos, cepas enterotoxigênicas da bactéria produzem toxinas termo-estáveis que causam náuseas, vômitos e diarreia quando ingeridas em quantidade suficiente.

2.4.3 Bactérias psicrotróficas aeróbias

Dentre os vários microrganismos presentes na microbiota total do leite tem-se os microrganismos psicrotróficos e estes são capazes de crescer à temperatura de refrigeração comercial, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (ALVIM, 1992).

Silveira et al. (1998) apud por Zocche et al. (2002) afirmam que com o uso intensivo da refrigeração, as bactérias psicrotróficas tendem a ser selecionadas. Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas estritamente mesófilas, já estão sendo incluídas também entre os psicrotróficos.

Dentre as bactérias psicotróficas, as do gênero *Pseudomonas* são as mais freqüentemente encontradas no leite cru e as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as que têm papel relevante na diminuição da qualidade do leite fluído e demais derivados lácteos (FAGUNDES et al., 2006). Outros gêneros de bactérias gram-negativas, como *Flavobacterium*, *Achromobacter* e *Aeromonas*, entre outros, têm sido isolados de leite e seus derivados. A maioria dessas bactérias, especialmente *Pseudomonas fluorescens*, está associada à proteólise e/ou lipólise em leite e derivados. Em geral os microrganismos psicotróficos presentes no leite e em derivados usualmente são oriundos do solo, da água e da vegetação, ou seja, resultam de contaminação secundária. Entretanto, a principal fonte de contaminação de leite e derivados com bactérias psicotróficas continua sendo os utensílios e equipamentos, que não foram eficientemente higienizados, utilizados no manuseio de leite nas fazendas e nas usinas de beneficiamento (ALVIM, 1992).

Santana et al. (2004) constataram que os principais pontos de contaminação por psicotróficos e microrganismos proteolíticos na cadeia de produção do leite das fazendas estudadas foram devido a limpeza dos tanques ou presença de água residual e da sanitização inadequada das tetas das vacas.

De acordo com Santana et al. (2004) a água contaminada ou não tratada pode ser fonte de uma grande variedade de microrganismos saprófitos originários do solo ou vegetação, como *Pseudomonas* spp, coliformes e outras bactérias gram-negativas.

Amostras de leite refrigeradas durante 12 horas o crescimento de psicotróficos apresentaram crescimento variando de 140,7% a 997,7% quando comparadas com a contagem de mesófilos aeróbios. O grupo dos microrganismos gram-positivos foram os mais freqüentes psicotróficos proteolíticos presentes no processo de produção do leite, entretanto, os bacilos gram-negativos representam 45% dos psicotróficos detectados. Cocos gram-positivos com 28% de freqüência representam um importante grupo de proteolíticos em leite nas fazendas estudadas. A refrigeração do leite a 4° C é mais eficiente quando o leite está menos contaminada por psicotróficos pois a inibição da liberação de enzimas proteolíticas é menor (SANTANA et al., 2004).

A estocagem refrigerada de leite cru é operação usual antes do processo industrial, entretanto, permite o crescimento de bactérias psicotróficas e liberação de proteinases por estas liberadas (MIRALLES; RAMOS; AMIGO, 2003).

Guinot-Thomas et al. (1994) observaram que incubando o leite a 4° C no primeiro dia a contagem microbiológica correspondia a 2×10^4 UFC/mL sendo que desta contagem 20% a 50% referia-se às bactérias psicotróficas. A fase lag foi até o fim do segundo dia de

estocagem e o fim da fase exponencial e começo da etapa estacionária ocorreu de quatro a seis dias de incubação a 4° C quando o número de psicotróficos ficou estabelecido entre 10⁶ e 10⁷ UFC/mL.

2.5 AÇÃO DE MICRORGANISMOS E DE SEUS METABÓLITOS NO LEITE

Microrganismos psicotróficos gram-negativos podem ser facilmente destruídos por processamento térmico como a pasteurização. No entanto as enzimas proteolíticas e lipolíticas extracelulares por elas produzidas são resistentes ao calor e podem promover no leite defeitos de sabor e aroma, rancidez, sabor de sabão, gelatinização de leite UHT (Ultra High Temperature) e baixo rendimento na produção de queijo. Bactérias psicotróficas gram-positivas possuem baixa ação proteolítica e limitada ação lipolítica quando comparadas com as bactérias gram-negativas porém, ao gênero *Bacillus* spp pode ser atribuído a uma série de alterações sensoriais em leite refrigerado a 7,2° C por 14 dias (ROSSI et al., 2006; SANTANA et al., 2004).

A deterioração de amostras de leite cru, mantidas sob refrigeração, ocorre em função da atividade de proteases e lipases. As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite, de forma análoga à quimosina (FAIRBAIRN; LAW, 1986; RECIO et al., 2000 apud PINTO, 2004). Esta categoria de enzimas é relacionada a problemas tecnológicos, incluindo a gelificação do leite UHT. A detecção de presença de soro de leite, formação de aminoácidos durante a maturação de queijos e o desenvolvimento de sabor amargo em leite e em produtos lácteos. A lipólise resulta da ação de lipases naturais e ou, microbianas. Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta (PINTO, 2004). A estocagem de leite cru por 3 dias ou mais sob temperatura de refrigeração é comum em laticínio, como um resultado da centralização das plantas processadoras de leite e do sistema de cota.

Pinto (2004) constatou que em leite refrigerado a frequência de isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas Gram-negativas foi maior e dentre os isolados gram-negativos identificados. O gênero *Pseudomonas* foi o mais freqüente (45,2%), especialmente *P.fluorescens*, que representou (39,1%) da microbiota gram-negativa identificada. O grau de hidrólise das frações de caseína de leite cru integral, coletado em condições assépticas, por atividade proteolítica de *P.fluorescens* aumentou com a temperatura e com o tempo. A fração κ -caseína foi mais susceptível à hidrólise, seguida da fração β -caseína e α -caseína.

Guinot-Thomas(1994) observou o abaixamento do pH do leite depois de 4 dias de estocagem a 4° C e isto pode ser explicado pelas lipases microbianas que estão relacionadas com o fim da fase exponencial e início da fase estacionária. Outra explicação pode ser dada pela fermentação dos microrganismos psicrotróficos já com elevada contagem microbiana depois de seis dias de estocagem.

A hidrólise de caseína por proteinases microbianas afeta principalmente a fração da κ -caseína, cálcio coloidal e, conseqüentemente as micelas de caseína. Sob condições de trabalho descritas como seis dias de estocagem a 4° C, contagem bacteriana total de 2×10^4 UFC/mL, células somáticas de $2,5 \times 10^5$ células/mL, o efeito foi significativamente relevante em leite cru já após quatro dias de estocagem e concomitantemente com alto número de psicrotróficos (10^6 a 10^7 UFC/mL) (GUINOT-THOMAS, 1994).

A estocagem de leite cru, a 4°C por 48 h, resultou em leite em pó com alto valor de ácidos graxos livres e aumento dos índices de acidez. Dependendo do grau de concentração do leite antes do processamento para leite em pó perde-se atividade lipolítica durante a evaporação e secagem. A atividade de proteinases e de lípases permanecem constante durante a estocagem de leite em pó a 25° C (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1997).

De acordo com Silva (2005) a produção de enzimas proteolíticas termorresistentes ocorre principalmente quando a oferta de nutrientes no leite torna-se limitante, o que ocorre próximo à fase estacionária de crescimento bacteriano. Foi observado que para a temperatura de 4° C a produção enzimática foi mais pronunciada, já na fase estacionária de crescimento da bactéria. Para as temperaturas de 7°C, 10°C e 21°C, a produção de enzima foi associada ao crescimento da bactéria.

Encontra-se no leite cru enzimas proteolíticas naturais, provenientes da corrente sanguínea, excretadas incidentalmente junto com o leite no tecido glandular do úbere e enzimas proteolíticas produzidas por bactérias contaminantes do leite (DRACZ, 1996).

A principal protease natural do leite é a plasmina, que se associa à micela de caseína (WALSTRA; JENNESS, 1984). As proteínas lácteas mais sensíveis ao ataque da plasmina são as caseínas β e α_2 . A plasmina atua sobre a caseína α_1 , e a κ -caseína é resistente. Já as proteínas do soro não são afetadas por essa enzima. A plasmina possui uma razoável resistência térmica, resistindo à pasteurização e, em parte, ao tratamento UHT - Ultra High Temperature (DRACZ, 1996).

Amostras de leite analisadas após de 96 horas de estocagem refrigerada, apresentaram proteólise, detectada pelo método oficial, HPLC-GF, mas os resultados estarem dentro do limite aceitável pela legislação federal (1% do soro). Além disso, apresentaram

elevada acidez titulável, floculação intensa ao teste do alizarol, coagulação no teste da fervura e modificação sensorial acentuada (DRACZ, 1996).

