

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais

Gisely Peron Gasparoni

**QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MINAS  
GERAIS, E IMPACTO DA ADIÇÃO DE AGENTES BIOPROTETORES**

Rio Pomba

2024

Gisely Peron Gasparoni

**QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MINAS  
GERAIS, E IMPACTO DA ADIÇÃO DE AGENTES BIOPROTETORES**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Maurilio Lopes Martins

Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho

Humberto Moreira Húngaro

Rio Pomba

2024

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.**

**Bibliotecária responsável: Tatiana dos Reis Gonçalves Ferreira.  
CRB 6 - 2711**

G249q

Gasparoni, Gisely Peron.

Qualidade do leite cru refrigerado do município de Ubá, Minas Gerais, e impacto da adição de agentes bioprotetores. - Rio Pomba, 2024.

91f. : il.

Orientador: DSc Maurilio Lopes Martins.

Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-graduação Stricto Sensu em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Ciência e tecnologia de alimentos. 2. Produção de leite. 3. Agricultura familiar. 4. Leite cru. I. Martins, Maurilio Lopes (Orient.). II. Título.

CDD 637.1

Gisely Peron Gasparoni

**QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MINAS  
GERAIS, E IMPACTO DA ADIÇÃO DE AGENTES BIOPROTETORES**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em: 09/10/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

Bruno Ricardo de Castro Leite Junior  
Doutor em Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Viçosa

---

Fabiana de Oliveira Martins  
Doutora em Alimentos e Nutrição  
Universidade Estadual de Campinas

---

Humberto Moreira Húngaro  
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

João Batista Ribeiro  
Doutor em Microbiologia Agrícola  
Embrapa Gado de Leite

---

Prof. Maurilio Lopes Martins  
Doutor em Microbiologia Agrícola  
IF Sudeste MG

Dedico este trabalho aos meus filhos Davi e Theo,  
à minha mãe Cleia,  
ao meu esposo Celso,  
que foram meu chão  
e minhas asas nesta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser presença viva em todos os momentos da minha vida.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, pela oportunidade de contribuir com a ciência e bem comum.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Universidade Federal de Juiz de Fora e à empresa parceira pela doação, respectivamente, do bacteriófago e das culturas comerciais para a realização do projeto.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) do Campus Rio Pomba, por ser espaço de partilha e aprendizados para ciência e para vida.

Ao mais querido e sábio orientador, professor Maurilio Lopes Martins, por toda paciência, leveza e carinho em todos os momentos.

Aos coorientadores, professores Humberto Moreira Húngaro e Antônio Fernandes de Carvalho por dedicarem com nobreza tempo e conhecimento para a realização desse projeto.

Aos demais membros da banca, professores João Batista Ribeiro, Bruno Ricardo de Castro Leite Junior e Fabiana de Oliveira Martins pelas correções do trabalho e constante cordialidade e carinho.

Ao grupo de trabalho envolvido na realização da etapa experimental desse projeto, amigos que ganhei de presente, Mayra Aparecida Silva Reis, Ana Carolina de Paula Esteves e Tiago Medeiros Neves, pela dedicação incansável ao projeto.

À Pietra Riguette Reis, estagiária de nutrição da Universidade Federal de Viçosa, pelo empenho no trabalho com o banco de dados dos produtores de leite da Seção de Segurança Alimentar e Nutricional (SSAN) da prefeitura de Ubá.

Ao Rafael Junio Rombardi da Silva, mestrando em Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa pelo apoio, amizade e auxílio nas análises estatísticas dos dados obtidos da SSAN.

Aos maravilhosos professores do DCTA pela doação ao propósito de ensinar.

Ao professor Roselir Ribeiro da Silva pela realização, sem hesitar, das análises estatísticas dos capítulos 2 e 3 dessa dissertação.

À carinhosa Patrícia Rodrigues Condé e a dedicada Renata Cristina de Almeida Bianchini Campos, técnicas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA pelo apoio constante na etapa experimental.

Ao Rosélio, técnico do Laboratório de Análises Físico-químicas, sempre disponível e dedicado, até mesmo durante a greve.

