

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO LEITE  
NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO  
IOGURTE NATURAL**

Autora: Kênia Borges de Oliveira  
Orientador: Dr. Marco Antônio Pereira da Silva  
Coorientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido

Rio Verde – GO  
julho - 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO LEITE  
NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO  
IOGURTE NATURAL**

Autora: Kênia Borges de Oliveira  
Orientador: Dr. Marco Antônio Pereira da Silva  
Coorientadora: Dra. Geovana Rocha Plácido

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde – Área de concentração Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

Rio Verde – GO  
julho - 2015

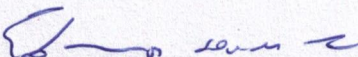
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

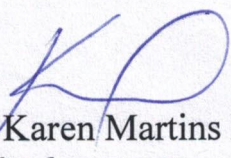
**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO LEITE  
NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO IOGURTE  
NATURAL**

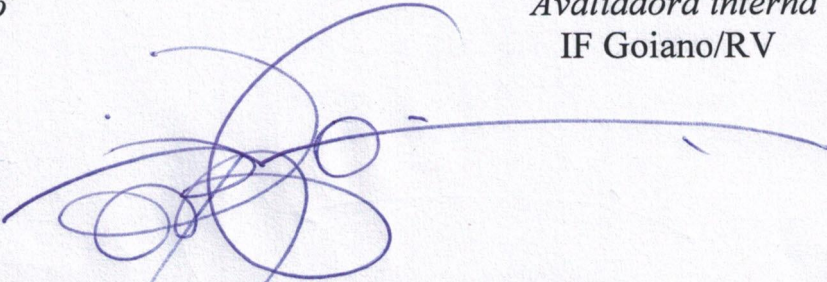
Autora: Kênia Borges de Oliveira  
Orientador: Marco Antônio Pereira da Silva

*TITULAÇÃO:* Mestre em Zootecnia – Área de concentração Zootecnia  
– Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

APROVADA em 03 de julho de 2015.

  
Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau  
*Avaliador externo*  
UFG/Goiânia

  
Prof. Dr.ª Karen Martins Leão  
*Avaliadora interna*  
IF Goiano/RV

  
Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da Silva  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

*“Aos meus pais Alcino Rosa de Oliveira e Jeroni Borges de Oliveira, aos meus irmãos Kézia, Kelly, Keila e Samuel, pelo amor, carinho e confiança, por todo o apoio e palavras de incentivo. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho”*

*Dedico*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por nunca me abandonar, por sua fidelidade e amor incondicional.

Aos meus Pais Alcino Rosa de Oliveira e Jeroni Borges de Oliveira, aos meus queridos irmãos Kézia, Kelly, Keila e Samuel, por tudo. Amo muito vocês e sei que não mediram esforços para me ajudar nessa conquista.

Ao meu querido orientador Dr. Marco Antônio Pereira da Silva, por sua dedicação e apoio. Serei eternamente grata pelos valiosos ensinamentos, pela excelente orientação e pelos bons exemplos de conduta ética na vida profissional, pelo amigo e companheiro. Agradeço as horas de almoço, sono e privação do âmbito familiar dedicadas à docência e à pesquisa, além da constante preocupação com o bem-estar de todos os seus pós-graduandos, bolsistas e estagiários.

À Dra. Geovana Rocha Plácido, minha coorientadora, que está presente na minha vida desde a graduação. Aprendi muito com você.

À Dra. Karen Martins Leão, pelos conselhos aprendizado e apoio durante esse período de convivência no Mestrado.

Ao Dr. Edmar Soares Nicolau, pela presteza na correção e participação na banca de defesa da minha dissertação.

À equipe do Laboratório de Produtos de Origem Animal, que, direta, ou indiretamente, ajudou na realização da minha pesquisa.

Em especial, agradeço às minhas amigas Juliana Célia Aparecida, Diene Gonçalves Souza, Lígia Campos de Moura, Jéssica Leal e Freitas Souza e Maria Siqueira de Lima.

Aos colegas de Laboratório Ruthelle, Guilherme, Thiago, Gustavo, Rânio, às minhas colegas Núbia, Verônica, Yasmine, Laís, Ana Rízia e Marília.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg), pela bolsa de Mestrado concedida e pelo incentivo à pesquisa no Estado de Goiás.

À Capes, CNPq e Finep, pelo apoio financeiro à realização da pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

# ÍNDICE

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4.1 Método de conservação do leite.....	16
4.2 Refrigeração do leite.....	17
4.3 Microrganismos deterioradores do leite.....	18
4.4 Microrganismos Psicotróficos em leite e derivados.....	20
4.5 Qualidade do leite e derivados sob refrigeração.....	21
4.6 Infravermelho.....	23
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE IOGURTES NATURAIS.....	29
Resumo.....	29
Abstract.....	29
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E METÓDOS.....	31
2.1 Coleta das amostras.....	31
2.2 Avaliação do pH e acidez titulável.....	32
2.3 Viscosidade.....	32
2.4 Contagem de microrganismos psicrotróficos.....	33
2.5 Rendimento em massa.....	33
2.6 Elaboração do iogurte.....	33
2.6.1 Fermentação.....	33
2.7 Avaliação da qualidade do iogurte.....	34
2.7.1 Avaliação do pH e acidez titulável.....	34
2.7.2 Viscosidade.....	34
2.7.3 Viabilidade de bactérias lácticas.....	34
2.7.4 Contagem de microrganismos psicrotróficos.....	35
2.7.5 Composição centesimal.....	35
2.7.6 Análise de espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.....	35
2.8 Análise Estatística.....	36
3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	36
4 CONCLUSÃO.....	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
6 ANEXOS.....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>TABELA 1</b> - Limites aproximados para as regiões do Infravermelho.....	23
<b>TABELA 2</b> - Valores médios do rendimento em massa do leite refrigerado até 72 horas.....	39
<b>TABELA 3</b> - Valores médios de matéria seca (%), cinzas (%), proteína (%) e gordura (%) de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.....	44

**ÍNDICE DE QUADROS E FIGURAS**

	Página
<b>QUADRO 1</b> - Requisitos da contagem padrão em placas e contagem de células somáticas do leite refrigerado a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite.....	22
<b>FIGURA 1</b> - Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e contagem de psicotróficos do leite refrigerado até 72 horas.....	37
<b>FIGURA 2</b> - Cinética da fermentação de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.....	40
<b>FIGURA 3</b> - Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e bactérias lácticas viáveis (D) de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.....	42
<b>FIGURA 4</b> - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.....	45
<b>FIGURA 5</b> - Envase dos iogurtes.....	52
<b>FIGURA 6</b> – Contagem de microrganismos psicotróficos.....	52
<b>FIGURA 7</b> – Avaliação do rendimento.....	53



## **LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES**

% - Porcentagem  
APH - alta pressão hidrostática  
CBT - Contagem bacteriana total  
CCS - Contagem de células somáticas  
cm - Centímetros  
FIR - Far Infrared  
g - Gramas  
GO - Goiás  
HTST - High Temperature and Short Time  
IRMA - Infrared Milk Analyser  
IN 62 - Instrução normativa número 62  
IV - Infravermelho  
kg - Quilograma  
LTLT - Low Temperature and Long Time  
L - Litros  
MIR - Middle Infrared  
m/v - Massa por volume  
mL - Mililitros  
mm - Milímetro  
MPa - mega pascal  
NaOH - Hidróxido de sódio  
nm - Nanômetro  
NIR - Near Infrared  
°C - Grau Celsius  
PCA - ágar padrão para contagem  
pH - Potencial hidrogeniônico  
rpm - Rotação por minuto  
S - Segundo  
T - Tempo  
UAT - Ultra Alta Temperatura  
UFC - Unidades formadoras de colônia  
UHT - Ultra High Temperature

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos, porém o leite não tem recebido a devida atenção no campo político, apesar do seu importante papel na alimentação da população (ZENI et al., 2013).

O leite, devido à disponibilidade de nutrientes, é um alimento vulnerável às alterações físico-químicas e deterioração por microrganismos que encontram condições favoráveis para multiplicação (CATÃO et al., 2001; ZOCHE et al., 2002; SANTIAGO et al., 2011; SILVEIRA & BERTAGNOLLI, 2014). Dois grupos de microrganismos merecem destaque na contaminação do leite: os microrganismos denominados não patogênicos, que alteram as propriedades do leite pelo aumento da acidez ou pela produção de enzimas, e os patogênicos, responsáveis por toxi-infecções alimentares e que podem estar presentes no leite cru (MORAES et al., 2005).

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 (PINTO et al., 2006). O número de bactérias psicrófilas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas da produção e ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado (SANTOS et al., 2013).

A presença e a multiplicação de microrganismos ou de enzimas sobre os componentes lácteos podem promover alterações no leite, comprometendo sua qualidade. Esses defeitos incluem, ainda, sabores e aromas indesejáveis, limitam a durabilidade e interferem nos processos tecnológicos, reduzindo o rendimento. Consequentemente são gerados problemas de ordem econômica e de saúde pública (ACURI et al., 2006).

O iogurte é o produto obtido da fermentação ácido láctica, adicionado de cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Sua produção tem como parâmetros microbiológicos a verificação e a contagem de coliformes totais e termotolerantes, bolores, leveduras e a enumeração de bactérias ácido lácticas viáveis (BRASIL, 2007).

A alegação para produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do microrganismo (probiótico) presente que contribui para o equilíbrio da microbiota

intestinal. Também deve ser declarado que o consumo do produto deve estar associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. Os microrganismos dos cultivos utilizados devem ser viáveis e ativos e estar em concentração igual ou superior a  $10^7$  UFC/g no produto final e durante seu prazo de validade, e a acidez deve estar entre 0,6 e 1,5g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2007).

Os conhecimentos gerados a respeito da influência de longos períodos de armazenagem após o processamento sobre os iogurtes têm sido extremamente importantes para que se possam obter informações sobre sua vida de prateleira, demonstrar características físicas, químicas ou sensoriais aceitáveis para o consumo e determinar a viabilidade das bactérias lácticas (PEREZ et al., 2007).

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 out.2007. Seção 1, p. 5, 2007.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Cienc. Tecnol. Aliment.** 2001;21(3):281-7.

MORAES, C. R.; FUENTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG A. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Sci Vet.** 2005;33(3):259-64.

PEREZ, K. J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa de microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. **Alim. Nutr.** Araraquara v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 2007.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Cienc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

SANTIAGO, B.T.; PIRES, C.V.; COSTA SOBRINHO, P.S.; SANTOS, A.S.; SANTOS, J. M. Avaliação físico-química, microbiológica e contagem de células somáticas de leites pasteurizados comercializados no município de Diamantina-Mg. **Alim Nutr.** 2011;22(1):39-44.

SANTOS, A.S.; PIRES, C.V.; SANTOS, J.M.; COSTA SOBRINHO, P.S. Crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. **Alim.Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, jul./set. 2013.

SILVEIRA, M. L. R. ; BERTAGNOLLI, S. M. M. . Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vig Sanit em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, p. 75-80, 2014.

ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Influência dos microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência** - ACET, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61 -70 jan./jun. 2013.

ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V. C.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T.