Dracz (1996) afirma que o leite estocado a 4° C, 7° C e 10° C já por 48 horas já estariam condenados pelos testes rápidos de qualidade previstos na legislação. Isso reforça o fato de que devem ser respeitados os prazos atuais de 24 horas e temperatura máxima de estocagem do leite sob refrigeração, 4° C, entre a ordenha e a entrega nas indústrias de beneficiamento final.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) concluíram que a refrigeração do leite cru por períodos prolongados na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer sua qualidade, considerando a possibilidade de seleção de bactérias psicrófilas que liberam enzimas proteolíticas termorresistentes.

Segundo Santos, Ma e Barbano (2003) a manutenção de baixas temperaturas (menor do que 6° C) de conservação e baixa CCS em combinação com algum processo tecnológico que vise reduzir a contagem microbiana sobre o leite pode garantir um produto de desejável qualidade sensorial por até 60 dias.

2.6 CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP)

2.6.1 Origem do CMP

O coagulante tradicionalmente usado para a produção de queijos, na maior parte do mundo, é a renina extraída do abomaso de bezerros lactantes, de 10 a 30 dias de idade. O soro de queijo obtido por via enzimática (coalho) contém um caseínomacropeptídeo (CMP), única fração da caseína contendo glicídios em sua estrutura, resultante da ação específica da renina sobre a κ -caseína. A renina é específica pela ligação 105-106 (Phe-Met) da κ -caseína. Como resultado de sua ação sobre essa fração protéica, há a liberação do caseínomacropeptídeo (CMP), que constitui, aproximadamente, um terço dessa fração, e contém a porção C-terminal (aminoácidos 106 a 109) (ALVIM, 1992).

A fração C-terminal contém vários açúcares incluindo o ácido N-acetylneuramínico (ácido siálico). A κ -caseína-CMP é um importante indicador da ação proteolítica e pode ser usado, tanto para garantir a qualidade do leite cru como para o controle industrial do processo como a produção de queijo e demais produtos lácteos (FURLANETTI; PRATA, 2003).

Enquanto o CMP é proveniente da ação da quimosina sobre a κ -caseína é também documentado que o leite normal tem quantidades variáveis de CMP-livre, variável conforme o

estágio de lactação e as condições sanitárias do animal (mastite clínica e subclínica). Constata-se que a quantidade de CMP proveniente da proteólise da κ -caseína é dez vezes maior que o teor de CMP-livre em leite maduro, ou seja, leite fora do período de colostro (FURLANETTI; PRATA, 2003).

Furlanetti e Prata (2003) observaram que o teor de CMP livre variou durante as distintas fases do período de lactação iniciando-se com valores superiores à média logo após o período colostrado, declinando a seguir para valores estáveis próximos à média e assim permanecendo até o início do terço final. A partir daí, evidenciaram as maiores oscilações, com valores sempre crescentes e superiores à média. De maneira muito semelhante ao CMP livre, o teor de CMP total evidenciou a mesma tendência de variação em função do período de lactação. Tanto o teor de CMP livre, quanto o de CMP total, apresentaram tendência consoante à observada para as reações positivas ao CMT e inversamente proporcional à produção de leite nas distintas fases do período de lactação.

2.6.2 Determinação de CMP

A quantificação do CMP (presente no soro e ausente no leite não submetido à renina) e de CMP livre é um dos métodos mais recomendáveis para se quantificar a adição de soro de queijo ao leite. Essa determinação pode ser feita por eletroforese, e quantificada tanto por densitometria (VILELA, 1987), como por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD) ou monitorada com registrador e/ou integrador eletrônico (BRANDÃO; PARREIRA; ALVIM, 1988).

O método GF-HPLC estudado por Alvim (1992) não é capaz de detectar a adição de soro ácido e/ou do permeado ao leite mas confirma a ausência de soro proveniente de coagulação enzimática. Os resultados positivos quanto a presença do CMP, podem ser interpretados como resultantes da adição do soro ao leite, ou como provenientes da detecção de produtos de degradação protéica do leite. As condições insatisfatórias de manuseio do leite, ou seja, de processamento, de seleção inadequada da matéria-prima, de higienização deficiente de equipamentos e acessórios e de estocagem prolongada antes da pasteurização determinam leite de qualidade microbiológica insatisfatória.

2.6.3 Limite permitido de CMP em leite cru

A portaria nº 124, de 23 de setembro de 1991 estabelece a técnica de determinação de caseinomacropéptido por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho, como técnica oficial. Após os cálculos se ocorrer a presença do equivalente a 1% de soro, determinado a partir da curva padrão nos picos com o mesmo tempo de retenção do CMP, a prova será considerada com resultado positivo (BRASIL, 1991).

2.7 QUEIJO PRATO

O queijo Prato, de origem Dinamarquesa, é semelhante ao Dambo e Gouda, porém com sabor e textura próprios. Possui ampla distribuição no Brasil e juntamente com os queijos Mussarela, Minas, Requeijão e Parmesão é um dos mais consumidos no país (NARIMATSU, 2003). Possui as variedades Lanche, Combocó e Estepe (FURTADO, 1990; KOSIKOUSKI, 1982 apud NARIMATSU, 2003). É considerado um queijo semi-duro que apresenta como etapas distintas do processo de elaboração de queijos: obtenção de uma massa semi-cozida, com remoção parcial de soro, lavagem por adição de água quente, pré-prensagem, moldagem sob soro, prensagem, salga e maturação pelo tempo necessário para conseguir suas características específicas (pelo menos 25 dias) (SPADOTTI et al., 2003).

O queijo Prato é maturado por sessenta dias e este processo é importante para a configuração do sabor e textura próprios do queijo. A maturação ocorre primordialmente pela proteólise da caseína presente no leite. Nos produtos lácteos o amargor está relacionado à presença de peptídeos amargos e aminoácidos, resultante da hidrólise das proteínas do leite. Em queijos, o gosto amargo é descrito como um defeito resultante do lento acúmulo de peptídeos hidrofóbicos. O desenvolvimento do sabor amargo em queijos gera prejuízos à indústria queijeira por diminuir a aceitação do produto pelo consumidor. Dos queijos nacionais, o queijo Prato é o que sofre uma proteólise mais intensa e pode apresentar este defeito durante a maturação (AUGUSTO; QUEIROZ; VIOTTO, 2005).

Spadotti, Dornellas e Röig (2005) utilizaram a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) para descrever o perfil sensorial de queijo Prato obtido por alterações no processo tradicional na fabricação do mesmo: uso de leite concentrado por ultrafiltração, pré-fermentação de parte deste leite concentrado e variação no tipo de cozimento da massa (direto ou indireto), comparando os resultados com os de um queijo padrão. A aplicação da ADQ envolveu quatro etapas: seleção de equipe de provadores, a definição dos descritores que definiram as características de aparência, sabor e textura a serem avaliadas no queijo Prato,

treinamento e seleção final dos provadores, teste sensorial envolvendo a avaliação das amostras de queijos Pratos de diferentes tratamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tempo de estocagem sobre a quantificação de CMP em leite cru refrigerado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar o tempo de estocagem do leite cru refrigerado com a quantificação de CMP e a contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias e mesófilas aeróbias;

Correlacionar a contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias com o teor de soro, pela presença de CMP, com a acidez titulável e o pH;

Correlacionar a contagem de bactérias mesófilas aeróbias com o teor de soro, pela presença de CMP, com a acidez titulável e o pH;

Avaliar a influência do teor de soro sobre aspectos físico-químicos, de rendimento e sensoriais de queijo Prato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O trabalho foi realizado em um laticínio do município de Sanclerlândia, Estado de Goiás. Foi selecionado um tanque de estocagem horizontal de capacidade 20.000 L com leite refrigerado. Este tanque após enchido foi lacrado e acompanhado diariamente. Foi monitorada a temperatura e coletada amostras a cada 24 horas até completar 72 horas, sendo considerado tempo zero o momento em que o tanque de estocagem acabou de ser enchido (figura 1). Todas as análises foram feitas em triplicata.