À minha equipe de trabalho da SSAN de Ubá, MG, Alexandre, Angela, Fátima, Felipe, Jeferson, João, José, Júlio, Marcela, Renata, Ulisses, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Prefeitura Municipal de Ubá, pela oportunidade de realizar um sonho atrelado ao propósito de desenvolver esse projeto de tamanha relevância à Política Municipal de Segurança Alimentar e Nutricional de Ubá, MG.

À Secretaria Municipal de Desenvolvimento Social, em especial ao Flávio Monteze, pela amizade, apoio incondicional e por não medir esforços para essa realização desde o primeiro momento.

À minha Mãe, minha referência de ética, lisura e amor, por ser meu chão e minhas asas.

Aos meus filhos, Davi e Theo, por representarem a certeza de que todo esforço valeu a pena pois a minha espera teria os mais lindos sorrisos e os mais prazerosos abraços.

Ao meu esposo, Celso (Nem), por ser presença constante em nosso lar, pelo apoio, amor e incentivo.

Ao meu Pai, pelo carinho e demonstração de orgulho com as minhas realizações.

Ao meu trio do mestrado, nós três na luta, Aline Roberta de Souza Soares e Laís Ramos de Oliveira, indispensáveis para essa trajetória exitosa.

À minha turma do mestrado pelo lindo caminho que trilhamos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do grupo de biocontrole, Pedro, Emanuelle e Bruna, pelas partilhas necessárias e felizes.

E a todos aqueles que colaboraram para a criação, desenvolvimento e conclusão deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

“O saber a gente aprende  
com os mestres e os livros.  
A sabedoria se aprende é  
com a vida e com os humildes.”  
Cora Coralina

## RESUMO

O leite é importante à nutrição humana em todos os ciclos da vida, sendo de grande relevância na agropecuária brasileira. Este trabalho objetivou caracterizar as propriedades e os fatores que interferem na qualidade do leite cru refrigerado granelizado do município de Ubá, Minas Gerais, e avaliar a bioproteção do fago UFJF\_PfSW6 e de uma cultura comercial de *Pediococcus acidilactici* na qualidade do leite cru. Inicialmente, características e condutas relacionadas à produção de leite bovino foram obtidos de um banco de dados da Seção de Segurança Alimentar e Nutricional (SSAN) da Prefeitura Municipal de Ubá, MG. Entre outubro e novembro de 2023, avaliou-se a qualidade microbiológica, ao longo de três dias de armazenamento a 4,0 °C, de oito amostras de leite cru refrigerado granelizado do município (amostras controle) e após a inoculação de  $5,0 \times 10^5$  UFP/mL do fago UFJF\_PfSW6, por meio da determinação da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicotróficos, psicotróficos proteolíticos, psicotróficos lipolíticos, psicotróficos produtores de lecitinase, *Staphylococcus* spp. e de bactérias lácticas. Em maio de 2024, realizou-se os mesmos procedimentos para quatro amostras de leite cru refrigerado granelizado (amostras controle) e inoculadas com  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL da cultura *P. acidilactici*, potencialmente bioprotetora. Avaliou-se ainda a acidez titulável das amostras controle e inoculadas. Em relação ao banco de dados estudado, de um total de 29 propriedades, 72% detinham a certificação sanitária do seu empreendimento, apenas 17% dos cadastrados realizavam o pré *dipping*, 13% resfriavam o leite imediatamente e os demais demoravam até 2 horas após a ordenha para realizar essa atividade. O compartilhamento de tanques de granelização acontecia em 24% das propriedades avaliadas. Mais de 50% dos ordenhadores nunca foram treinados. Além disso, a padronização da higienização dos equipamentos e utensílios usados na ordenha não era bem descrita pelos respondentes do formulário aplicado pela SSAN. No entanto, foi relatada frequência acima de 80% na realização dos procedimentos de higienização. Dos estabelecimentos, 4% eram produtores de derivados lácteos, o que chama atenção para a possibilidade de fomento às agroindústrias com o objetivo de agregar valor ao leite e desenvolvimento econômico local. Portanto, a avaliação dos dados cadastrais desse setor público converge para a necessidade de estratégias a fim de promover a conformidade do leite cru refrigerado com as legislações brasileiras e fomento às agroindústrias com o objetivo de agregar valor ao leite e desenvolvimento econômico local. Em relação à caracterização microbiológica e de acidez das amostras, constatou-se aumento ( $p < 0,05$ ), ao longo do armazenamento, das contagens médias de microrganismos mesófilos ( $> 5,12$  log UFC/mL), psicotróficos ( $> 4,69$  log UFC/mL), psicotróficos proteolíticos ( $> 4,69$  log UFC/mL), psicotróficos lipolíticos ( $> 3,43$  log UFC/mL) e psicotróficos produtores de lecitinase ( $> 3,81$  log UFC/mL) e, dos valores de acidez titulável ( $> 0,15$  g de ácido láctico/100 mL). A contagem de *Staphylococcus* spp. não apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Além disso, não foi constatado efeito bioprotetor dos agentes avaliados na microbiota contaminante do leite cru refrigerado granelizado uma vez que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na contagem média de microrganismos comparando-se as amostras controle e inoculadas. Portanto, a utilização de biocontrole em leite cru refrigerado granelizado requer mais estudos empregando-se outras culturas a fim de atender a demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e livres de conservantes. A escolha da estirpe de biocontrole a ser utilizada deve ser realizada com cautela para que a mesma seja resolutiva na prevenção da deterioração do leite cru. Sugere-se ainda, novos estudos com contagens dos biocontroles inoculados