M.; RAYMUNDO N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Arch Vet Sci.** 2002;7(2):59-67.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a influência da refrigeração nas características físico-químicas e microbiológicas do leite e do iogurte.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a qualidade do leite cru em função do tempo de refrigeração de zero, 24, 48 e 72 horas de estocagem através do pH, acidez titulável, rendimento de massa, viscosidade e crescimento de microrganismos psicrotróficos.

Identificar os parâmetros de qualidade dos iogurtes processados com leite refrigerado através da cinética de fermentação e das análises de pH, acidez titulável, viscosidade, crescimento de microrganismos psicrotróficos e viabilidade de bactérias lácticas durante o armazenamento por 1, 8, 15 22 e 29 dias.

Avaliar o teor de proteínas, lipídeos, cinzas, matéria seca e análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho no oitavo dia após a elaboração dos iogurtes.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Métodos de Conservação do Leite

Os métodos de conservação são fundamentais para diminuir, ou até mesmo eliminar, os microrganismos deterioradores do leite, proporcionando melhor qualidade nutricional ao produto, maior vida de prateleira e maior segurança alimentar aos consumidores (MENEZES et al., 2014).

A microfiltração é uma técnica não térmica de processamento do leite fluido que utiliza membranas para concentração e/ou separação de certos constituintes do leite e tem por base a permeabilidade seletiva de um ou mais constituintes através da membrana (CHERYAN, 1998). A microfiltração, seguida da pasteurização, pode ser uma alternativa para prolongar a vida de prateleira do leite pela remoção de microrganismos e células somáticas presentes no leite cru (ANTUNES, 2014).

A pasteurização lenta (Low Temperature and Long Time - LTLT) consiste no aquecimento do leite à temperatura de 62°C a 65°C por 30 minutos (TRONCO, 2010). A pasteurização rápida HTST (High Temperature and Short Time) consiste no aquecimento do leite à temperatura de 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos. Ambas as pasteurizações são seguidas de refrigeração com temperatura de saída do leite não superior a 4°C (BRASIL, 2011). O leite UHT (Ultra High Temperature) ou UAT (Ultra Alta Temperatura) é obtido pelo processo de Temperatura Ultra Alta de Pasteurização. O Leite é homogeneizado e submetido a uma temperatura de 130°C a 150°C, entre 2 e 4 segundos, e imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C (TRONCO, 2010).

A liofilização é um processo de conservação de produtos biológicos, isento de conservantes ou produtos químicos, em que o leite é congelado e submetido a baixa pressão (alto vácuo), fazendo com que a água dos produtos, que foi transformada em gelo, sublime, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o gasoso. O resultado final é um produto com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituído pela simples adição de água (ANVISA, 1988). A liofilização é uma técnica de conservação superior às demais, por preservar as características do produto de modo particular, fato que nem sempre acontece nas demais técnicas. A decomposição térmica e a perda de voláteis são reduzidas significativamente,



preservando, assim, características essenciais de um alimento (TERRONI et al., 2012).

A alta pressão hidrostática (APH) é um método de pasteurização a frio de produtos lácteos, que utiliza pressões de 400 MPa a 600 MPa, por períodos de 1 a 5 minutos, com o objetivo de prolongar a vida de prateleira e reduzir o número de patógenos. Este método não altera o sabor do produto, nem a textura ou o valor nutricional, mas a pressão elevada pode causar alguns efeitos sobre as características do leite, como redução do tamanho das micelas de gordura, desnaturação de proteína do soro do leite, aumento da solubilidade do cálcio e mudança de cor (BRODY et al., 2007; MENEZES et al., 2014 ).

A refrigeração é um método de conservação em que, pela redução da temperatura de um alimento, é possível reduzir a velocidade de suas transformações microbiológicas e bioquímicas, prolongando assim sua vida útil (TOLEDO, 1991). A refrigeração evita o crescimento de microrganismos termófilos e de muitos mesófilos (FRANCO, 1996). Os microrganismos psicrófilos e psicrotróficos multiplicam-se bem em alimentos refrigerados, sendo os principais agentes de deterioração de leite, carnes, pescado, ovos e frangos (FRANCO, 2002).

## **4.2 Refrigeração do Leite**

A refrigeração do leite, logo após a ordenha, visa a diminuir a multiplicação microbiana e garante a qualidade do leite cru e, conseqüentemente, dos seus derivados, sendo sua eficiência maximizada se associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica (SANTOS et al., 2013). Recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deve ser de 4°C (BRASIL, 2011). Quanto mais rapidamente a temperatura do leite for reduzida, melhor será o tempo de conservação, sendo que a refrigeração não elimina os microrganismos, apenas diminui sua velocidade de multiplicação (RIBEIRO & CARVALHO, 2007).

A refrigeração do leite na propriedade rural e no tanque comunitário pode atingir uma temperatura máxima de 7°C e, no estabelecimento processador, a temperatura máxima de recebimento pode ser de 10°C (BRASIL, 2011). Segundo Martins et al. (2003), mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite no estabelecimento industrial, pode ocorrer perda de

qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado.

A refrigeração do leite por períodos prolongados (acima de 48 horas) favorece o desenvolvimento da microbiota psicrotrófica, capaz de se desenvolver em temperatura de refrigeração, independentemente da temperatura ótima de multiplicação (COUSIN, 1982). A instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e o recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização etc.) deve ser de no máximo 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas.

A refrigeração do leite reduz os custos operacionais de produção, incluindo sua deterioração por atividade acidificante de bactérias mesofílicas, podendo ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrotróficas (PINTO et al., 2006). Devido a esses fatores, há grande necessidade de associar a refrigeração com as boas práticas de obtenção e manipulação para evitar ou monitorar a contaminação inicial do leite por microrganismos psicrotróficos (SANTOS et al., 2013).

### **4.3 Microrganismos Deterioradores do Leite**

A disponibilidade de nutrientes no leite, a alta atividade de água e o pH próximo da neutralidade tornam o meio extremamente favorável ao crescimento microbiano (ARCURI et al., 2006). Os principais microrganismos que contaminam o leite são as bactérias. Os vírus, fungos e leveduras têm participação reduzida (BRITO et al., 2002).

Os microrganismos contaminantes do leite são distribuídos em três grupos principais de acordo com a temperatura de crescimento: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração; os termofílicos, que sobrevivem à pasteurização (62°C a 65°C por 30 minutos ou a 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos); e os psicrotróficos, que se multiplicam em temperaturas baixas (7°C ou menos) (BRITO & BRITO, 2001).

As bactérias mesófilas constituem um grupo importante por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes. Elas são capazes de se multiplicar entre 10°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30°C a 40°C, podendo atingir altas contagens quando o leite é mantido em temperatura ambiente (JAY, 2005).

As bactérias mesófilas que mais se destacam são os lactobacilos, estreptococos, lactococos e coliformes, que podem se multiplicar rapidamente no leite, principalmente nos meses mais quentes do ano (CORTEZ & CORTEZ, 2008). Segundo Brito et al. (2002), estas bactérias fermentam a lactose, produzindo ácido lático e outros ácidos orgânicos, causando a acidez do leite. As condições que favorecem o desenvolvimento da acidez são a falta de higiene no manuseio do leite, principalmente o uso de utensílios que não estão adequadamente limpos, e a falta de refrigeração ou refrigeração ineficiente (CEMPIRKOVA, 2007).

Os principais microrganismos do grupo dos coliformes compreendem aqueles classificados nos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. A principal fonte desses microrganismos é o trato intestinal dos animais. Embora sejam considerados indicadores de contaminação fecal, há alguns que existem no ambiente. Números elevados de coliformes no leite cru indicam falta de higiene na ordenha, limpeza inadequada de equipamentos de ordenha ou de utensílios que entram em contato com o leite e água contaminada (BRITO, 2010).

Existe um grande número de agentes de doenças infecciosas que podem ser transmitidas ao homem pelo leite. Os patógenos mais importantes atualmente são *Salmonela*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus*. A *Escherichia coli* O157:H7 e a *Listeria monocytogenes* são bactérias recentemente identificadas como patógenos do leite. Apesar de causarem relativamente poucos surtos de doença, têm recebido grande atenção devido à severidade e natureza letal das doenças (BRITO, 2010).

Os microrganismos termófilos são aqueles que não apenas sobrevivem em temperaturas relativamente altas, mas necessitam delas para seu crescimento e atividades metabólicas. Os gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Thermoanaerobacterium* contêm os termófilos de maior importância em alimentos. A temperatura ótima de crescimento dos 11 termófilos está em torno de 50°C a 60°C. As bactérias termofílicas dos gêneros *Streptococcus* e *Lactobacillus* sobrevivem à pasteurização de 63°C por 30 minutos ou 72°C por 15 segundos (JAY, 2005).

A alta contagem de bactérias termofílicas está associada com deficiências crônicas ou persistentes de limpeza dos equipamentos de ordenha, ou de tetos sujos com lama ou outras sujeiras do solo. Indica também possibilidade de rachadura nos componentes de borracha ou presença de depósitos chamados de pedras de leite nas

tubulações dos equipamentos de ordenha. Como esses microrganismos sobrevivem à pasteurização, podem causar problemas na vida de prateleira do leite, principalmente se as bactérias termofílicas forem também psicrotróficas (BRITO, 2010).

Os psicrotróficos são microrganismos capazes de se multiplicar em baixas temperaturas ( $< 7^{\circ}\text{C}$ ), embora a temperatura ótima de crescimento seja maior no prazo de 7 a 10 dias, independentemente da temperatura ótima (COLLINS, 1981). Suas principais fontes são solo, poeira, ar, água, vegetação e fezes (SHAH, 1994).

#### 4.4 Microrganismos Psicrotróficos em Leite e Derivados

Os microrganismos psicrotróficos pertencem a um subgrupo dos mesófilos, pois conseguem sobreviver em temperatura ambiente, e, apesar de se multiplicarem em alimentos refrigerados, crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila (SILVA et al., 2007).

Essas bactérias podem alcançar níveis elevados em condições higiênicas precárias e/ou com elevado número de células somáticas, podendo atingir 90% da população bacteriana total, em condições adequadas iniciais, representa menos de 10% da microbiota total (SAMARŽIJA et al., 2012).

A atividade metabólica das bactérias psicrotróficas resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite, que diminuem a vida de prateleira dos produtos lácteos (ARCURI et al., 2008). Os principais gêneros isolados, em estudos conduzidos em países de clima temperado, são constituídos por bactérias gram-negativas e gram-positivas, que são: *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (gram-negativas); *Clostridium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (gram-positivas). Bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocoliticae* e algumas estirpes de *Bacillus cereus* isoladas do leite também são psicrotróficas e foram associadas a intoxicações alimentares após consumo de leite ou produtos lácteos (SHAH, 1994; SØRHOUG & STEPANIAK, 1997).

Muitas bactérias psicrotróficas são capazes de produzir enzimas extracelulares, sendo as proteases e as lipases as mais importantes em relação à deterioração de leite e produtos lácteos e, em menor importância, as fosfolipases e outras enzimas metabólicas (LAW, 1979; ARCURI, 2004). Segundo López-Fandiño (1993), as proteases presentes no leite refrigerado podem ser naturais ou produzidas por psicrotróficos, sendo a

plasmina a protease natural do leite mais comum. O gênero da *Pseudomonas* ssp. pertence ao grupo dos psicrotróficos proteolíticos, sendo a *Pseudomonas fluorescens* a espécie mais comum (LAW, 1979).