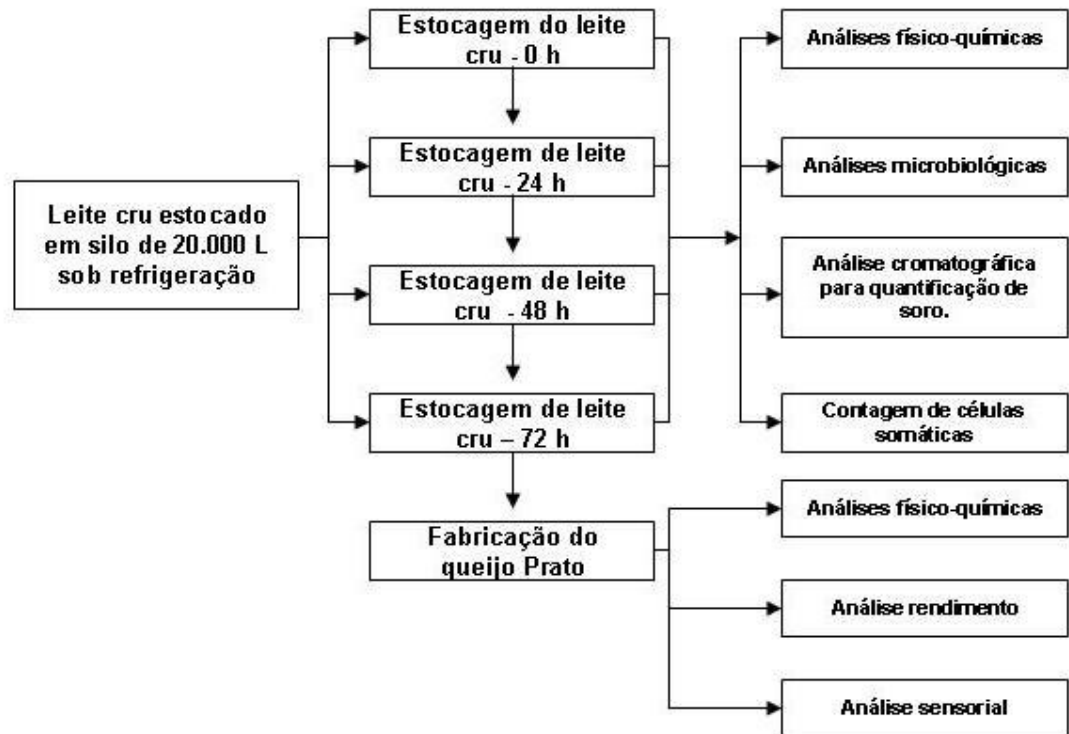


FIGURA 1 Fluxograma de condução do experimento.

Após a estocagem de 72 horas o leite cru refrigerado foi encaminhado para a produção de queijo Prato (figura 2).

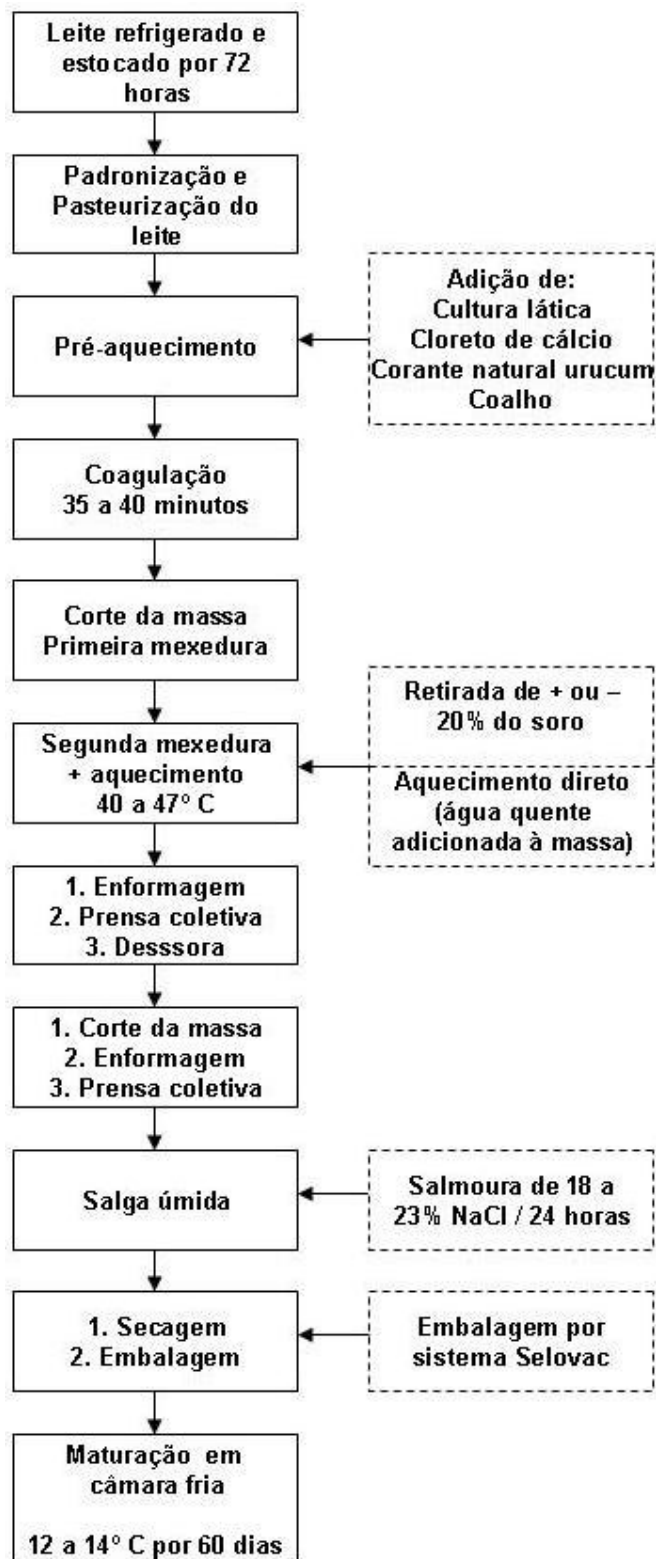


Figura 2 Fluxograma do processamento do queijo Prato fabricado por um laticínios no estado de Goiás laticínios com leite cru refrigerado estocado a 11 °C por 72 horas.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU

O leite cru refrigerado foi analisado, em termos físico-químicos, no primeiro dia da estocagem, tempo 0. Do balão onde estava estocado foram retiradas amostras representativas e após a homogeneização foram feitas as seguintes análises de acordo com a Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003 (BRASIL, 2003):

- Acidez titulável;
- Temperatura;
- pH;
- Teste do álcool / alizarol na concentração mínima de 72% v/v;
- Índice crioscópico;
- Densidade relativa a 15°C;
- Lipídios (método butirométrico);
- Proteína;
- Lactose.

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU

Foram feitas análises diárias, ao longo do tempo de estocagem, do leite cru refrigerado. Do tanque onde estava estocado o produto foram retiradas amostras representativas e após a homogeneização foram feitas as seguintes análises:

- Contagem de bactérias mesófilas aeróbias- contagem padrão em placas (APHA, 2001)
- Contagem de bactérias psicrotóxicas aeróbias (APHA, 2001).

4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Amostras de leite cru refrigerados foram homogeneizadas e coletadas no primeiro dia de estocagem (tempo 0) do tanque em que estavam estocados e após homogeneização foram adicionadas em kits composto por um tubo plástico e conservante e mantidas até a análise em refrigeração a 4° C. As análises foram realizadas em equipamento: Fossomatic 5000 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark) do Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária – UFG.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE SORO NO LEITE

Amostras de leite cru refrigerados foram coletadas diariamente do tanque em que estava estocado e após homogeneizadas foram congeladas. A metodologia de análise adotada foi conforme a preconizada na Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003 (BRASIL, 2003). A análise foi realizada em equipamento: Cromatografia líquida de Alto Desempenho – Varian Star do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos – UFG.

4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO PRATO

Amostras de produto industrializado a partir do leite cru refrigerado foram analisadas conforme a Instrução Normativa nº 22, 14 de abril de 2003 (BRASIL, 2003):

- Umidade;
- Cloreto;

Além destas, realizou-se análise de pH.

A avaliação de rendimento industrial foram adaptados de Silveira e Abreu (2003) e Spadoti et. al (2003) em que foi dividido o volume de leite utilizado no processamento pela soma da massa dos queijo, 100 Kg (após a salga). Rendimento ajustado - RAJ (SPADOTI et al., 2003) e o rendimento Van-Slyke que leva em consideração o percentual de gordura e de caseína do leite, a constante de perda de caseína durante a produção de queijo, 0,53, e a umidade do queijo em porcentagem (CANZIANE; GUIMARÃES, 2003).

4.7 ANÁLISE SENSORIAL DO QUEIJO PRATO

Amostras de queijo Prato foram analisadas pelo método da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) conforme Spadoti, Dornellas e Roig (2005) após 8 meses de estocagem em câmara fria a 2° C que foi adotado pela empresa fabricante, considera para o produto. Foram necessárias 4 etapas para aplicação da ADQ.

Na primeira etapa para a seleção de equipes de provadores 50 consumidores de queijo prato da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos foram submetidos a testes triangulares utilizando-se 3 marcas distintas de queijo Prato disponíveis no mercado goianiense. Quinze provadores que tiveram acerto acima de 88,9% das séries triangulares

apresentadas (apenas uma ou nenhuma série errada) foram selecionados para participarem de a definição dos descritores das amostras de queijo Prato.

Sob a supervisão de um líder foram definidos os descritores verbais que definiriam as características de aparência, sabor e textura a serem avaliadas nos queijos Pratos (Tabela 1) e esta foi a segunda etapa.