maiores que as da microbiota contaminante das amostras de leite cru a fim de avaliar possíveis efeitos inibitórios.

**Palavras-chave:** Zona da Mata. Leite cru. Granelização. Caracterização. Bioproteção.

## ABSTRACT

### QUALITY OF COOLED RAW MILK IN UBÁ, MINAS GERAIS, AND IMPACT OF ADDING BIOPROTECTIVE AGENTS

Milk is important for human nutrition in all life cycles, being of great relevance in Brazilian agriculture. This work aimed to characterize the properties and factors that affect the quality of bulk cooled raw milk from Ubá, Minas Gerais, and evaluate the bioprotection of the phage UFJF\_PfSW6 and the commercial culture of *Pediococcus acidilactici* on raw milk quality. Initially, characteristics and behaviors related to bovine milk production were obtained from a database from the Food and Nutritional Security Section of Ubá, MG. Then, the microbiological quality of cooled raw milk samples was evaluated by determining the count of aerobic mesophilic, psychrotrophic, proteolytic psychrotrophic, lipolytic psychrotrophic, lecithinase-producing psychrotrophic, *Staphylococcus* spp. and lactic acid bacteria in control raw milk samples over three days of storage at 4.0 °C and after inoculation with the  $5,0 \times 10^5$  PFU/mL of UFJF\_PfSW6 phage or with the potentially bioprotective with the  $1,0 \times 10^5$  CFU/mL of *P. acidilactici* culture. The titratable acidity of the control and inoculated samples was also evaluated. In relation to the database studied, of a total of 29 properties, 72% of producers have health certification for their enterprise, only 17% of those registered carry out pre-dipping and 13% cool the milk immediately and the rest took up to 2 hours after milking to carry out this activity. Sharing of bulk tanks occurs in 24% of the properties evaluated. More than 50% of milkers have never been trained. Furthermore, the standardization of hygiene of equipment and utensils used in milking is not well described by respondents to the form applied. However, a frequency above 80% in carrying out hygiene procedures is reported. Of establishments, 4% producing dairy products found in this study draws attention to the possibility of promoting milk processing with the aim of adding value to milk and local economic development. Therefore, the evaluation of registration data from this public sector converges on the need for strategies to promote compliance of cooled raw milk with Brazilian legislation and promotion of agroindustries with the aim of adding value to milk and local economic development. Regarding the microbiological and acidity characterization of the samples, an increase ( $p < 0.05$ ) was found, throughout storage, in the average counts of mesophilic ( $> 5,12$  log CFU/mL), psychrotrophic ( $> 4,69$  log CFU/mL), proteolytic psychrotrophic ( $> 4,69$  log CFU/mL), lipolytic psychrotrophic ( $> 3,43$  log CFU/mL) and lecithinase-producing psychrotrophic ( $> 3,81$  log CFU/mL) and, of titratable acidity values ( $> 0,15$  g of lactic acid/100 mL). The *Staphylococcus* spp. count showed no difference ( $p < 0.05$ ). Furthermore, no bioprotective effect of the evaluated agents was observed in the contaminating microbiota of refrigerated bulk raw milk, since there was no difference ( $p > 0.05$ ) in the mean count of microorganisms when comparing the control and inoculated samples. Therefore, the use of biocontrol in refrigerated bulk raw milk requires further studies using other cultures in order to meet consumer demand for healthy, preservative-free foods. The choice of the biocontrol strain to be used must be made with caution so that it is effective in preventing the deterioration of raw milk. Further studies are also suggested with counts of the inoculated biocontrols higher than those of the contaminating microbiota of the raw milk samples in order to evaluate possible inhibitory effects.