A atividade proteolítica dos psicrotróficos tem como consequência a estimulação do crescimento de bactérias ácido lácticas em leite. Este estímulo ocorre porque as bactérias ácido lácticas podem utilizar peptídeos aminoácidos que se acumulam pela ação dos psicrotróficos (SHAH, 1994). As proteases degradam preferencialmente k-caseína, seguido da  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína. A k-caseína é importante na estabilidade da micela de caseína e sua degradação pode resultar na coagulação do leite (ADAMS et al., 1975).

A atividade lipolítica de origem microbiana é principalmente devida a bactérias psicrotróficas (CASTBERG, 1992). A lipase pode hidrolisar os triglicerídeos, os fosfolipídeos, monoglicerídeos e ésteres sintéticos, atribuindo sabor e odor de ranço, sabão e oxidado ou metálico (ORDÓÑEZ et al., 2005).

#### **4.5 Qualidade do Leite e Derivados sob Refrigeração**

A qualidade do leite é um dos maiores problemas da cadeia do leite no Brasil, interferindo negativamente na produção e rendimento de derivados (SANTOS, 2007). A Instrução Normativa nº 62 de 2011 determina padrões de qualidade no estabelecimento industrial quanto à estrutura física, equipamentos e utensílios de ordenha, definindo medidas de higienização das instalações, armazenamento e transporte. Estabelece critérios para o controle da sanidade do rebanho, impõe condições higiênico-sanitárias e ainda especifica procedimentos e requisitos físico-químicos e microbiológicos para a obtenção de matéria-prima de qualidade.

De acordo com Instrução Normativa 62/2011, o leite considerado normal deve apresentar teor de gordura mínimo de 3 g/100g, acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g ácido/100mL, densidade relativa a 15°C entre 1,028 g/mL e 1,033 g/mL, extrato seco desengordurado mínimo de 8,4 g/100g, índice crioscópico entre -0,512°C e -0,531°C, e proteína, mínimo de 2,9 g/100g.

Para que o leite cru seja considerado de boa qualidade, deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas (SANTOS, 2007).

A estocagem refrigerada do leite cru por longos períodos de tempo afeta negativamente a qualidade do leite e de derivados em decorrência do desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos (NÖRBERNG et al. 2010). A deficiência na cadeia de frios no Brasil tem sido responsável pela redução do tempo de vida útil do leite pasteurizado e sua respectiva deterioração. Um aumento de 2°C na temperatura de armazenagem pode gerar uma redução de 50% na estabilidade do leite pasteurizado durante o prazo de validade (PETRUS et al., 2010).

**QUADRO 1** – Requisitos da contagem padrão em placas e contagem de células somáticas do leite refrigerado a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite.

<b>Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)</b>	<b>A partir de 01.7.2014 até 30.6.2016 Regiões: S / SE/ CO</b>	<b>A partir de 01.7.2016 Regiões: S / SE/ CO</b>
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$
Temperatura máxima de conservação do leite: 7°C na propriedade rural/ Tanque comunitário e 10°C no estabelecimento processador.		

Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

Lima et al. (2014) observaram crescimento de psicrotróficos da ordem de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g em iogurte enriquecido com grãos sob refrigeração por 96 horas de armazenamento. Reis et al. (2013) verificaram presença de psicrotróficos em derivados lácteos (iogurte, coalhada e bebida láctea fermentada) com contagens médias de 4,7 UFC/g, 2,0 UFC/g e 4,0 UFC/mL respectivamente.

A qualidade do leite também pode ser influenciada pela velocidade do resfriamento, agitação e tempo de armazenagem. O leite refrigerado por longos períodos pode sofrer dissociação do complexo das caseínas, diminuição do tamanho das micelas

e solubilização do cálcio, que podem gerar dificuldades no processo de coagulação do leite e fabricação de queijos. As alterações na fase lipídica ocorrem via cristalização dos triglicerídeos, rompimento e alteração da membrana dos glóbulos de gordura, retração com perda da estabilidade da emulsão e sua aglomeração. Conseqüentemente ocorre formação de uma camada espessa de creme ou de grumos de gordura no leite, facilitando ação das lipases naturais e conseqüente alteração do sabor e odor do leite (LOURENÇO-NETO, 1998).

#### 4.6 Infra Vermelho

A região do espectro correspondente ao infravermelho compreende a radiação com números de onda no intervalo de, aproximadamente, 12800 a 10  $\text{cm}^{-1}$ , e pode ser dividida em infravermelho próximo (NIR – do inglês, Near Infrared), médio (MIR – do inglês, Middle Infrared) e distante (FIR – do inglês, Far Infrared). A Tabela 1 apresenta os limites aproximados para cada região (SKOOG et al., 2002).

**TABELA 1** - Limites aproximados para as regiões do Infravermelho.

Região	Intervalo de número de onda ( $\nu$ ) – ( $\text{cm}^{-1}$ )	Região em comprimento de onda ( $\lambda$ ) – (nm)	Região de frequência ( $\nu$ ) – (Hz)
Próximo (NIR)	12800 - 4000	780 - 2500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4000 - 200	2500 - 5000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FIR)	200 - 10	5000 - 100000	$3,8 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

Fonte: Skoog et al. (2002).

A análise de composição por meio de equipamentos de infravermelho (IV) é um método de exame prático e economicamente viável, com possibilidade de se analisar um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo (BARBANO & CLARK, 1989). A vantagem de utilizar as análises por infravermelho próximo - Near Infrared (NIR) em relação aos métodos tradicionais está na análise múltipla dos constituintes, no período máximo de um minuto por amostra, menor necessidade de mão de obra, rapidez e, portanto, menor custo variável, além de não ser poluente por não utilizar produtos químicos ou reagentes (AMORIM, 1996).



Esse método permite avaliar diversos fatores, sendo possível obter boas calibrações do sistema NIR para análises de nitrogênio foliar (MEYER, 1999). Na área de nutrição de plantas, o sistema NIR pode ser usado na determinação dos teores de nutrientes em folhas de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2010) e também de nitrogênio em folhas de trigo (LIMA et al., 2008). Brandelero (2010) utilizou a espectrometria por infravermelho próximo para detectar níveis de macro e micronutrientes em material vegetativo de povoamentos florestais homogêneos de *Eucalyptus grandis*.

O princípio do uso da espectroscopia no infravermelho para a análise do leite foi proposto, primeiramente, por Goulden, do Instituto Nacional de pesquisas em Indústrias de Laticínios, localizado em Londres. Goulden desenvolveu um instrumento denominado IRMA (Infrared Milk Analyser) e, a partir de então, consideráveis melhorias têm sido feitas nos analisadores de infravermelho para a análise de composição do leite (HARDING, 1995).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMORIM, H. V. Manual de Métodos Analíticos para o Controle da Produção de Álcool e Açúcar. 2ª Ed. **Piracicaba: Editora Fermentec/Fealq/Esalq-USP**, 1996. 230p.

ANTUNES, V. C. . Uso de microfiltração para melhoria da qualidade e extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado. **Brazilian Journal of Food Technology (Online)**, v. 17, p. 75-86, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde (BR). Portaria MS 322/88. Normas para implantação e funcionamento de Bancos de Leite Humano. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 26 maio 1988.

ARCURI, E. F.; TAVARES, W. P. P.; PEREIRA, D. B. C.; BRITO, M. A. V. P. Efeito do crescimento de *Pseudomonas* sp. proteolítica na estabilidade do leite ao etanol. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 140-144, 2004.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

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

BARBANO, D. M.; CLARK, J.L. Symposium: Instrumental methods for measuring components of milk - Infrared milk analysis - challenges for the future. **Journal of Dairy Science**, v.72, p. 1627- 1636, 1989.

BRANDELERO, C. Espectrorradiometria do visível e infravermelho próximo em povoamento de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. 2010, 90 f. **Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p.1-24.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: F.H. Madalena; L.L. de Matos; E.V. Holanda Jr.. (Org.). **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, v.,p. 61-74, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 83-88, 2002.

BRITO, M. A. V. P. Identificando fontes e causas de alta contagem bacteriana total do tanque. Panorama do leite on line. Ano 4, nº 40 – março de 2010. **Disponível em:** <<http://www.cileite.com.br/panorama/especial40.html>> Acesso em: 06/05/2015.

BRODY, A. L.; MORRIS, C.; WICKER, L. Non--Thermal Food Processing/Preservation Technologies: A Review with Packaging Implications. **Packaging Technology and Science**, v. 20, p. 275-286, 2007.

CASTBERG, H. G. Lipase activity. Int. Dairy Fed. Bull. IDF. 271; **Dairy Fed., Brussels**, Belgium. p. 18-20, 1992.

CEMPIRKOVA, R. Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in re-lation to selected factors, **Czech Journal of Animal Science** 52(11), 387-393, 2007.

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. **Boca Raton: CRC Press**, 1998. 597 p.

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

CORTEZ, M. A. S.; CORTEZ, N. M. S. Qualidade do leite: boas práticas agropecuárias e ordenha higiênica. **Niterói: EDUFF**. p. 79, 2008.

COUSIN, M. A. Presence and activity psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **J Food Prot**;45:172-207, 1982.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos. **São Paulo: Atheneu**, p. 196, 2002.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Microbiologia dos Alimentos. **Atheneu: São Paulo**, Brasil. p.183, 1996.

HARDING, F. Milk quality. **New York: Blackie Academic & Professional**, 1995. 165p.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. p.711, 2005.

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

LIMA, S.E.R; MARTINS, W.F; MELO, F.S.N; SILVA, E.V; ARAÚJO, A.S. Estudo do crescimento de bactérias psicotróficas e mesófilas em iogurte enriquecido com grãos. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável – Dezembro**, VOL. 4. Nº1, 2014.

LIMA, K. M. G; TREVISAN M. G; POPPI, R. J; ANDRADE, J. C. Determinação não destrutiva do nitrogênio total em plantas por espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho próximo. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 700-703, Mar. 2008.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; CORZO, N.; RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *Journal Dairy Reseach*, Cambridge, v.6, p.339-347, 1993.

Lourenço-Neto JPM. Leite resfriado: Matéria prima da queijaria moderna. **Leite Derivados** 1998; 41:18-34.

MARTINS, M.L.; ARAÚJO E.F.; MORAES C.A.; MANTOVANI H.C.; VANETTI M.C.D. 2003. Diversidade genética de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 58: 54-60.

MENEZES, M. F. S. C. e/ou SILVEIRA, M.F. ; SIMEONI, C. P. ; BORTOLUZZI, D. ; HUERTA, K. ; ETCHEPARE, M. ; MENEZES, C. . Microbiota e conservação de leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, 2014.

MEYER, J. H. Use of NIR in the South African sugar industry with reference to soil fertility management. **South African Sugar Association Experiment Station**, KwaZulu-Natal, 1999.

ORDÓÑEZ, J. Tecnologia de alimentos – alimentos de origem animal. Vol.2. **Porto Alegre: Artmed**, 2005. 294p.

PETRUS R, LOIOLA C, OLIVEIRA C. Microbiological Shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. **J. Food Sci** 2010;75(1);36-40.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

REIS, D. L.; COUTO, E. P.; RIBEIRO, J. L.; NERO L. A.; FERREIRA, M. de A. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 35, n. 6, p. 3161-3172, nov./dez. 2014.