A terceira etapa foi o treinamento dos provadores quanto aos descritores da aparência, sabor e textura. Durante esta etapa os provadores foram submetidos aos testes de modo a avaliar a intensidade de cada atributo sensorial previamente delineado sobre o queijo Prato. Os painelistas usaram uma ficha de avaliação contendo os atributos sensoriais e suas respectivas escalas lineares de 9 cm ancoradas à esquerda, fraco (1 cm), e à direita, forte (9 cm). A definição dos descritores, a lista dos atributos e os referenciais adotados para o treinamento encontram-se na tabela 1. Durante os treinamentos os descritores dos atributos bem como os resultados das avaliações foram discutidos em grupo.

A aparência foi avaliada quanto a coloração. O sabor foi avaliado quanto a ácido, salgado e amargo. A textura quanto a elasticidade, dureza e maleabilidade. Com exceção do atributo elasticidade as amostras foram servidas em fatias de 2 cm x 2cm x 0,5 cm. Para a elasticidade, a amostra foi servida em fatia de 5 cm x 2 cm x 0,5 cm.

Após o treinamento foi feita a audiência final com os provadores analisando as amostras R1, R2 e R3 que se referiam respectivamente, nesta ordem, à repetição 1, 2 e 3 do experimento. Os queijos utilizados na avaliação sensorial foram escolhidos aleatoriamente no lote de queijos fabricados com o leite cru estocado sob refrigeração por 72 horas em cada repetição.

Realizou-se análise de variância univariada (ANOVA) foi calculada para cada atributo julgado e o nível de significância (p) para as valores $F_{\text{repetição/amostra}}$ foram computados pelo Excel (2000) conforme Laponni (2005).

TABELA 1 Definição de descritores e referências de extremos de escala adotados na análise descritiva quantitativa para queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado.

Atributos sensoriais	Definição	Referências de extremos de escala
Aparência		
1. Coloração	Intensidade da cor amarela	Forte: queijo Cheddar Fraco: queijo Mussarela
Sabor		
2. Ácido	Gosto primário promovido por soluções aquosas de substâncias ácidas, semelhante a ácido láctico.	Forte: iogurte natural Fraco: água
3. Salgado	Gosto primário promovido por soluções aquosas de substâncias salgadas, semelhante à solução de cloreto de sódio.	Forte: água (200mL) + sal(8g) Fraco: água (200 mL) + sal (5g)
4. Amargo	Gosto primários promovido por soluções aquosas de substâncias amargas, semelhante a solução de folhas de boldo.	Forte: chá forte de Boldo chileno Fraco: queijo Prato
Textura		
5. Elasticidade	Força necessária para “puxar” pelos extremos a fatia de queijo Prato de 5 cm x 2 cm x 0,5 cm sem se romper.	Forte: queijo Cheddar Fraco: queijo Minas Frescal
6. Dureza	Força necessária para promover deformação de uma fatia de queijo Prato de 2 cm x 2cm x 0,5 cm.	Forte: queijo Parmesão Fraco: queijo Mussarela
7. Maleabilidade	Capacidade de moldagem manual de uma fatia de queijo Prato de 2 cm x 2 cm x 0,5 cm.	Forte: queijo Prato Fraco: queijo Minas Frescal

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi realizado com 3 repetições e 4 tratamentos, sendo tratamento o tempo de estocagem (0, 24, 48 e 72 horas). Realizou-se análise de Regressão Linear.

Delineamento Inteiramente ao Acaso (DIC).

Os resultados foram analisados pelo módulo estatístico do programa EXCEL (2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE LEITE CRU

Os resultados das análises do leite utilizado no experimento podem ser vistos na tabela 2. Verifica-se que o leite atende aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51, anexo IV, quanto a crioscopia, densidade, gordura, extrato seco desengordurado e proteína.

TABELA 2 Resultados médios* das análises físico-químicas de leite cru refrigerado transportado a granel e recebido em um laticínios do Estado de Goiás no mês de Março de 2006.

Análises	Média*	Desvio padrão
Crioscopia (°H)	-0,533	0,0032
Densidade (g/mL)	1032,8	0,7211
Gordura (g/100g)	3,46	0,0192
Extato seco total (g/100g)	13,06	0,6243
EST desengordurado (g/100g)	9,59	0,5965
Proteína (g/100g)	3,34	0,0647
Lactose (g/100g)	4,50	0,0327
Umidade (g/100g)	86,94	0,6243
Temperatura (°C)	11,33	1,5275

*média de três repetições

A Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002) preconiza que no estabelecimento processador o leite cru refrigerado deve estar a temperatura de no máximo 10° C na recepção. Os valores encontrados ao longo do tempo de estocagem, tempo 0, 24, 48 e 72 horas, tabela 3, foram superiores ao limite definido em lei. Temperaturas acima do permitido em lei podem promover a liberação de enzimas proteolíticas por bactérias psicrotróficas aeróbias e a fermentação da lactose pelas bactérias mesófilas aeróbias. Não houve significativa redução de pH ao longo do tempo de estocagem, que poderia refletir sobre a elevação da acidez titulável porém, Guinot-thomas (1994) observou que psicrotróficos promovem abaixamento de pH do leite após quatro dias estocagem a 4° C, isto devido à liberação de lipases microbianas que elevam o teor de ácidos graxos livres e até mesmo pela fermentação da lactose com formação de ácido láctico. Pode-se inferir que o crescimento dos microrganismos psicrotróficos, tabela 6, podem ter sido responsáveis também pela elevação da acidez

titulável, que não foi significativa, em conjunto com a elevação da contagem de mesófilos aeróbios, tabela 5.

TABELA 3 Resultados médios* das análises físico-químicas realizadas em amostras de leite cru refrigerado coletadas ao longo do período de estocagem a ~ 11 °C.

Análises	Tempo de estocagem do leite (horas)							
	0		24		48		72	
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão
Temperatura °C	11,33	1,5275	11,67	2,3094	10,17	0,7638	11,67	1,1547
Acidez titulável °D	16,00	1,2019	17,89	0,8389	17,94	1,5123	18,33	2,0276
pH	6,72	0,0895	6,75	0,1002	6,71	0,1082	6,69	0,1318

*média de três repetições

Na análise de regressão constatou-se que a elevação da acidez e a redução do pH ao longo do tempo de estocagem não foram significativos ($p > 0,05$).

5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) DO LEITE CRU

Os resultados da CCS, tabela 4, mostram que o leite cru refrigerado analisado no momento da recepção atendia aos parâmetros legais estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002).

TABELA 4 Resultados médios* da contagem de células somáticas em leite cru refrigerado em um laticínios do Estado de Goiás no mês de Março de 2006.

Análise	Média*	Desvio padrão
CCS (cs / mL)	240.000	23,71

*média de três repetições

Baixa contagem de CCS pode indicar que as glândulas mamárias das vacas ordenhadas estavam em bom estado sanitário e deste modo não compromete na qualidade do leite e conseqüentemente no rendimento da produção de derivados desta matéria-prima (PAULA et al, 2004).

5.3 CONTAGEM MICROBIANA

5.3.1 Bactérias mesófilas aeróbias

Observa-se pela tabela 5, para os resultados encontrados da Contagem Padrão em Placas, que desde a recepção, os resultados foram inadequados em relação a Instrução Normativa nº 51 que preconiza o limite de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL no que se refere à contagem de bactérias mesófilas aeróbias. Tal resultado mostra que a estocagem não foi determinante para o crescimento da contagem de bactérias mesófilas aeróbias.

TABELA 5 Resultados médios* da contagem de bactérias mesófilas aeróbias ao longo do tempo de estocagem de leite cru refrigerado.

Tempo de estocagem (horas)	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias (UFC/mL)	Contagem de bactérias mesófilas aeróbias (log.UFC/mL)
0	$1,93 \times 10^6$	6,29
24	$1,45 \times 10^6$	6,16
48	$2,93 \times 10^6$	6,47
72	$3,67 \times 10^6$	6,56

*média das 3 repetições

Constatou-se que não houve significativa correlação ($p > 0,05$) entre contagem de bactérias mesófilas aeróbias e o tempo de estocagem de leite cru refrigerado, e a acidez titulável e nem com o percentual de soro. Existe significativa correlação ($p < 0,05$) dessa contagem com o abaixamento do pH.

A análise de regressão, figura 3, mostra correlação ($p < 0,05$) negativa e significativa entre a contagem de mesófilos aeróbios e o pH.