**Keywords:** Zona da Mata. Raw milk. Bulk milk. Characterization. Bioprotection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo III

Figura 1. Fluxograma de obtenção e caracterização das amostras de leite cru controle e inoculadas individualmente com as culturas potencialmente bioprotetoras.....	71
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 - Parâmetros nutricionais e de qualidade no leite cru.....	24
---	----

### Capítulo II

Tabela 1 - Identificação de uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG.....	51
Tabela 2 - Manejo e BPA em uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG.....	53
Tabela 3 - Dados quantitativos 29 produtores de leite de Ubá, MG.....	58
Tabela 4 - Interferência de escolaridade e treinamento de ordenhadores e proprietários no volume de leite produzido por vaca.....	59
Tabela 5 - Contagem média (n=8) de microrganismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nas amostras de leite cru.....	59
Tabela 6 - Qualidade microbiológica (log UFC/mL) das amostras (n=8) de leite cru.....	61
Tabela 7 - Características físico-químicas das amostras de leite cru.....	62

### Capítulo III

Tabela 1 - Contagem média (n=8) de microrganismos nas amostras de leite cru controle (não inoculadas) e inoculadas com fago UFJF_PfSW6.....	74
Tabela 2 - Contagem (n=4) de microrganismos nas amostras de leite cru controle (não inoculadas) e inoculadas com a cultura comercial de <i>P. acidilactici</i> .....	76
Tabela 3 - Acidez (g de ácido láctico/100mL) das amostras de leite cru controle e inoculado com culturas potencialmente bioprotetoras.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APHA	<i>American Public Health Association</i>
BAL	Bactérias do Ácido Lático
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAF	Cadastro Nacional da Agricultura Familiar
CCS	Contagem de Células Somáticas
CBT	Contagem de Bactérias Totais
CPB	Cultura potencialmente bioprotetora
CPP	Contagem Padrão em Placas
DAP	Declaração de Aptidão ao Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (DAP)
DBC	Delineamento em Blocos Casualizados
EQ	Equação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
g	Gramas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IF Sudeste MG	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais
ISO	International Organization for Standardization
LGPD	Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais
mL	Milímetro
MG	Minas Gerais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDS	Ministério de Desenvolvimento Social e Assistência Social, Família e Combate à Fome
MRS	Ágar de Man Rogosa Sharpe
PCA	Plate Count Agar
PMSAN	Política Municipal de Segurança Alimentar e Nutricional
PNQL	Programa Nacional de Qualidade do Leite
pH	Potencial Hidrogeniônico
PAA	Programa de Aquisição de Alimentos
PIB	Produto Interno Bruto

PPM	Pesquisa Pecuária Municipal
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SMCA	Ágar MacConkey sorbitol
SSAN	Seção de Segurança Alimentar e Nutricional
TBCA	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TSA	Ágar Trypticaseína de Soja
TTC	cloreto de trifeniltetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>22</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
<b>1. LEITE: ASPECTOS NUTRICIONAIS E DE QUALIDADE .....</b>	<b>22</b>
<b>2. PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL, EM MINAS GERAIS E NO MUNICÍPIO DE UBÁ .....</b>	<b>25</b>
<b>3. PRODUÇÃO DE LEITE E AGRICULTURA FAMILIAR.....</b>	<b>27</b>
<b>4. MICROBIOTA CONTAMINANTE DO LEITE CRU E PROBLEMAS TECNOLÓGICOS PARA A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5. CULTURAS BIOPROTETORAS E SUA APLICAÇÃO EM LEITE E DERIVADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
2.1. COLETA E ANÁLISE DE DADOS DAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE DE UBÁ .....	47