RIBEIRO, M. T.; CARVALHO, A, C. Refrigeração. Agência de informação embrapa agronegocio do leite. **Disponível em:** <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_97\\_21720039241.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_97_21720039241.html)> ACESSO 06/05/2015.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, v. 2, p. 77-95, 2012.

SANTOS, A.S.; PIRES, C.V.; SANTOS, J.M.; COSTA SOBRINHO, P.S. Crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, jul./set. 2013.

SANTOS, G. A; PEREIRA, A. B; KORNDÖRFER, G. H. Uso do Sistema de Análises por Infravermelho Próximo (NIR) para análises de matéria orgânica e fração argila em solos e teores foliares de silício e nitrogênio em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 100-108, Jan./Fev. 2010.

SANTOS MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. **São Paulo: Manole**; 2007.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p.432-437, 1994.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. **São Paulo: Varela**, 3 ed, 2007. 552p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. **São Paulo: Bookman**, 2002.

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

TERRONI, H. C. ; JESUS, J. M. ; ARTUZO, L. T. ; VENTURA, L. F. ; SANTOS, R. F. ; DAMY-BENEDETTI, P.C. . Liofilização. **Revista UNILAGO**, v. 11, p. 271-284, 2012.

TOLEDO, R. T. Fundamentals of Food Process Engineering. **New York: Chapman e Hall**, p 398-436, 1991.

TRONCO, Vania Maria. Manual de Inspeção da Qualidade do Leite.4ª ed. **Santa Maria: Editora UFSM**, 2010.

## CAPÍTULO I

# INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO LEITE NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE IOGURTES NATURAIS

### RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da refrigeração do leite durante zero, 24, 48 e 72 horas de estocagem sobre a qualidade de iogurtes naturais durante o 1º, 8º, 15º, 22º e 29º dias de armazenamento. Amostras de leite cru refrigerado foram coletadas no Setor de Bovinocultura de Leite do IF Goiano, localizado na cidade de Rio Verde-GO, e transportadas ao Laboratório de Produtos de Origem Animal para análises de acidez titulável, pH, viscosidade, rendimento de massa e crescimento de microrganismos psicotróficos, nos tempos de zero, 24, 48 e 72 horas, nos iogurtes produzidos do leite refrigerado, tendo sido avaliados a cinética de fermentação, pH, acidez titulável, viscosidade, crescimento de microrganismos psicotróficos e viabilidade de bactérias lácticas durante o armazenamento. No oitavo dia, foram feitas as análises de proteínas, lipídeos, cinzas, matéria seca e espectroscopia de absorção na região do infravermelho. O leite cru refrigerado apresentou baixa acidez titulável para todos os tempos de refrigeração e pH acima de 6,8. A viscosidade do leite teve aumento acentuado relacionado diretamente ao crescimento das bactérias psicotróficas, que, eventualmente, influenciaram no rendimento de massa do leite, que foi maior no leite estocado por zero hora. No iogurte, a cinética da fermentação foi menor para os iogurtes produzidos com o leite estocado por 24 e 72 horas e maior para os iogurtes produzidos com o leite estocado por zero e 48 horas. A acidez titulável e o pH foram inversamente proporcionais, no entanto, o iogurte produzido com o leite de 24 horas de estocagem apresentou maior acidez titulável durante todo o período de armazenamento e menor pH a partir do vigésimo segundo ao vigésimo nono dia de armazenamento. A viscosidade apresentou variação do primeiro ao vigésimo segundo dia de armazenamento, porém, queda do vigésimo segundo ao vigésimo nono dia de armazenamento para todos os tempos de estocagem do leite. As bactérias lácticas apresentaram redução durante os 29 dias de armazenamento, mas foram superiores a  $10^7$  UFC/mL, favorecendo a função probiótica dos iogurtes. Na composição centesimal do iogurte, a matéria seca variou de 11,28 a 12,90%, a cinza apresentou variação de 0,78 a 0,85 %, a proteína variou de 3,33 a 3,47% e a gordura, de 3,32 a 4,50%. Os valores encontrados estão de acordo com a legislação. Na avaliação do infravermelho, observou-se que existem grupos polares, carbono hidrogênio e alceno.

**Palavras-chave:** bactérias psicotróficas, refrigeração, probiótico.

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of the milk refrigeration during storage time for zero, 24, 48, and 72 hours on the quality of natural yoghurt at the 1<sup>st</sup>, 8<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 22<sup>nd</sup>, and 29<sup>th</sup> days of storage. Samples of refrigerated raw milk were collected in Cattle sector of Milk of Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF) (Federal Institute of Education, Science, and Technology of Goiás), Campus Rio Verde, Goiás

State (GO), Brazil, and taken to Laboratório de Produtos de Origem Animal (Laboratory of Animal Products) to make the analyzes of titratable acidity, pH, viscosity, mass yield, and growth of psychrotrophic microorganisms at time zero, 24, 48, and 72 hours; kinetic fermentation, pH, titratable acidity, viscosity, growth of psychrotrophic microorganisms and viability of lactic acid bacteria during the storage were evaluated in yoghurt produced from refrigerated milk; and, on the eighth day, analyzes of proteins, lipids, ash, dry matter, and absorption spectroscopy were made in the infrared region. The refrigerated raw milk showed low titratable acidity for all cooling times and pH rate above 6.8. The milk viscosity had sharp increase related directly to the growth of psychotropic bacteria; these bacteria eventually affected the milk mass yield, which was higher in stored milk for zero time. In yoghurt, the fermentation kinetics was lower for yoghurt produced with milk stored for 24 and 72 hours, and higher for yoghurts produced with milk stored during zero time and 48 hours. The titratable acidity and pH were inversely proportional; however, yogurt made from milk stored for 24 hours showed higher titratable acidity and pH throughout the storage period and lower pH from twenty-second to twenty-ninth day of storage. The viscosity presented change from the first to the twenty-second day of storage; however, it decreased from the twenty-second to the twenty-ninth day of storage for all storage times of milk. The lactic acid bacteria were reduced during 29 days of storage, but were higher than  $10^7$  Colony Forming Units (CFU)/mL, favoring the function of probiotic yoghurt. In the percentage composition of the yoghurt, the dry matter (DM) ranged from 11.28 to 12.90%, ash varied by 0.78 to 0.85%, protein ranged from 3.33 to 3.47%, and fat ranged from 3.32 to 4.50%; the found values are in accordance with the legislation. In infrared evaluation, it was observed that there are polar groups, hydrogen carbon, and alkene.

**Keywords:** psychotropic bacteria, cooling, probiotic.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é altamente nutritivo e importante na dieta humana, porém é um excelente meio de cultura para os microrganismos (ZENI et al., 2013). É praticamente impossível a obtenção de leite livre de microrganismos contaminantes, sendo definidos os números aceitáveis de microrganismos com base nas alterações que eles causam no leite e derivados (BRITO & BRITO, 2001).

Alguns fatores podem influenciar na taxa de contaminação microbiana do leite, entre eles: o estado de saúde e higiene das vacas leiteiras; a higiene do ambiente onde as vacas estão alojadas e são ordenhadas; os métodos de preparação do úbere e técnicas de ordenha; os métodos utilizados para a limpeza e a desinfecção dos equipamentos de ordenha e tanque de leite; a higiene dos trabalhadores; além do binômio tempo/temperatura (CEMPIRKOVA, 2007).



A presença de agentes antimicrobianos no leite, em pequenas quantidades, tem causado problemas na indústria de laticínios, tais como: coagulação inadequada do leite e maturação imprópria de queijos; diminuição de acidez e produção de flavour durante a manufatura de manteiga e produtos similares; diminuição do crescimento de fermento lácteo; e mascaramento/alteração de resultados em testes de controle de qualidade (MARTH & ELLICKSON, 1959). Padrões microbiológicos como contagem bacteriana total (CBT), contagem de bactérias psicrotróficas e contagem de células somáticas (CCS) são relevantes, pois refletirão o processo e a qualidade do produto (MENDES et al., 2014).

De acordo com Barbano et al. (1984), presença de mastite pode influenciar na elaboração de queijos semiduros, promovendo diminuição no rendimento industrial, que pode chegar a 4%, ou seja, uma perda final de até 400 kg de queijo para cada 100.000 litros de leite processado, se for considerado o rendimento médio de 1 kg de queijo para cada 10 litros de leite utilizado com mastite bovina.

A qualidade do leite pode ser mantida pelo controle da contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos, do desenvolvimento, produção e atividade de enzimas deterioradoras (MARTINS et al., 2005; MARTINS, 2007; JONGHE et al., 2011; BRANDÃO et al., 2013). Associar refrigeração a boas práticas de obtenção e manipulação pode evitar ou monitorar a contaminação inicial do leite por microrganismos psicrotróficos (SANTOS et al., 2013), porém a refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer sua qualidade (PINTO et al., 2006). No momento do processamento, esses microrganismos têm influência significativa na vida útil, qualidade sensorial, deterioração e rendimentos dos derivados lácteos (SAMARZIJA et al., 2012).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a qualidade do leite cru refrigerado nos tempos de zero, 24, 48 e 72 horas de armazenamento quanto à acidez titulável, pH, crescimento de bactérias psicrotróficas e rendimento de massa, além de desenvolver um iogurte e determinar as características físico-químicas e o crescimento de bactérias psicrotróficas e de bactérias ácido lácticas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta das amostras**

A pesquisa foi conduzida de maio a junho de 2015. Amostras de leite cru refrigerado foram coletadas no Setor de Bovinocultura de Leite do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde (IF Goiano), localizado na cidade de Rio Verde, GO.

O leite utilizado no experimento foi o da primeira ordenha após a lavagem do tanque de armazenamento. Foram coletados 28 litros de leite, que, no momento da coleta, estava com temperatura de aproximadamente 2°C. Estas amostras de leite foram transportadas em vasilhame plástico sanitizado para o Laboratório de Produtos de Origem Animal do IF Goiano, tendo sido acondicionadas em diferentes recipientes. Cada recipiente continha 6 litros de leite, constituindo os tempos de estocagem do leite zero, 24, 48 e 72 horas. O leite de zero hora foi imediatamente submetido às análises e feita a produção de iogurte natural. Para as análises, foi utilizados um litro de leite e, para a produção do iogurte, seis litros, em três repetições, sendo que cada repetição utilizava dois 2 litros de leite. Os demais recipientes contendo o leite *in natura* foram estocados sob refrigeração à temperatura de 4°C ±1°C até as respectivas horas (24 horas, 48 horas e 72 horas) para o processamento. Em todos os casos, foram avaliados a qualidade do leite, o processamento e a qualidade dos iogurtes, conforme os tempos de armazenamento do leite. Todas as análises foram feitas em triplicata.

## **2.2 Avaliação do pH e acidez titulável**

O pH do leite foi aferido com o uso de potenciômetro digital de bancada, modelo W38 (Bel Engineering®).

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2005), com a titulação de 10 mL da amostra com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 molar e fenolftaleína (três gotas) como indicador.

## **2.3 Viscosidade**

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotativo microprocessado Quimis®, modelo Q860M26. As amostras foram posicionadas na altura correta do espíndole, com velocidade de 50 rpm (rotações por minuto). O tempo mínimo de leitura foi de aproximadamente cinco minutos por amostra.