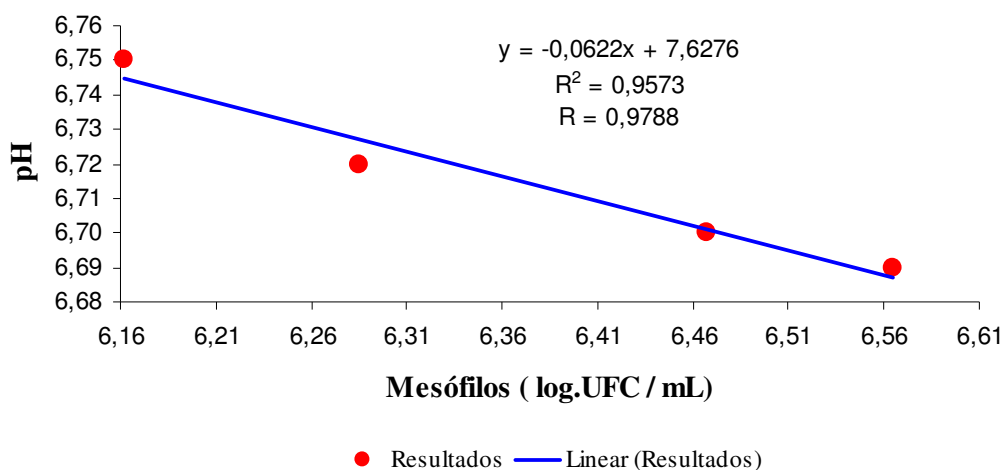


FIGURA 3 Evolução do pH em função da contagem de mesófilos aeróbios.

A temperatura aproximada de 11 °C usado para estocagem do leite cru refrigerado, tabela 3, em tanque horizontal pode ter propiciado condições para o crescimento de bactérias mesofílicas que desdobraram a lactose em ácido láctico com elevação da acidez titulável e o conseqüente decréscimo de pH. Após 72 horas de estocagem do leite cru refrigerado, a acidez titulável superou o limite fixado pela Instrução Normativa nº 51, tabela 3, que estabelece o limite de 14 a 18° D. Embora não tenha constatado correlação estatística entre a contagem de mesófilos aeróbios e acidez titulável o mesmo não se pode dizer para o pH que apresentou uma correlação positiva em leite cru refrigerado.

5.3.2 Bactérias psicrotróficas aeróbias

A contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias em leite cru refrigerado a aproximadamente 11 °C variou de $1,99 \times 10^5$ a $6,29 \times 10^5$ UFC/mL, tabela 6. Estes resultados foram diferentes das encontradas por Pinto, Martins e Vanetti (2006) em silos industriais obtiveram: $5,6 \times 10^5$ a $6,4 \times 10^6$ UFC/mL. Estas diferenças podem ser em função das distintas condições entre as indústrias, incluindo o tempo de refrigeração resultante do somatório de horas de refrigeração na fonte de produção, transporte até o posto e refrigeração, descarregamento-estocagem-carregamento no posto de refrigeração, transporte até a indústria, descarga estocagem na planta industrial, tipo de tanque de estocagem e temperatura de armazenamento.

TABELA 6 Resultados médios* da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias ao longo da estocagem do leite cru refrigerado.

Tempo de estocagem (horas)	Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias (UFC/mL)	Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias (log.UFC/mL)
0	$1,99 \times 10^5$	5,30
24	$2,11 \times 10^5$	5,32
48	$4,13 \times 10^5$	5,62
72	$6,29 \times 10^5$	5,80

*média de três repetições

Não houve correlação entre a contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias e a acidez titulável ($p > 0,05$) enquanto que para a concentração de soro observa-se uma significativa correlação ($p < 0,05$), figura 4. Embora os teores de soro tenham sido relativamente baixos, estes valores mostram que a estocagem do leite em más condições e por tempo longo compromete a qualidade da matéria-prima e de seus derivados.

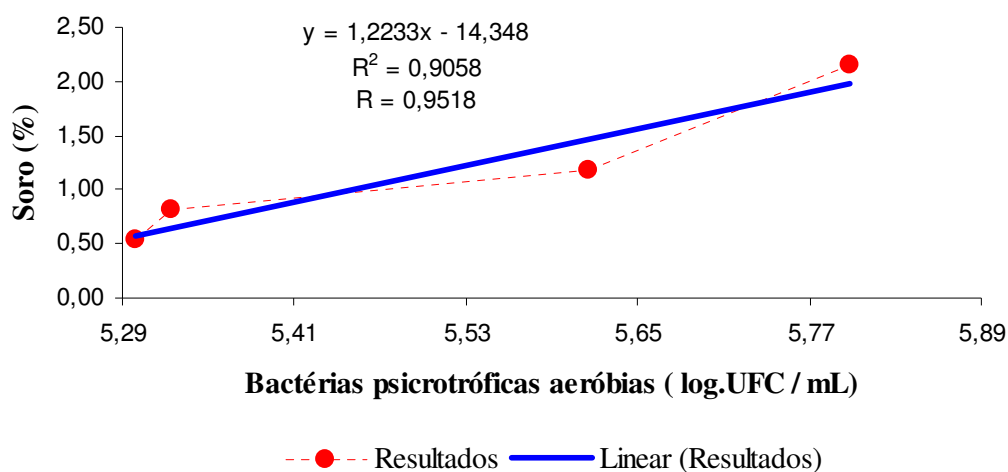


FIGURA 4 Percentual de soro em leite cru refrigerado em função da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias.

Constata-se que a reta, figura 4, pode ser utilizada para prever o percentual de soro a partir da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias pois a correlação foi significativa ($p < 0,05$).

Validada estatisticamente a equação da reta do gráfico pode então fornecer uma projeção do teor de soro na amostra de leite cru refrigerado mediante expansão da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias e daí obtém-se o respectivo percentual de soro conforme a figura 5.

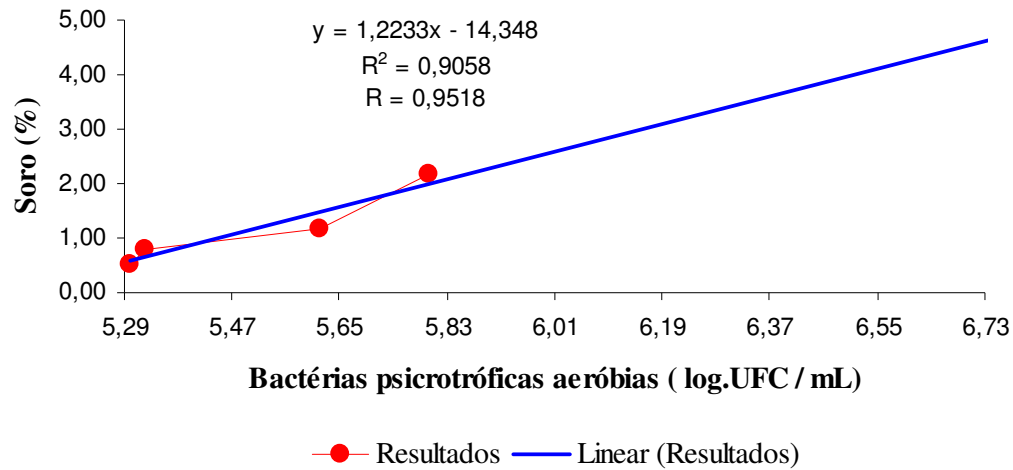


FIGURA 5 Prospectiva do percentual de soro em função da contagem de bactérias psicotróficas aeróbias em leite cru refrigerado estocado a 11 °C.

O crescimento de bactérias psicotróficas aeróbias ao longo do tempo da estocagem do leite cru refrigerado a ~11 °C (Figura 6).

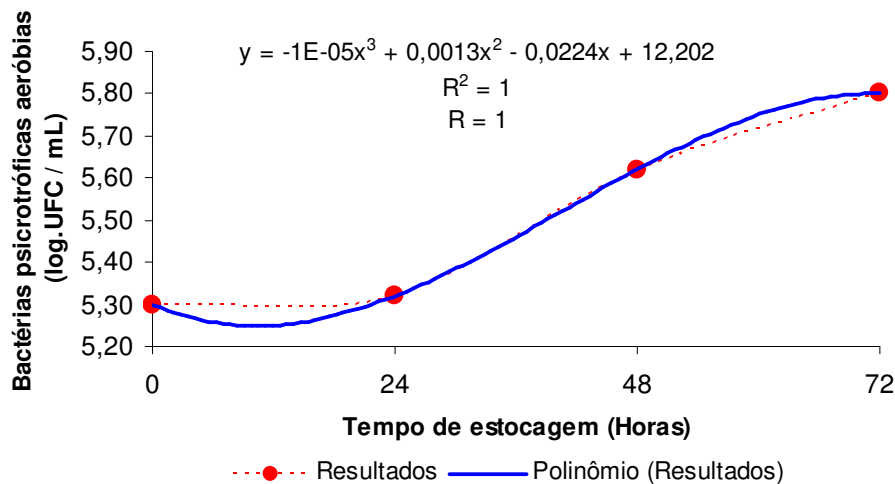


FIGURA 6 Influência do tempo de estocagem sob refrigeração a ~11 °C sobre a contagem de bactérias psicotróficas aeróbias.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE SORO NO LEITE

Para determinação do percentual do teor de soro mediante técnica cromatográfica em Cromatografia Líquida em Alto Desempenho (CLAD) é necessária a obtenção da curva

padrão e para isto foi utilizado área dos picos referentes ao CMP presente no soro e a respectiva concentração de soro. A curva padrão é apresentada na figura 7.