2.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU E AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DO PRODUTO NO TANQUE DE GRANELIZAÇÃO .....	48
2.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG.....	48
2.4. AVALIAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL DAS AMOSTRAS.....	50
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE DE UBÁ .....	50
3.2. ADEQUAÇÃO ÀS BPA E AO MANEJO EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DE UBÁ, MG.....	52
3.3. REBANHO BOVINO E PRODUÇÃO LEITEIRA EM PROPRIEDADES RURAIS DE UBÁ, MG .....	57
3.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO OBTIDAS DE TANQUES DE GRANELIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG.....	59
3.5. ACIDEZ DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO OBTIDAS DE TANQUES DE GRANELIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG .....	62
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>68</b>
<b>ADIÇÃO DE CULTURAS BIOPROTETORAS NO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO .....</b>	<b>68</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>2.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>

2.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU E AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DO TANQUE DE GRANELIZAÇÃO .....	70
2.2. INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE COM AGENTES POTENCIALMENTE BIOPROTETORES.....	70
2.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG.....	72
2.4. AVALIAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL DAS AMOSTRAS.....	73
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	73
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
3.1. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO CONTROLE E INOCULADO COM O FAGO UFJF_PfSW6.....	73
3.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO CONTROLE E INOCULADAS COM <i>P. acidilactici</i> .....	75
3.3. ACIDEZ DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU CONTROLE OU INOCULADO COM CULTURAS POTENCIALMENTE BIOPROTETORAS.....	78
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO II - APÊNDICE 1 .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite e os derivados lácteos são importantes à saúde humana em todos os ciclos da vida. Pela sua composição nutricional rica em proteínas e micronutrientes como cálcio e vitaminas lipossolúveis, esse grupo de alimentos é de interesse para a adequada promoção da nutrição humana.

Em 2023, segundo dados do Serviço Internacional de Agricultura do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2023), o Brasil foi classificado como o terceiro maior produtor de leite do mundo com 27,69 milhões de toneladas, que representam 4% do volume produzido mundialmente.

Apesar de possuir grande área territorial apta e com potencial para a pecuária leiteira, o Brasil ainda tem produção aquém da demanda necessária para atender as orientações adequadas de consumo humano. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2023), somente no primeiro semestre de 2023 o Brasil importou 1 bilhão de litros de leite, 300% a mais que o total importado no mesmo período de 2022.

Assim, o fomento à melhoria da qualidade do leite e derivados pode ser uma estratégia de relevância a fim de incentivar as políticas econômicas locais e regionais, promover a segurança alimentar e nutricional e a soberania alimentar do país, considerando o consumo amplo e crescente desse alimento. Além da disponibilidade quantitativa para a oferta de leite e derivados a fim de suprir as demandas nutricionais da população, a qualidade deve ser foco no que tange a obtenção de leite no Brasil e em Minas Gerais, que segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, é o estado com maior produção desse alimento no país (IBGE, 2022). A qualidade do leite cru, processado e dos produtos lácteos deve ser foco de preocupação, uma vez que reflete a saúde do animal e a adequação aos processos adotados na obtenção, com ênfase nas boas práticas que devem ser aplicadas por meio das padronizações disponíveis na legislação.

O armazenamento a 4,0 °C pós-ordenha favorece as características microbiológicas do leite bovino cru por inibir ou reduzir o metabolismo de microrganismos mesófilos aeróbios inibindo a sua acidificação. Entretanto, quando o leite cru é obtido em condições higiênicas insatisfatórias, o mesmo é acessado por diversos microrganismos, incluindo os psicrotóxicos deterioradores, que produzem enzimas extracelulares como proteases, lipases e lecitinas que comprometem a

integridade do leite por hidrólise de proteína e gordura, respectivamente. Assim, a melhoria na qualidade do leite ofertado pode ser favorecida pela adoção de medidas sanitárias e adequação de processos durante a obtenção, transporte e beneficiamento, bem como o desenvolvimento de programas de assistência aos produtores e estratégias científicas que reduzam a contagem microbiana com perfil deteriorante no leite.