## 2.4 Contagem de microrganismos psicrotróficos

Alíquotas de 25 mL da amostra de leite foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ), e com esta diluição, foram feitas diluições decimais das amostras até  $10^{-6}$ . Uma alíquota de 1 mL foi transferida para placa contendo ágar padrão para contagem (PCA). O plaqueamento foi em “spread plate” (em superfície), a amostra foi espalhada com alça de Drigalski e incubada a 7°C por 10 dias (SILVA et al., 1997).

## 2.5 Rendimento em massa

Para avaliação do rendimento em massa, o leite foi acidificado a pH 5,7, com adição de solução de ácido cítrico a 10% (m/v) e adição de 40 µL de cloreto de cálcio. Este valor de pH foi escolhido para simular a produção de queijos com pré-maturação láctica (coagulação em pH de cerca de 5,7), conforme Vasconcelos et al. (2004).

## 2.6 Elaboração do iogurte

O leite refrigerado destinado à produção dos iogurtes naturais foi filtrado para eliminação de qualquer contaminação física, homogeneizado e submetido a tratamento térmico à temperatura de 90°C/três minutos, com posterior abaixamento para 42°C. Seguiu-se a adição do inóculo contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*, na proporção de 0,1%.

### 2.6.1 Fermentação

Os iogurtes foram envasados, em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar sob luz ultravioleta, em embalagens de polipropileno de 250 mL de capacidade, previamente sanitizadas e identificadas. Foram incubados em estufa (BOD Quimis® modelo Q-315d) à temperatura de 42°C. O monitoramento da fermentação experimental foi iniciado após a adição do inóculo até atingir pH  $\pm 4,5$ . As medições de pH foram feitas utilizando potenciômetro digital de bancada, modelo W38 (Bel Engineering®),

em intervalos de 30 minutos cada. Após a fermentação, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração à temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## **2.7 Avaliação da Qualidade dos Iogurtes Naturais**

Os iogurtes naturais foram analisados aos 1, 8, 15, 22 e 29 dias de armazenamento.

### **2.7.1 Avaliação do pH e acidez titulável**

Para avaliação do pH, foi utilizado o potenciômetro digital de bancada, modelo W38 (Bel Engineering®). Para a leitura, o eletrodo foi inserido na amostra sem tocar o fundo e nem as laterais da embalagem contendo o iogurte.

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2005), com a titulação de 10 mL da amostra de iogurte com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 molar e fenolftaleína (três gotas) como indicador.

### **2.7.2 Viscosidade**

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotativo microprocessado Quimis®, modelo Q860M26. As amostras foram posicionadas na altura correta do espíndole, com velocidade de 50 rpm (rotações por minuto). O tempo mínimo de leitura foi de, aproximadamente, cinco minutos por amostra.

### **2.7.3 Contagem de bactérias lácticas**

Alíquotas de 25 mL da amostra foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ), e desta diluição, foram feitas diluições decimais das amostras até  $10^{-7}$ . Uma alíquota de 1 mL foi transferida para o fundo da placa de Petri, em seguida, adicionado o meio M.R.S. Agar (KASVI®). O plaqueamento foi “pour plate”, em triplicata, com incubação a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, e assim feitas as contagens das bactérias lácticas viáveis (UFC/mL) (MACEDO, 1997).

#### **2.7.4 Contagem de microrganismos psicotróficos**

Alíquotas de 25 mL da amostra foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ), e desta diluição, foram feitas diluições decimais das amostras até  $10^{-6}$ . Uma alíquota de 1 mL foi transferida para placa contendo ágar padrão para contagem (PCA). O plaqueamento foi em “spread plate” (em superfície), e a amostra foi espalhada com alça de Drigalski e incubada a 7°C por 10 dias (SILVA et al., 1997).

#### **2.7.5 Composição centesimal**

Aos oito dias de estocagem, as amostras de iogurte foram avaliadas quanto ao teor de matéria seca, cinza, proteínas e gordura.

A matéria seca foi obtida pelo aquecimento da amostra em estufa a 105 °C durante 16 horas, ou até peso constante, conforme técnica descrita pelo método oficial n° 925.10 da AOAC International (1997).

As amostras utilizadas para análise de umidade foram aproveitadas para análise de cinzas. As cinzas foram determinadas pela carbonização total da matéria orgânica em forno mufla (Bravac, M2) a 550 °C, por cerca de 10 horas, ou até obter cinzas de cor clara, como descrito no método oficial n° 923.03 da AOAC International (1997).

Para a análise de proteína bruta, determinou-se o nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, segundo o método oficial n° 960.52 da AOAC International (1997). O nitrogênio total foi convertido em proteína bruta, utilizando o fator 5,95 (ALENCAR & ALVARENGA, 1991). Os equipamentos utilizados foram o bloco digestor (Tecnal, TE-0070) e o destilador de nitrogênio (Tecnal, TE-0363).

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, segundo IAL (2005). Foram feitas a transferência de 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro, adição de 11 mL da amostra e 1 mL de álcool isoamílico e agitação cuidadosa para completa diluição e centrifugação a  $(1200 \pm 100 \text{ rpm})$  durante 15 minutos.

#### **2.7.6 Análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho**

As análises de infravermelho foram feitas na Central Analítica, do Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde, em um espectrômetro Frontier PerkinElmer, com varredura de 650 a 4500  $\text{cm}^{-1}$ . Foi coletada uma amostra de cada Tratamento, cerca de 0,5 g, e colocada no leitor do aparelho.

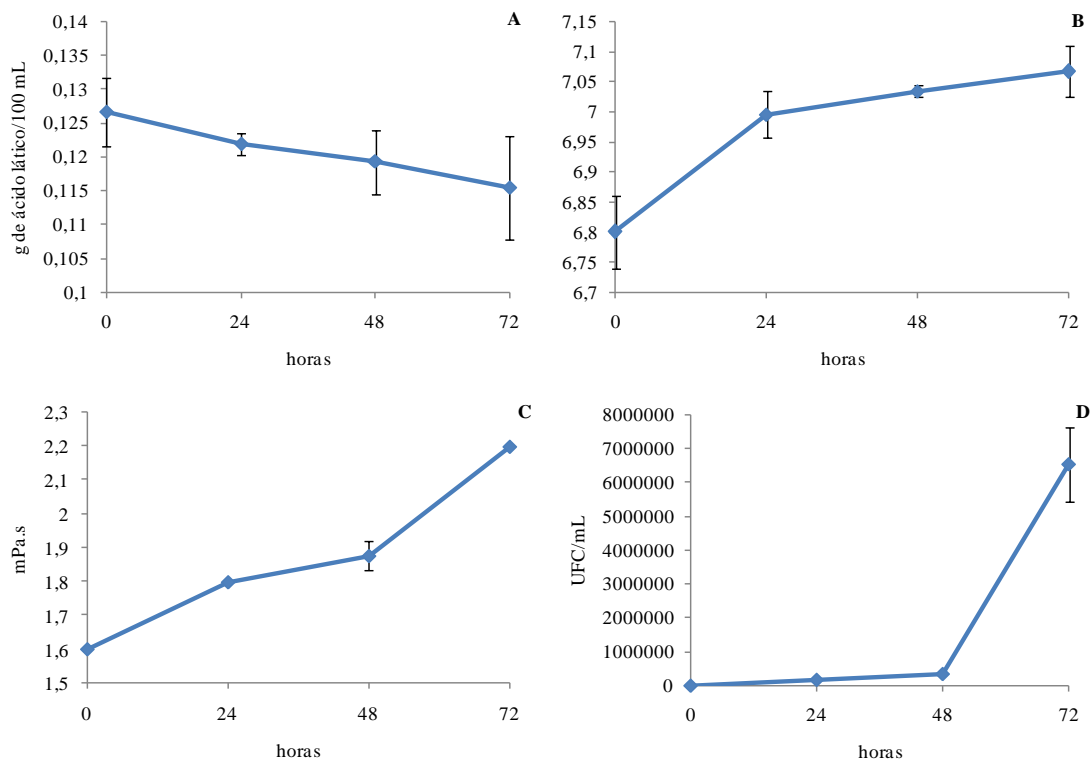
## 2.8 Análise Estatística

Os valores médios da acidez titulável, pH, viscosidade e contagem de psicotróficos do leite e a viabilidade de bactérias lácticas e cinética da fermentação dos iogurtes foram apresentados por meio de regressão com o uso do Software Excel, versão 2007.

A influência do tempo de estocagem na qualidade do leite, no rendimento de fabricação e na composição físico-química dos iogurtes foi comparada pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram feitas com o uso do Software Sisvar (FERREIRA, 2010).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da acidez titulável do leite cru refrigerado, Figura 1 A, foram decrescentes durante o período de estocagem (zero, 24, 48 e 72 horas), mas no tempo de 48 para 72 horas, este decréscimo foi mais acentuado. A acidez titulável do leite cru refrigerado esteve em desacordo com a preconizada pela legislação vigente, que estabelece 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2011). Isto pode ser atribuído a vários fatores como leite proveniente de vacas com mamite, adição de substância alcalina, estado nutricional do rebanho ou presença de água. Mendes et al. (2010), ao avaliarem acidez em leite refrigerado, descreveram que 6,20% (32 amostras) estavam fora do padrão para essa análise em Mossoró/RN. Mendonça et al. (2009), em teste de acidez pelo método de Dornic, observaram que 20% das amostras de leite cru estavam abaixo de 14°D.



**FIGURA 1** - Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e contagem de psicotróficos do leite refrigerado até 72 horas.

Com relação ao pH, houve aumento em função do tempo de estocagem, variando de 6,8 a 7,1, do tempo zero ao tempo de 24 horas, quando este aumento foi mais acentuado. Santos & Fonseca (2007) atribuíram a faixa de pH de 6,6 a 6,8 como normal para leite bovino. Valores superiores a 6,8 indicam mastite.

A viscosidade do leite cru refrigerado, Figura 1 C, foi crescente durante o período de estocagem de zero, 24, 48 e 72 horas, sendo que, no período de 48 para 72 horas, o crescimento foi mais acentuado, quando comparado com os demais períodos. Este fato está relacionado ao crescimento de microrganismos psicotróficos que, no mesmo período de 48 para 72 horas, apresentou alto crescimento de bactérias psicotróficas.

Shirai & Masson (2010), em estudo com leite cru refrigerado durante o armazenamento, afirmaram que a alteração da viscosidade pode estar correlacionada ao aumento de microrganismos psicotróficos. O aumento da viscosidade é decorrente da atividade de enzimas extracelulares e termorresistentes, particularmente proteases, produzidas por bactérias psicotróficas contaminantes do leite antes do processamento térmico (VIDAL-MARTINS et al., 2005; SHIRAI & MASSON, 2010).

A viscosidade desempenha um papel importante no desenvolvimento contínuo de produtos, processos, equipamentos, manuseio e controle de qualidade, além disso, em muitas operações e tratamentos, ocorrem mudanças das características do produto, por isso é importante conhecer como a viscosidade varia com o tratamento utilizado (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A contagem dos microrganismos psicrotróficos, Figura 1 D, foi crescente até as 72 horas de estocagem. Nos períodos que se estenderam de zero a 48 horas, o crescimento médio de bactérias psicrotróficas foi de 1,9 log<sub>10</sub> UFC/mL no tempo zero hora; após 24 horas de estocagem, foi de 5,2 log<sub>10</sub> UFC/mL; e após 48 horas de estocagem, foi de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL.