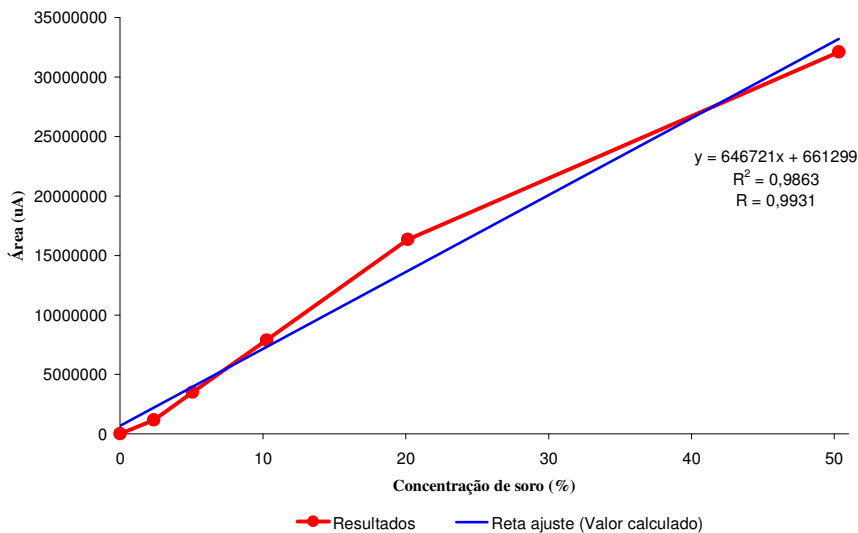


FIGURA 7 Curva padrão para determinação da concentração de soro em leite fluido.

A reta de ajuste obtida consegue prever a concentração de soro pela área, em uA, obtida dos picos do cromatograma referentes às amostras. Pela Análise de Regressão a correlação foi significativa ($p < 0,05$).

Com os resultados das áreas dos picos obtidos das amostras de leite cru refrigerado por meio de cromatograma plotou-se na equação da reta linear obtida, figura 7, para a obtenção do percentual de soro, tabela 7.

TABELA 7 Resultados médios* do teor de soro em leite cru refrigerado estocados a ~ 11 °C estocados por 72 horas.

Tempo de estocagem (horas)	Soro (%)
0	0,53
24	0,81
48	1,18
72	2,16

*média de três repetições

Nota-se que a partir de 48 horas de estocagem do leite cru sob refrigeração o limite regulamento pela Portaria nº 124 (BRASIL, 1991) está ultrapassado já que esta fixa como positivas aquelas provas que atingirem o limite de 1,0 %.

As causas prováveis da presença do soro na amostra podem ser devidas à ação de enzimas das bactérias psicrotróficas aeróbias e à presença de proteases naturais.

Na figura 8 pode ser vista a equação de regressão do percentual de soro ao longo do tempo de estocagem. Observa-se uma correlação positiva, ou seja, à medida que o tempo de estocagem aumentou o teor de soro também aumentou. Tal resultado é confirmado pelo crescimento de bactérias psicrotóficas aeróbias que aumentou ao longo do tempo de estocagem, figura 5 e 6.

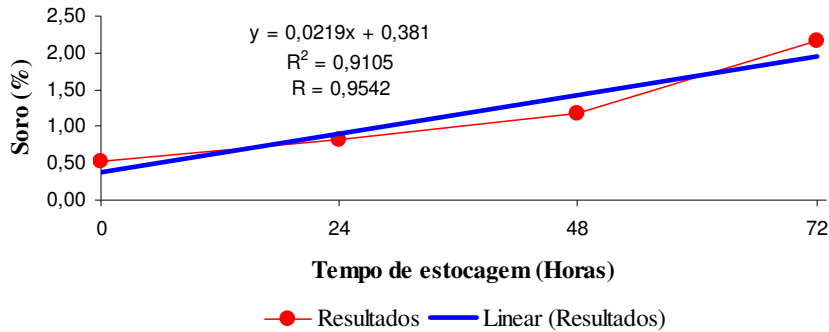


FIGURA 8 Evolução do percentual de soro em leite cru refrigerado ao longo do tempo de estocagem.

A equação da reta validada estatisticamente pode então nos fornecer uma projeção do teor de soro na amostra de leite cru refrigerado mediante prolongamento do tempo de estocagem. Na figura 9 tem-se o gráfico com a expansão do tempo de estocagem em até 120 horas e daí obtém-se o teor de soro respectivo ao tempo de estocagem.

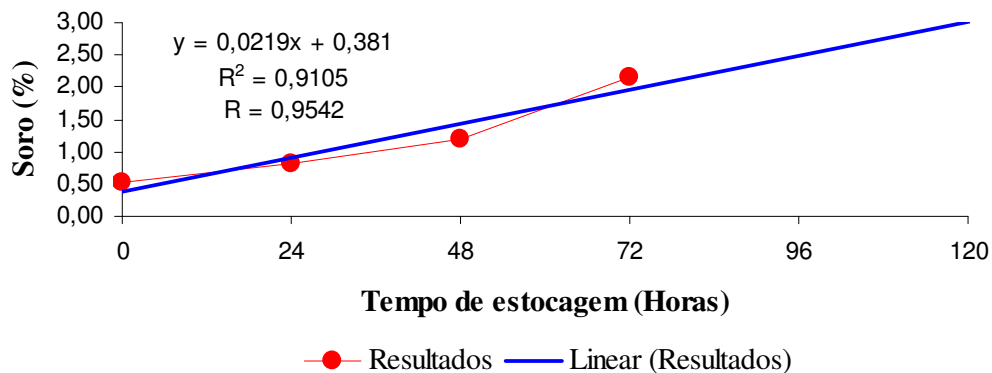


FIGURA 9 Prospectiva da evolução do teor de soro ao longo do tempo de estocagem.

5.5 ANÁLISE DO QUEIJO PRATO FABRICADO COM O LEITE CRU REFRIGERADO

5.5.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas do queijo Prato, ao fim dos 8 meses do prazo de validade, fabricado com o leite cru refrigerado estocado por 72 horas a aproximadamente 11 °C, podem ser vistas na tabela 8.

TABELA 8 Resultados médios das análises físico-químicas das amostras de queijo Prato.

Análises	Média	Desvio padrão
Umidade (%)	45,30	2,1931712
pH	5,93	0,1154701
Cloreto (%)	1,27	0,2081666

*média de três repetições

Furtado e Lourenço (1994) indica que a composição média do queijo Prato deve ser de 42 a 44% de umidade, 5,2 a 5,4 de pH e 1,6 a 1,9% de sal (cloreto de sódio). Em relação a estas recomendações nota-se que não houve correspondência com os resultados das amostras analisadas conforme a tabela 8. Observa-se que os valores encontrados nesse trabalho foram acima do preconizado pelos autores, e podem ser consequência de alterações que ocorrem nas proteínas do leite quando refrigerado por longo tempo, fazendo com que estas aumentem sua capacidade de retenção de água. Esse aumento na retenção de água pode levar o queijo a alterações de suas características desejáveis, como a consistência e sabor devido a maior e mais acelerada proteólise.

5.5.2 Rendimento industrial de queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado

Os resultados do rendimento queijo Prato (L/Kg), do rendimento ajustado (RAJ) e rendimento Van Slyke, tabela 9, contrastam com os valores encontrados por Spadoti et al. (2003) e por Silveira e Abreu (2003) quando fabricaram queijo Prato com leite pasteurizado pelo sistema HTST (alta temperatura, tempo rápido). Esta diferença pode ser devida às técnicas queijeiras empregadas na fabricação do queijo Prato.

Furtado e Lourenço (1994) considera adequado o rendimento de 9,0 e 9,5 L/Kg. Observa-se que o teor de umidade da amostra foi 7,28 % maior do que e o rendimento queijo

(L/Kg) foi 3,8% maior do que o proposto por Furtado e Lourenço (1994), e isto pode ser creditado à hidrólise da caseína (aumenta a superfície de exposição de peptídeos com capacidade de retenção de água) do leite cru refrigerado estocado a ~ 11 °C por 72 horas.

Os valores encontrados para as amostras de queijo Prato produzidas a partir do leite cru refrigerado sob estocagem por 72 horas foram melhores em relação à recomendação de Canziane e Guimarães (2003), já que, com menor quantidade de leite (L) produziu-se quantidades iguais de queijo Prato (Kg).

TABELA 9 Resultados médios* do rendimento industrial queijo Prato fabricado com leite cru refrigerado estocado por 72 horas a ~11 °C.

Análises	Média	Desvio padrão
Rendimento queijo (L/kg)	8,660	0,3195309
Rendimento ajustado - RAJ (L/Kg)	8,375	0,6184872
Rendimento Van Slyke (L/kg)	8,931	0,3160949

*média de três repetições

5.5.3 Análise descritiva quantitativa

A tabela 10 apresenta os resultados da Análise Descritiva Quantitativa de queijos Pratos fabricados com leite refrigerado estocado por 72 horas. Os queijos analisados se referem aos lotes fabricados em cada repetição deste trabalho sendo codificados como R1, R2 e R3.