A inclusão de culturas bioprotetoras tem sido estudada como alternativa natural para a promoção de melhorias na qualidade do leite. Essas culturas, ao serem adicionadas em alimentos, têm ação na redução da contagem microbiana indesejável constituída por microrganismos deterioradores e patogênicos, o que impacta positivamente a qualidade da matéria-prima. Portanto, o tempo de prateleira do leite e derivados pode ser ampliado por meio da inclusão de bioprotetores resultando em benefícios a toda a cadeia produtiva e de escoamento dos produtos lácteos.

Dessa forma, esta dissertação está estruturada em três capítulos. No Capítulo I desenvolve-se uma revisão bibliográfica com tópicos que destacam os aspectos nutricionais e de produção do leite no Brasil e em Ubá, Minas Gerais, abordagens conceituais sobre a microbiologia do leite cru e os problemas tecnológicos que desafiam a indústria de laticínios, além de culturas bioprotetoras e sua aplicação em leite e derivados. No Capítulo II, aborda-se a caracterização de produtores de leite obtida por meio da análise de dados da Seção de Segurança Alimentar e Nutricional (SSAN) da Prefeitura de Ubá, MG e a avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de amostras de leite cru obtidas de tanques de granelização, eleitos aleatoriamente. Além disso, os possíveis efeitos bioprotetores do bacteriófago UFJF\_PfSW6 e de uma cultura comercial de *Pediococcus acidilactici* no leite cru é abordado no capítulo III.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar as propriedades e os fatores que interferem na qualidade do leite cru refrigerado granelizado do município de Ubá, Minas Gerais, e avaliar a bioproteção do fago UFJF\_PfSW6 e de cultura comercial de *P. acidilactici* na qualidade do leite cru.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil dos produtores de leite e os fatores que interferem na qualidade desse alimento por meio dos dados da SSAN da Prefeitura Municipal de Ubá, MG;
- Avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado granelizado do Município de Ubá, MG;
- Determinar, ao longo de três dias de armazenamento a 4,0 °C, a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos, psicrotróficos produtores de lecitinase, *Staphylococcus* spp. e de bactérias lácticas e a acidez titulável nas amostras de leite cru controle (não inoculadas) e após a inoculação do fago UFJF\_PfSW6 ou da cultura potencialmente bioprotetora comercial (*P. acidilactici*), além de avaliar a capacidade de bioproteção dos microrganismos nas amostras de leite cru.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. LEITE: ASPECTOS NUTRICIONAIS E DE QUALIDADE

De acordo Walstra *et al.* (2006), leite consiste em uma emulsão líquida cuja fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis e a descontínua é formada por glóbulos de gordura e micelas de caseína. Estes autores mencionam a composição química média para o leite de 87% de água, 9% de sólidos não gordurosos e 4% de gordura. Ainda segundo esses autores, a porção não gordurosa inclui em média, 3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,6% de cinzas.

O leite é constituído por diversos elementos sólidos (conhecidos também por sólidos totais ou extrato seco total) e, principalmente, por água. Dentre os sólidos, destacam-se: carboidratos, lipídeos, proteínas, minerais e vitaminas (Pinto *et al.*, 2019; TBCA, 2023). Conforme os dados do *Food Data Central* do *Agriculture Research Service*, na fração mineral, em média, estão presentes: cálcio (0,12%), fósforo (0,09%), potássio (0,14%), sódio (0,04%), magnésio (0,01%) e alguns sais (USDA, 2019). As vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e as do complexo B também estão presentes em diferentes quantidades, destacando-se a vitamina A (TBCA, 2023). No leite, também há algumas células (células somáticas), que são oriundas da descamação do tecido da glândula mamária e de células do sistema imune, responsáveis pela defesa do organismo (Beloti *et al.*, 2019). Por seu alto valor nutricional, alta atividade de água e pH próximo da neutralidade, o leite se configura em uma matriz alimentícia propícia à multiplicação microbiana (Martins *et al.*, 2019a)