A contagem de psicrotróficos no leite durante os períodos de zero a 48 horas foi de 10<sup>5</sup> UFC/mL, estando em consonância com Hantsis-Zacharov & Halpern (2007) e Gaucher et al. (2008), segundo os quais esta quantidade não interferiria na sua qualidade, pois ambos relataram que o limite máximo de psicrotróficos no leite cru que não interferiria na sua qualidade seria de até 10<sup>6</sup> UFC/mL, enquanto para Cempírkova & Mikulová (2009), o limite considerado de segurança é de 5,0 x 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Santos et al. (2013), estudando o crescimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado, constataram aumento crescente da contagem desse grupo de microrganismos à medida que aumentou o tempo de armazenamento, sendo que nos tempos de 24, 48 e 72 horas de estocagem a 4°C, o leite apresentou valores de 0,06, 0,11 e 0,74 log UFC/mL, respectivamente. Izidoro et al. (2009), estudando a influência do resfriamento marginal na multiplicação de microrganismos psicrotróficos nos tempos zero, 12, 24 e 48 horas de estocagem, registraram média de 3,8 log UFC/mL, no tempo zero, e de 5,5 log UFC/mL no tempo de 48 horas.

Verifica-se que, na transição dos períodos de 48 para 72 horas de estocagem, a contagem de bactérias psicrotróficas apresentou aumento acentuado quando comparada com os demais períodos, com valores médios de 5,5 a 6,8 log<sub>10</sub> UFC/mL, respectivamente, mostrando que o número de bactérias estava acima de 6.000.000 por mL. Segundo Zeni et al. (2013), quando o número exceder a 5 milhões/mL, há um considerável risco de alterações das proteínas e da gordura do leite.

Este resultado evidencia a necessidade de um controle mais rigoroso com relação ao tempo de estocagem do leite na propriedade rural, pois se o leite for submetido a períodos de estocagem sob refrigeração, como o encontrado neste estudo, o



controle de microrganismos psicrotróficos será muito importante, visto que irá prevenir problemas tecnológicos e econômicos. A contagem inicial de microrganismos no leite cru tem elevada importância para a qualidade microbiológica final da matéria-prima (RECHE et al., 2015).

Entre os principais problemas decorrentes do alto número de bactérias psicrotróficas, podem ser destacados: geleificação do leite UAT, modificações na consistência e textura, sabores e odores desagradáveis (nos produtos lácteos durante a estocagem e maturação) e rancificação causada pela produção de proteases e lipases termorresistentes, que podem continuar atuando nos derivados lácteos mesmo após a pasteurização rápida (HTST - High Temperature Short Time) ou o processamento a ultra alta temperatura (UAT); e diminuição no rendimento industrial na produção de queijos e redução da vida de prateleira dos produtos (ALMEIDA, 1998; ORDONEZ, 2007).

O rendimento de massa do leite, Tabela 2, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), tendo o maior rendimento sido constatado no tempo zero de estocagem, que apresentou, neste período, o menor crescimento de microrganismos psicrotróficos. Segundo Lawrence (1991), a estocagem do leite pode indiretamente influenciar no rendimento de queijos, dependendo da população inicial de microrganismos psicrotróficos, da temperatura e do período de estocagem.

**TABELA 2** – Valores médios do rendimento em massa do leite refrigerado até 72 horas.

Parâmetro	Tratamentos				CV (%)
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	
Rendimento	26,88 ±6,55a	23,72 ±1,04b	23,71 ±0,94b	23,64 ±0,99b	13,81

\*Letra minúscula na linha difere significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

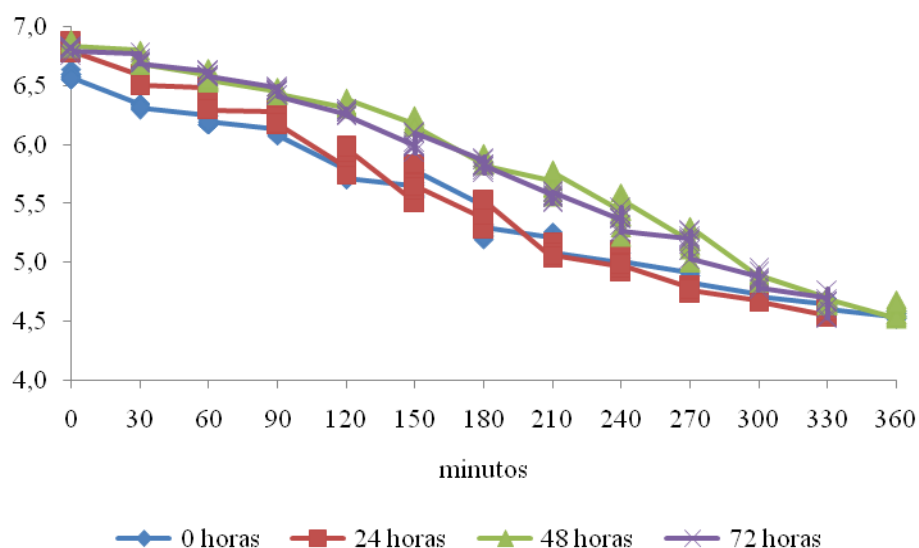
As características do leite têm influência significativa no rendimento de produtos lácteos, sendo sua composição de grande importância para a indústria de laticínios (VIOTTO, 2006). Segundo Boland (2003), o teor de sólidos totais é importante não apenas para o leite comercializado na forma líquida, por afetar o valor nutricional por unidade de volume, mas também para o leite destinado a outras formas de processamento, como, por exemplo, no processamento de iogurte.

No processamento de iogurte, a fermentação se inicia quando as culturas do iogurte convertem parte da lactose em ácido láctico, conseqüentemente, o pH diminui

até o ponto em que a caseína se torna insolúvel e aumenta a viscosidade do leite. A produção gradual de ácido láctico começa por desestabilizar os complexos de caseína e proteína do soro desnaturado por solubilização do fosfato de cálcio e dos citratos (TAMIME & ROBINSON, 1991).

A fermentação láctica consiste na conversão anaeróbica parcial de carboidratos presentes no leite (lactose), cujo produto final principal é o ácido láctico, além de várias outras substâncias orgânicas que influenciam nas características sensoriais do iogurte. O pH decresce pela presença do ácido láctico e provoca coagulação das proteínas do leite e formação do coágulo utilizado na fabricação de iogurtes e queijos (SILVA, 2007).

A Figura 2 mostra a evolução dos valores de pH durante o período de incubação. O tempo de incubação para atingir pH 4,5 foi maior para os iogurtes produzidos com o leite de zero e 48 horas de estocagem, tendo ambos fermentado em 360 minutos; para os iogurtes produzidos com o leite de 24 e 72 horas, a fermentação ocorreu em 330 minutos. Oliveira & Damin (2003) verificaram tempo de fermentação de 330 a 750 minutos. Frighetto et al. (2011), na cinética de fermentação de iogurte, relataram tempo de fermentação de 240 a 270 minutos. Silva et al. (2012), avaliando o estudo do comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção do iogurte natural, observaram que a fermentação atingiu pH 4,75 no tempo de 720 minutos.



**FIGURA 2** – Cinética da fermentação de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.

A acidez titulável do iogurte durante o período de 29 dias de armazenamento foi crescente, Figura 3 A, sendo que, no iogurte produzido com o leite de 24 horas de

estocagem, a acidez foi maior durante todo o período de armazenamento, seguido pelo iogurte produzido com o leite de 48 horas de estocagem. O iogurte produzido com o leite de 72 horas apresentou acidez titulável crescente até o décimo quinto dia de armazenamento, a partir daí ocorreu decréscimo da acidez titulável até o vigésimo segundo dia, apesar de apresentar crescimento acentuado da acidez titulável do vigésimo segundo dia ao vigésimo nono dia de armazenamento. O iogurte produzido com o leite de zero hora foi crescente do primeiro até o vigésimo segundo dia, a partir daí houve uma estabilização da acidez titulável até o vigésimo nono dia de armazenamento.

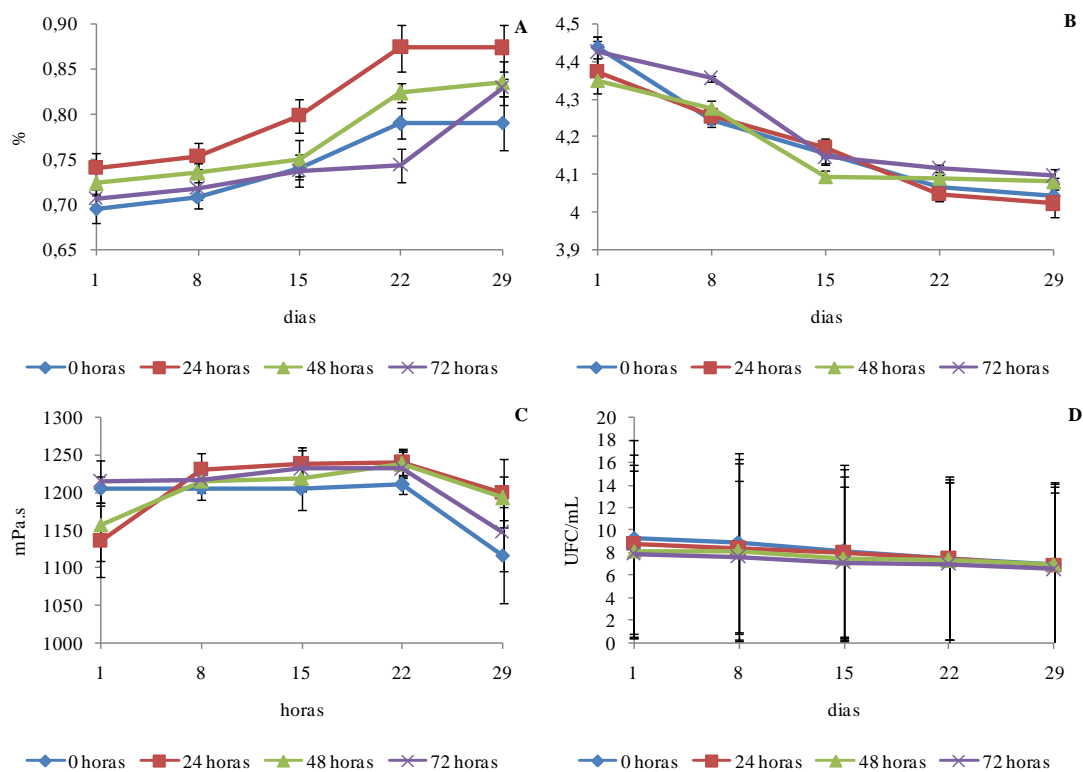
O pH decresceu durante o período de 29 dias de armazenamento, Figura 3 B, sendo inversamente proporcional à acidez titulável. O iogurte produzido com o leite de 72 horas apresentou maior pH no oitavo, vigésimo segundo e vigésimo nono dia de armazenamento; o iogurte produzido com o leite de 48 horas apresentou menor pH no décimo quinto dia de armazenamento; e o iogurte produzido com o leite de 24 horas apresentou menor pH no vigésimo segundo e vigésimo nono dias de armazenamento.

O decréscimo do pH durante o período de armazenamento está relacionado à degradação da lactose. Os microrganismos adicionados ao leite transformam parte da lactose em ácido láctico. Por causa do meio ácido, as proteínas coagulam e o iogurte começa a adquirir textura característica (TAMIME & ROBINSON, 1991).