TABELA 10 Pontuação média atribuída por 15 provadores às propriedades sensoriais aparência, sabor e textura de queijos Pratos fabricados com leite refrigerado a 11 °C por 72 horas pela Análise Descritiva Quantitativa.

	Amostra R1	Amostra R2	Amostra R3
Aparência			
Coloração	5,65 ^a	6,31 ^a	5,50 ^a
Sabor			
Ácido	2,49 ^a	2,49 ^a	1,85 ^a
Salgado	4,21 ^a	2,85 ^b	3,24 ^b
Amargo	3,85 ^a	3,63 ^a	1,77 ^b
Textura			
Elasticidade	7,14 ^b	8,9 ^a	8,23 ^a
Dureza	1,76 ^b	2,76 ^a	3,24 ^a
Maleabilidade	3,66 ^b	7,22 ^a	3,64 ^b

Obs. Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem significativamente entre si (p>0,05).

De acordo com a avaliação dos provadores não houve diferença significativa entre as amostras R1, R2 e R3 para os atributos coloração e sabor ácido, tabela 10.

Quanto ao sabor salgado, houve diferença significativa, a nível de 5%, da amostra R1 em relação às amostras R2 e R3. Possivelmente esta diferença se deu em função da etapa da salga pela concentração da salmoura e tempo de exposição.

Em relação ao sabor amargo, houve diferença significativa, a nível de 5% ($p < 0,05$), das amostras R1 e R2 em relação a amostra R3 e pode ser explicado pelo nível de contaminação por bactérias psicrófilas aeróbias do leite cru refrigerado correspondente à R1 e R2. Estas repetições, R1 e R2, foram a que mais contribuíram com a redução da qualidade microbiológica em termos de contagem de bactérias psicrófilas aeróbias, tabela 6. A repetição R3 foi a que mais contribuiu com a redução da qualidade microbiológica em termos de contagem de bactérias mesófilas aeróbias, tabela 5.

Considerando que as enzimas proteolíticas liberados pelas bactérias psicrófilas podem ter hidrolisado proteínas do leite com liberação de peptídeos amargos no leite, e ainda acelerado a hidrólise das proteínas no queijo. A proteólise, que leva a liberação de peptídeos e aminoácidos (PINTO, 2004), pode ter sido mais intensa nas amostras R1 e R2 e isto deve ter ocorrido em função da contaminação por bactérias psicrófilas aeróbias, tabela 6, no leite cru.

Sobre os aspectos relativos à elasticidade e dureza, a nível de 5% de significância, houve diferença entre a amostra R1 com relação às amostras R2 e R3. Isso não se pode ser em função da estocagem refrigerada a ~ 11 °C por 72 horas do leite cru.

Também em relação a maleabilidade não se pode relacionar com a estocagem refrigerada. O leite da repetição 1 e o leite da repetição 3 contribuíram, respectivamente, para a contagem de bactérias psicrófilas aeróbias e contagem de bactérias mesófilas aeróbias.

6 CONCLUSÕES

6.1 O leite cru refrigerado estocado por 72 horas apresentou valores de CMP acima do permitido pela legislação, portanto a estocagem do leite por longo período pode produzir resultado falso positivo quanto à fraude do soro;

6.2 Houve aumento na contagem de bactérias psicotróficas aeróbias ao longo da estocagem de leite refrigerado por 72 horas;

6.3 Bactérias psicotróficas aeróbias não modificaram o pH do leite;

6.4 A estocagem refrigerada de leite cru interferiu no aumento do rendimento industrial da fabricação de queijo Prato pela maior retenção de água;

6.5 A contagem de bactérias psicotróficas aeróbias no leite cru refrigerado a aproximadamente 11 °C interferiu no maior sabor amargo do queijo Prato fabricado com este leite;

6.6 A contagem de bactérias mesófilas aeróbias e de bactérias psicotróficas aeróbias não interferiram na dureza e elasticidade.

REFERÊNCIAS

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

ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho. Filtração gélica (GF-HPLC)**. 1992. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

ASSUMPÇÃO, E.G.; PICOLLI-VALE, R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus Aureus* na linha de processamento de queijo Prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 55, n. 3, 2003.

AUGUSTO, M.M.M.; QUEIROZ, M.I.; VIOTTO, W.H. Seleção e treinamento de julgadores para avaliação do gosto amargo do queijo Prato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.4, p.849-852, 2005.

BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. Dairy Microbiology: The microbiology of milk. 2.ed. Barking: **Elsevier Science Publishers**, 1990, cap. 5, p. 163-208.

BRANDÃO, S.C.C.; PARREIRA, J.F.M.; ALVIM, T.C. Detecção da adição de soro de queijo ao leite. **Anais do Décimo Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, 41 p., 1988.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, mar. 1952. Seção I.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Decreto nº 923, de 10 de outubro de 1969. Dispõe sobre a regulamentação da comercialização de leite cru. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 05 fev. 1970.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002. Seção I.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Portaria nº 124, de 23 de setembro de 1991. Aprova os métodos analíticos qualitativos e quantitativos de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 20561, 24 set. 1991. Seção I.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Instrução normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Métodos

analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 3, 2 mai 2003. Seção I.

BRITO, M. A. V. P. Conceitos básicos de qualidade, sanidade do gado leiteiro. Minas Gerais: **Embrapa**, 1999.

BUENO, V. F. B. **Contagem celular somática e bacteriana total do leite cru refrigerado em tanques de expansão de uso individual no estado de Goiás**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.

CANZIANI, J.R.; GUIMARÃES, V.D.A. Manual de instruções do conseleite. Senar, Curitiba, p.89-91, 2003.

CELESTINO, L. E.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. **International Dairy Journal**, IRELAND, n. 7, p. 119-127, 1997.

DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. 1996. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p., 2006.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: **Lemos Editorial**, 2000, p. 175.

FONTES, I. M. **Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e de alguns fatores que influenciam a qualidade e a quantidade do leite cru bubalino da bacia leiteira de Goiânia**. 1996. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1996.

FURLANETTI, A.M.; PRATA, L.F.. Free and total CMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.supl, p.121-125, 2003.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO, J.P.M. Tecnologia de queijos. **Dipemar**, São Paulo, 1.ed, p. 90-92, 1994.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; LAURENF, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4° C: Effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, IRELAND, n. 5, p. 211-223, 1994.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; ROUX, Y. L.; LAURENF, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4° C: Effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, IRELAND, n. 5, p. 685-697, 1994.

GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; GOMES, J. F.; JÚNIOR, W. S.; SILVA, M. A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos

meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, PIRACICABA, v. 33, n. 6, p. 1531-1543, 2004.

HOGAN, J.S.; HOBLET, K.H.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; LEIDER, L.E.; BROCKET, B.L.; CONRAD, H.R. Bacterial and somatic cell counts in bulk tank milk from nine well managed herds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.51, n.12, p.930-934, 1988.

HIDAMAKA, A.W.; WILBEY, R.A.; LEWIS, M.J.; KUO, A.W. Manufacture of heat and acid coagulated cheese from ultrafiltered milk retentates. **Food Research International**, n. 34, p. 197-205, 2001.

ROSSI, O. D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; BÜRGER, K.P.; CARDOZO, M.V.; CORTEZ, A.L.L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivo do instituto de biologia**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2006.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando Excel**. Rio de Janeiro: Editora Campus, 2005. 476 p.

LARSEN, L. B.; RASMUSSEN, M. D.; BJERRING, M.; NIELSENA, J. H. Proteases and protein degradation in milk from cows infected with *Streptococcus uberis*. **International Dairy Journal**, Ireland, v. 33, n. 14, p. 899-907, 2004.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.

MIRALLES, B.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2813-2817, 2003.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In. ANAIS DO II LEITE-SUL: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, Maringá, p. 206-217, 2002.

MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Raw milk bacteria tests and elevated bacteria counts on the farm: a review. In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998, Merida. **Proceedings...**Merida: [s.n.], 1998. p.232-235.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J.R.F.; SPADOTI, L.M.; PIZAIA, P.D.; ROIG, S.M.; Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.supl, p.177-182, 2003.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 2005.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; CARVALHO, C.M. Tratamento térmico de leite acondicionado em filme plástico em banho-maria. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.51, n.1, 1994.

PAULA, M. C.; RIBAS, N. P.; MONARDES, H. G.; ARCE, J. E.; COTARELLI, U. V. Contagem de células somáticas em amostras de leite **Revista Brasileira de Zootecnia**, PIRACICABA, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

PEREIRA, A. R.; PRADA E SILVA, L.F.; MOLON, L.K.; MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G. Efeito do nível das células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.36, n.3, p., 1999.

PRADA E SILVA, L.F.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRÍES, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 4, 2000.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 2004. 97 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

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

PRATA, L.F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP, UNESP, p. 287, 2001.

ROGICK, F. A. Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 36, n. 23-25, p. 37-39, 1981.

RYAN, C.; MA, Y.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M.A.; BOOR, K.J.. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal Dairy Science**, v.83, p.264-274, 2000.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; MÜLLER, E.E.; FERREIRA, M.A.; MORAES, L. B.; PEREIRA, M.S.; GUSMÃO, V.V..Milk contaminantion in differents points of the dairy process: mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. **Semina: Ciência Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 349-358, 2004.

SANTOS, D. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite recebido por uma indústria de laticínios no Planalto Catarinense. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 67-68, 2002.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicrotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. **Boletim da SBCTA**, v.33, n.2, p.129-138, 1999.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal Dairy Science**, London, v.86, n.8, p.2491, 2003.

SILVA, P.D.L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru refrigerado**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SILVEIRA, P.R.; ABREU, L.R. Rendimento e composição química do queijo Prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HSTS e injeção direta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p.1340–1347, 2003.

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

SPADOTTI, L.M.; DORNELLAS, J.R.F.; PETENATE, A.J.; ROIG, S.M. Avaliação do rendimento do queijo tipo Prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 492-499, 2003.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy Chemistry and Physics**. New York, John Wiley and Son. 467 p., 1984.

VILELA, S.C. **Deteccion de suero de queseria agregado a leche pasteurizado y leche em polvo**. 1987. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Austral de Chile, Santiago, 1987.

ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAIMUNDO, N.K..Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Piracicaba, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

APÊNDICE A – Imagens do fluxograma de fabricação de queijo Prato



Recepção de leite cru



Recepção de leite cru



Resfriador de leite cru (4 °C)



Estocagem em tanque horizontal isotérmico de leite cru



Padronização de leite cru



Pasteurizador de leite



Pasteurização do leite



Tanque de fabricação de queijo



Enchimento do tanque de fabricação de queijo



Coagulação / corte / dessoragem



Prensagem da massa de queijo



Retirada da Prensa da massa de queijo

APÊNDICE B – Continuação de imagens do fluxograma de fabricação de queijo Prato



Massa de queijo prestes a ser cortada



Massa de queijo cortada



Enformagem dos pedaços de queijo



Prensagem do queijo



Peças de queijo em processo de salga



Peças de queijo após a salga



Embalagem do queijo em material termoencolhível



Peças de queijo em câmara de maturação por 60 dias



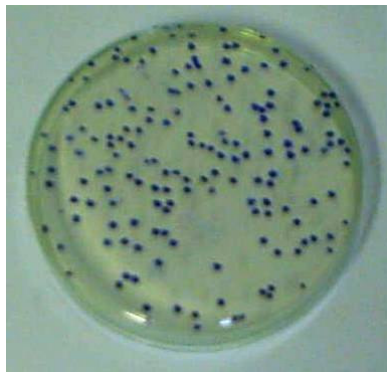
Após maturação os queijos vão para expedição



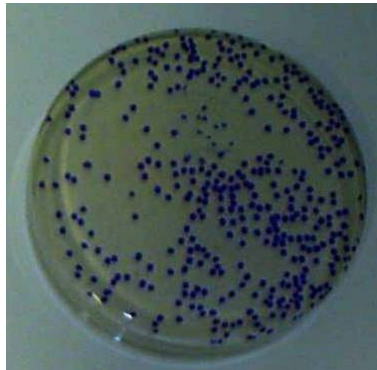
Expedição das peças de queijo

APÊNDICE C – Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias

Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias em diluição a 10^{-5} em ágar padrão



Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias em diluição a 10^{-4} em ágar padrão



Contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias em diluição a 10^{-3} em ágar padrão

APÊNDICE E – Imagens da análise descritiva quantitativa (ADQ) das amostras de queijo Prato do projeto



Amostras de queijo Prato preparadas para a Análise Descritiva Quantitativa

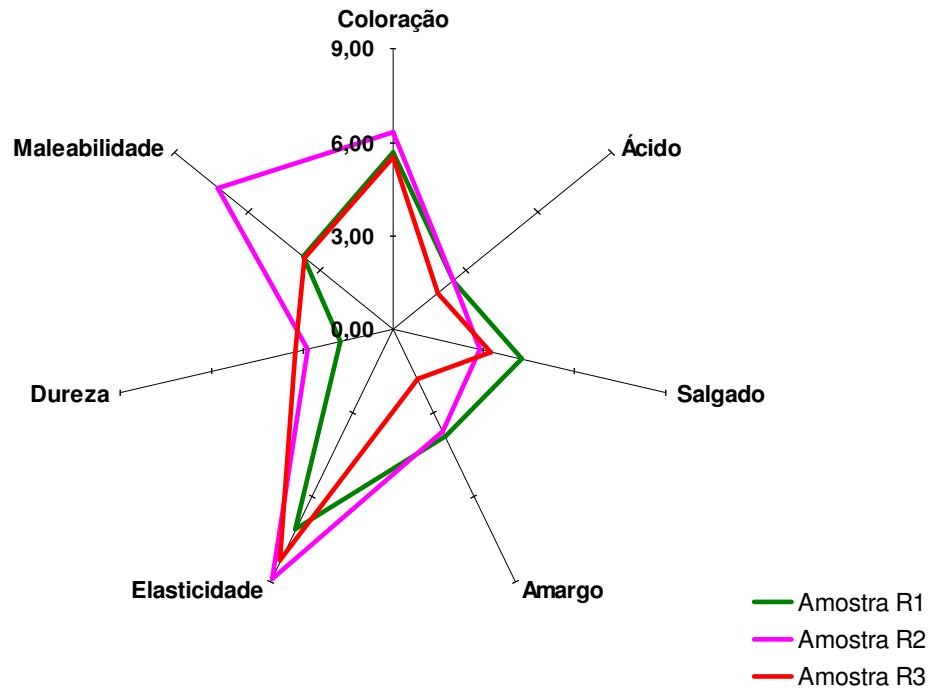


Entrega das amostras de queijo Prato aos painelistas de análise sensorial.



Análise sensorial de amostras de queijo Prato por um dos painelistas.

APÊNDICE F – Representação gráfica dos resultados da análise descritiva quantitativa (ADQ) dos queijos obtidos das matérias-primas oriundas das repetições do processo de estocagem de leite cru refrigerado



APÊNDICE G – Tabelas ANOVA das análises de regressão

Influência da contagem de bactérias mesófilas aeróbias sobre o pH

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,00201205	0,00201205	45,7529169	0,02116511
Resíduo	2	8,7953E-05	4,3976E-05		
Total	3	0,0021			

Influência da contagem de bactérias psicotróficas aeróbias sobre o percentual de soro.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,37633592	1,37633592	19,2408318	0,04824282
Resíduo	2	0,14306408	0,07153204		
Total	3	1,5194			

Curva padrão para determinação da concentração de soro

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	7,44E+14	7,43928E+14	287,3303315	0,0000710196
Resíduo	4	1,04E+13	2,5891E+12		
Total	5	7,54E+14			

Influência do tempo de estocagem a ~ 11 °C sobre o percentual de soro

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,38338	1,38338	20,340832	0,045810386
Resíduo	2	0,13602	0,06801		
Total	3	1,5194			

APÊNDICE H – Tabelas ANOVA da análise descritiva quantitativa (ADQ)

Atributo sensorial coloração

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5,16047619	2	2,580238095	1,884292325	0,16551018	3,238096135
Dentro dos grupos	53,40428571	39	1,369340659			
Total	58,5647619	41				

Atributo sensorial ácido

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,814761905	2	1,907380952	0,508317145	0,605436989	3,238096135
Dentro dos grupos	146,3414286	39	3,752344322			
Total	150,1561905	41				

Atributo sensorial salgado

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	13,84904762	2	6,92452381	4,601852528	0,016058007	3,238096135
Dentro dos grupos	58,68428571	39	1,504725275			
Total	72,53333333	41				

Atributo sensorial amargo

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	36,59571429	2	18,29785714	11,21056352	0,000142417	3,238096135
Dentro dos grupos	63,65571429	39	1,632197802			
Total	100,2514286	41				

Atributo sensorial elasticidade

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	22,20333333	2	11,10166667	4,715330341	0,014652515	3,238096135
Dentro dos grupos	91,82071429	39	2,354377289			
Total	114,0240476	41				

Atributo sensorial dureza

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	16,06857143	2	8,034285714	4,747326956	0,014280042	3,238096135
Dentro dos grupos	66,00285714	39	1,692380952			
Total	82,07142857	41				

Atributo sensorial maleabilidade

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	119,2890476	2	59,64452381	13,24000472	4,08921E-05	3,238096135
Dentro dos grupos	175,69	39	4,504871795			
Total	294,9790476	41				

APÊNDICE I – Cromatograma dos picos de detecção de CMP em leite cru refrigerado estocado por 72 horas