Kempka et al. (2008) observaram elevada acidez e baixo pH, aos 22 dias de armazenamento, fato possivelmente relacionado à ação do *Lactobacillus acidophilus*, microrganismo conhecido pela grande capacidade de produção de ácido no meio da fermentação em bebida láctea fermentada sabor pêssego.

As mudanças na acidez do produto ocorrem em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas, estando também se relacionadas às mudanças nos valores de pH (LIMA, 2011).

Os valores de acidez titulável variaram de 0,70% a 0,87%, estando consonantes com aqueles preconizados pela legislação vigente, que estabelece 0,6 a 1,5 g de ácido láctico/100g. O pH apresentou variação de 4,02 a 4,44. Pimentel et al. (2012) relataram valores de acidez titulável de 1,09% a 1,27% e pH de 4,16 a 4,45, em iogurte, durante 28 dias de armazenamento. Duarte et al. (2013) verificaram valores de acidez titulável de 0,7% a 1,08% e pH de 4,5 a 4,2, em iogurte, durante 35 dias de armazenamento.



**FIGURA 3** – Acidez titulável (A), pH (B), viscosidade (C) e bactérias lácticas viáveis (D) de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.

A viscosidade, Figura 3 C, avaliada a 50 rpm apresentou variação durante o período de armazenamento. O iogurte produzido com o leite de zero hora apresentou uma estabilização da viscosidade do primeiro ao vigésimo segundo dia de armazenamento, com decréscimo do vigésimo segundo dia ao vigésimo nono dia de armazenamento, além de apresentar menor viscosidade a partir do oitavo dia de armazenamento. O iogurte produzido com o leite de 24 horas apresentou crescimento acentuado do primeiro ao oitavo dia de armazenamento, seguido por uma estabilização do oitavo ao vigésimo segundo dia de armazenamento, com decréscimo do vigésimo segundo dia ao vigésimo nono dia de armazenamento, e a viscosidade do oitavo ao vigésimo nono dia de armazenamento foi à maior entre os tratamentos.

O iogurte produzido com o leite de 48 horas apresentou crescimento do primeiro ao vigésimo segundo dia de armazenamento, no entanto, do primeiro ao oitavo dia, o crescimento foi mais acentuado, com decréscimo do vigésimo segundo dia ao vigésimo nono dia de armazenamento. No iogurte produzido com o leite de 72 horas, houve estabilização do primeiro ao oitavo dia, porém, a viscosidade foi crescente do oitavo ao décimo quinto dia, seguido novamente por uma estabilização do décimo quinto ao

vigésimo segundo dia, por fim, um decréscimo do vigésimo segundo ao vigésimo nono dia de armazenamento.

Estes resultados confirmam os de Silva et al. (2012) ao avaliarem o comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção do iogurte natural. No entanto, foram divergentes com os relatados por Cunha Neto et al. (2005) em estudo com iogurte natural, que apresentou viscosidade crescente até o trigésimo dia de armazenamento.

A reologia é o estudo da deformação dos materiais submetidos à aplicação de forças. A viscosidade é a medida da fricção interna do fluido (LEWIS, 1993). A fricção se torna aparente quando uma camada de fluido passa a se mover em relação à outra camada. A força necessária para causar este movimento é denominada cisalhamento. Portanto, fluidos de maior viscosidade requerem maior força para o movimento do que materiais menos viscosos (BROOKFIELD).

Segundo Singh & Heldman (1993), a propriedade do fluido que tem a maior influência nas características de escoamento de um produto é a viscosidade, que descreve a magnitude da resistência ao escoamento devido a forças de cisalhamento dentro de um fluido.

Os iogurtes apresentaram viabilidade de bactérias lácticas durante todo o período de 29 dias de armazenamento, Figura 3 D, e apesar da diminuição nas contagens, a viabilidade da cultura probiótica se manteve superior a  $10^7$  UFC/mL, estando em conformidade com o estipulado pela legislação, que determina que os microrganismos dos cultivos utilizados devem ser viáveis e ativos e estar em concentração igual ou superior a  $10^7$  UFC/g no produto final e durante o prazo de validade (BRASIL, 2007). Os resultados confirmam os de Gallina et al. (2010) em leites fermentados, de Perez et al. (2007) em iogurte com adição de biomassa de *Spirulina platensis* e de Duarte et al. (2013) em iogurtes. A análise da contagem de microrganismos psicrotróficos no iogurte teve como objetivo a comprovação da eficiência do tratamento térmico de 90°C/três minutos, que se mostrou eficaz, pois não foi constatada presença de microrganismos psicrotróficos nos iogurtes produzidos com o leite de zero, 24, 48 e 72 horas de estocagem.

Os valores de matéria seca, cinzas, proteína e gordura são mostrados na Tabela 3. Os resultados da matéria seca e cinzas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), os teores de proteína não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), a gordura, no entanto,

variou significativamente ( $p < 0,05$ ) no iogurte produzido com o leite estocado por 72 horas.

**TABELA 3** – Valores médios de matéria seca (%), cinzas (%), proteína (%) e gordura (%) de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.

Parâmetros	Tratamentos				CV (%)
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	
Matéria Seca	11,28±0,13d	12,90±0,13a	12,34±0,11b	11,74±0,08c	0,95
Cinzas	0,82±0,11b	0,85±0,16a	0,81±0,14c	0,78±0,06d	0,15
Proteína	3,47±0,04a	3,33±0,25a	3,38±0,17a	3,41±0,17 <sup>a</sup>	5,18
Gordura	4,42±0,20a	4,41±0,21a	4,50±0,07a	3,32±0,10b	3,92

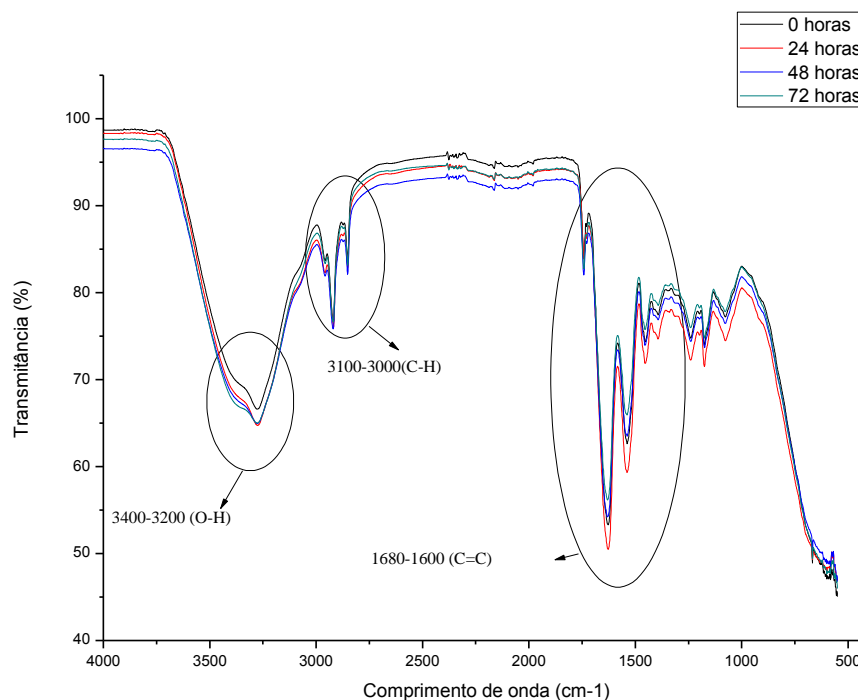
\*Letra minúscula na linha difere significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O valor da matéria seca do iogurte natural foi menor que os valores relatados por Mantovani et al. (2012), que variaram de 20,1% a 29,9% em iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais.

Os teores de cinzas, proteínas e gordura do presente estudo foram semelhantes aos verificados por Mantovani et al. (2012), 0,46% a 0,9%, 3,14% a 5,89% e 3,0% a 4,0%, respectivamente. Gerhardt et al. (2013), em bebidas lácteas fermentadas, utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado, verificaram valores de gordura menores do que os do presente estudo, variando de 2,90% a 3,10%, e valores de cinza e proteína semelhantes, 0,88% a 1,06% e 2,99% a 4,44%, respectivamente.

Os resultados de cinzas, proteínas e gordura foram superiores aos relatados por Oliveira et al. (2014) em iogurtes produzidos com tapioca (cinzas de 0,36% a 0,63%, proteína de 1,94% a 2,92% e gordura de 1,61% a 3,13%) e aos de Costa et al. (2013) em estudo com bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes (cinzas de 0,52% a 0,62%, proteína de 2,21% a 2,58% e gordura de 1,47% a 1,63%).

Na avaliação do infravermelho, Figura 4, foram observados grupos polares tais como -OH e -H, possivelmente em decorrência do teor elevado de carboidratos e proteínas (macromoléculas) presentes no iogurte.



**FIGURA 4** – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho de iogurtes obtidos do leite refrigerado até 72 horas.

A análise do leite por infravermelho baseia-se na absorção da radiação por alguns de seus componentes como gordura, proteína e lactose (BIGGS et al., 1987). A gordura apresenta os grupos carbonilas (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos e os grupos carbono-hidrogênio (C-H), que absorvem radiação no comprimento de onda de  $5,7\mu\text{m}$  e  $3,5\mu\text{m}$ , respectivamente. Os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas absorvem radiação em  $6,5\mu\text{m}$  e os grupos hidroxila (OH) da lactose em  $9,6\mu\text{m}$  (IDF, 1996). Os sólidos totais podem ser obtidos pela soma do conteúdo de gordura, proteína e lactose, acrescidos de uma constante de minerais ou pela absorção da radiação no comprimento de onda  $4,3\mu\text{m}$  dos grupos hidroxila (H-OH) das moléculas de água. A relação entre a energia absorvida e a concentração de cada 20 componentes é definida pela lei de Lambert Beer, que estabelece que a absorbância é diretamente proporcional à concentração do soluto (BIGGS et al., 1987).

## 4 CONCLUSÃO

A avaliação da qualidade do leite cru estocado por longos períodos apresentou acidez titulável fora do padrão estabelecido pela legislação, e fatores como leite

proveniente de vacas com mamite, adição de substância alcalina, estado nutricional do rebanho ou presença de água podem ter influenciado tanto na acidez como no pH.

A viscosidade do leite está diretamente ligada à contagem de bactérias psicrotóxicas, pois ambas apresentaram valores crescentes, mostrando que quanto maior a viscosidade, maior a contagem de psicrotóxicos no leite. Estas bactérias também influenciaram no rendimento de massa do leite, que foi maior no leite estocado por zero hora.

Os resultados obtidos neste estudo servem para fornecer informações de alerta aos produtores bem como aos órgãos de fiscalização de que o leite estocado por períodos de até 72 horas pode oferecer prejuízos econômicos e prejudicar a saúde pública.

No iogurte, a cinética da fermentação apresentou menores valores para os iogurtes produzidos com o leite estocado por 24 e 72 horas e maiores valores para os iogurtes produzidos com o leite estocado por zero e 28 horas. A acidez titulável, bactérias lácticas, matéria seca, cinzas e os teores de gordura e proteína ficaram dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira. Na avaliação do infravermelho, observou-se que existem grupos polares, carbono hidrogênio e alceno.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. L. C. B. B.; ALVARENGA, M. G. Farelo de arroz: composição química e seu potencial como alimento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba**, v. 34, n. 1, p. 95-108, 1991.

ALMEIDA, A. A. Microrganismos psicrotróficos em leite e derivados. **Juiz de Fora: Anais XVIII Congresso Nacional de Laticínios**, v. 53, n. 304, p. 40-43, 1998.

AOAC INTERNATIONAL - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**, 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico República Federativa do Brasil, Brasília, 30 de dezembro de 2011. Seção 1, p.1-24.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 out.2007. Seção 1, p. 5, 2007.

BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, 74, 8 (1984), 647-652.

BIGGS, D. A., JOHANSSON, G.; SJAUNJA, L.O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. Bulletin of the International **Dairy Federation**, n. 2008, p. 21-29, 1987.

BOLAND, M. Influences on raw milk quality. In: SMITH, G. (Ed.) **Dairy Processing: Improving Quality**, CRC Press: Boca Raton, Boston, New York, Washington, Cap.3. 2003.

BRANDÃO, V.I ; TALMA, S. V. ; MARTINS, M. L. ; MARTINS, A.D.O. ; PINTO, C. L. O. . Qualidade do leite produzido no município de Rio Pomba, MG, com base em aspectos regulatórios.. **Perspectivas online: biológicas e saúde**, v. 9, p. 46, 2013.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: F.H. Madalena; L.L. de Matos; E.V. Holanda Jr.. (Org.). **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, v.,p. 61- 74, 2001.

BROOKFIELD. More solutions to stick problems. Brookfield Engineering, Inc. [s.d.].

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech J Anim Sci**, v. 54, n. 2, p. 65–73, 2009.

CEMPIRKOVA, R. Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in re-lation to selected factors, **Czech Journal of Animal Science** 52(11), 387- 393, 2007.

COSTA, ALEXSANDRA VALERIA S ; NICOLAU, EDMAR SOARES ; TORRES, MARIA CELIA L ; FERNANDES, PATRICIA RODRIGUES ; ROSA, SARAH INES R ; NASCIMENTO, RAKEL CANDIDO . Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 34, p. 209-226, 2013.

CUNHA NETO, O. C. da; OLIVEIRA, C. A. F. de; HOTTA, R. M.; FRANZOLIN NETO, R. Estudo da qualidade do iogurte natural batido produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.3, p. 448-453, 2005.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de análise de variância. **Versão 5.3**. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FRIGHETTO, J. M. ; SILVA, S. V. da ; PELLEGRINI, L. G.; MILANI, M. P.; ROBERTO, B. S.; RICHARDS, N. S. P. S. Influência da adição de beta-galactosidase nas características físico-químicas do leite e na cinética de fermentação de iogurte. **Indústria de Laticínios**, v. 90, p. 90-93, 2011.

GALLINA, D. A. Leites fermentados funcionais. **Indústria de Laticínios**, v. 86, p. 30-36, 2010.

GERHARDT, Â.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 68, n. 390, p. 41-50, jan./fev. 2013.

GAUCHER, I.; MOLLÉ, D.; GAGNAIRE, V.; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.130-143, 2008.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7162-7168, 2007.

IDF. Whole milk. Determination of milkfat, protein and lactose content. Guide for the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF, 1996. (**International Dairy Federation Standards 141B**).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2005.

IZIDORO, T. B.; SPINA, T. L. B.; TUASEK, S. O.; PEREIRA, J. G.; BARROS, V. R. M.; PINTO, J. P. A. N. Influência do resfriamento marginal sobre a multiplicação de microrganismos psicrotróficos e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, Nov/Dez, nº 371, 64: 55-60, 2009.

JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HOORDE, K. V.; MESSENS, W.; LANDSCHOOT, A. V.; VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of Storage Conditions on the Growth of Pseudomonas Species in Refrigerated Raw Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

KASNOWSKI, M. C.; FRANCO, R. M. ; CORTES, M. A. S. ; CORTEZ, N. M. S. Ação Antagonista de Bactérias Lácticas Frente ao Crescimento de Estirpe Patogênica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 16, 2013.

KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R. L.; VALDUGA, E; LUCCIO, M.; TREICHE, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, p.170-177, 2008.

LAWRENCE, R.C. Processing Conditions. In: MANN, A.R. (Ed.) International Dairy Federation Special Issue no. 9301: Factors affecting the yield of cheese, **International Dairy Federation: Brussels**, a, Cap.7. 1991.

LIMA, C. M. F. Monitoramento de temperaturas de equipamentos de refrigeração em supermercados da cidade de Maceió – AL. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.25, n. 194/195, p. 35-39, 2011.

LEWIS, M. J. Physical properties of dairy products. In: Robinson, R. K. **Modern Dairy Technology**, 2. Ed. London, Chapman & Hall, p. 331-380, 1993.

MACEDO, R. E. F. Desenvolvimento de bebida láctea fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala por cultura mista de *Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium adolescentis*. 1997. 112 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química)**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

MANTOVANI, D.; Corazza, M. L.; CARDOZO FILHO, L.; COSTA, S. C. Elaboração de iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais, análise físico-química e perfil da textura. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, p. 680-687, 2012.

MARTH, E.H.; ELLICKSON, B.E. Antibiotics residues in milk products – A review. *Journal of Milk Food Technology*, 22, 7 (1959), 241-249.

MARTINS, M. L. Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quorum sensing em bactérias psicrotróficas isoladas de leite. 2007. 163f. **Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)** - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG, 2007.

MARTINS, M. L.; ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, H. C.; MORAES, C. A.; VANETTI, M. C. D. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 203-211, 2005.

MENDES, E. A. S.; PIRES, C. V.; SILVA, A. M.; SILVA, L. S. Qualidade do leite cru refrigerado em função do tipo de ordenha coletado de produtores do município de Paracatu-MG. **Zootecnia**, v.1, n.2, p.63-71, 2014.

MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A. da; JÁCOME, C. G. M.; LEITE, A. I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró-RN. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, 2010

MENDONÇA, M. B. O.C.; CURIKIB, Y.; JULIANIC, G.; Elsa Helena Walter de SANTANAD, E. H. W.; ALEGROE, L. C. A. Qualidade Físico-Química de Amostras de Leite Cru Comercializadas Informalmente no Norte do Paraná. **Cient., Ciênc. Biol. Saúde**; 11 (4):47-50, 2009.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; FIGUEIREDO, R. M. F.; FEITOSA, R. M. . Development and characterization of yogurts produced with tapioca. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, p. 110-120, 2014.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n.1, p. 172-176, 2003.

ORDONEZ, J. A. Tecnologia de Alimentos - Origem Animal. **São Paulo: Artmed**, 2007.

PEREZ, K. J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. **Alim. Nutr.** Araraquara v.18, n.1, p.77-82, jan./mar. 2007.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento. **Semina. Ciências Agrárias** (Impresso), v. 33, p. 1059-1070, 2012.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; D`OVIDEO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.5, p.828-834, mai, 2015.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, v. 2, p. 77-95, 2012.

SANTOS, A.S.; PIRES, C.V.; SANTOS, J.M.; COSTA SOBRINHO, P.S. Crescimento de micro-organismos psicrotóxicos em leite cru refrigerado. **Alim.Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, jul./set. 2013.

SANTOS, M. V & FONSECA, L. F. L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite. **São Paulo: Lemos Editorial**, 314 p. 2007.

SILVA, A. R. ; MORO, L. M. E. ; PINTO, E. G.; SOUZA, A. F. ; FRANCO, B. . Estudo do comportamento cinético e reológico da fermentação láctica na produção de iogurte natural. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1908-1913, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Manual de Métodos de análises microbiológicas de alimentos. 3. ed., **São Paulo: Livraria Varela**, 552p. 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. **São Paulo: Varela**, 1997.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R. Introducción a la Ingeniería de los alimentos. **Zagaroa: Acribia**, p.544, 1998.

SHIRAI, M ; MASSON, M. L. Metodologia de Superfície de Resposta para avaliar o efeito da carbonatação sobre a microbiota e viscosidade do leite cru. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, p. 18-27, 2010.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciência y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, Espanha, 1991.

VASCONCELOS, M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. **R. bras. Agrociência**, v. 10, n. 4, p. 499-502, 2004.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do Índice Proteolítico e do Comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.698- 704, 2005.

VIOTTO, W.H., CUNHA, C.R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: MESQUITA, A.J., DURR, J.W., COELHO, K.O. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. **Goiânia: Talento**, 2006, v.1, p. 241-258.

ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61 -70 jan./jun. 2013.

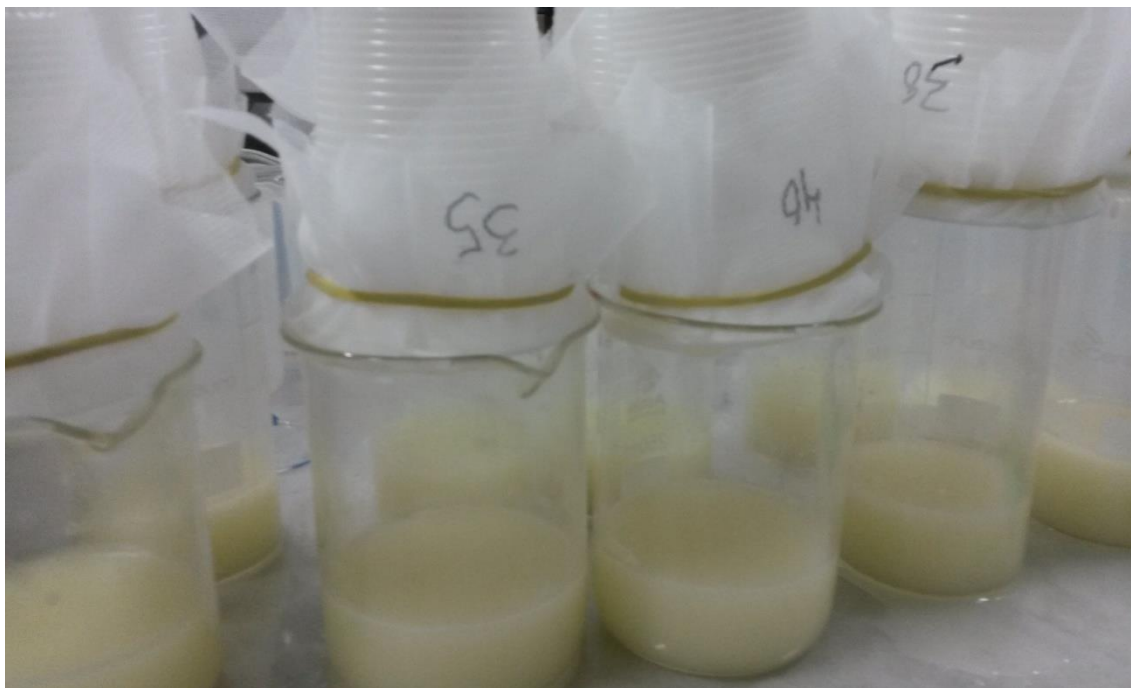
## ANEXOS



**FIGURA 5** – Envase dos iogurtes.



**FIGURA 6** – Contagem de microrganismos psicrotróficos.



**FIGURA 7** – Avaliação do rendimento.