Frigeri *et al.* (2020), ao avaliarem o efeito de nove anos na sazonalidade, qualidade, composição, produção e preço comercializado pelo litro de leite, em uma fazenda leiteira ao Norte do Estado do Rio Grande do Sul, concluíram que o inverno e a primavera se caracterizaram como as estações com o maior volume de leite comercializado, menores índices de Contagem de Células Somáticas (CCS) e de Contagem de Bactérias Totais (CBT). Já em relação ao preço do litro de leite comercializado, as estações com os maiores valores pagos foram, outono e inverno, seguido de verão e primavera. Além disso, o estudo evidenciou que os principais componentes responsáveis pela formulação do preço comercializado pelo litro de leite,

foram CCS, CBT, gordura, proteína, lactose e volume comercializado. Ainda segundo os autores, as estações do ano e os diferentes anos interferiram na composição, qualidade, produção e no preço do litro de leite.

A produção e a qualidade do leite bovino são influenciadas por fatores como saúde do animal, nutrição, raça, idade ao primeiro parto, período de lactação, ordem de parto, ano, estação de parto, duração da lactação, higiene no momento da ordenha e qual o jato está sendo analisado (Santos *et al.*, 2021).

Os aspectos qualitativos do leite são definidos em acordo com as condições microbiológicas, físicas e químicas. A qualidade do leite cru é alterada pelas boas práticas antes, durante e após a ordenha e pela saúde do animal (Beloti *et al.*, 2019). No que tange a qualidade do leite, há que se atentar ao controle da mastite, uma inflamação da glândula mamária, que acomete a saúde do animal e, por consequência, a qualidade deste alimento. A mastite tem ampla etiologia e pode estar associada à infecção por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, dentre outros microrganismos (Ubaldo *et al.*, 2023). Um dos indicadores utilizados para monitoramento de mastite é a CCS que registra a descamação epitelial do teto bovino e a presença de leucócitos, células associadas à resposta imune do animal (Pinto *et al.*, 2019).

O leite de qualidade é resultante da ordenha de vacas saudáveis com adoção das boas práticas higiênico sanitárias. Após a obtenção, o leite deve ser armazenado imediatamente a 4,0 °C, tendo em vista que o abaixamento da temperatura exerce ação no metabolismo microbiano, inibindo ou reduzindo a multiplicação celular e a atividade enzimática (Brasil, 2018b; Hwang, 2022).

O Ministério da Agricultura e Pecuária preconiza por meio do Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), o arcabouço legal constituído pelo Decreto 9.013, de 29 de março de 2017 (Brasil, 2017), alterado pelo Decreto 10.468, de 18 de agosto de 2020, referente ao Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), que estabelece a obrigatoriedade da inspeção de leite e derivados desde a sanidade do rebanho, obtenção da matéria-prima, sua análise e seleção até a expedição do produto final (Brasil, 2020). Além disso, as Instruções Normativas nº 76 (Brasil, 2018a) e nº 77 (Brasil, 2018b), do MAPA definem a necessidade de análise do leite cru de todos os produtores rurais que fornecem leite a estabelecimentos registrados na inspeção oficial, em frequência mínima mensal, na Rede Brasileira de Laboratórios da Qualidade do Leite (RBQL), credenciada ao MAPA.

O órgão federal propõe, por meio das Instruções Normativas, a padronização que aborda características nutricionais, aspectos sensoriais e físico-químicos do leite cru (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros nutricionais e de qualidade no leite cru

Parâmetros	Dados esperados no leite cru
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	Menor que $3,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (células/mL)	Menor que $5,0 \times 10^5$
Gordura (g/100 g)	Teor mínimo de 3,0
Proteína total (g/100 g)	Teor mínimo de 2,9
Lactose anidra (g/100 g)	Teor mínimo de 4,3
Sólidos não gordurosos (g/100 g)	Teor mínimo de 8,4
Sólidos totais (g/100 g)	Teor mínimo de 11,4
Acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL)	Entre 0,14 e 0,18
Estabilidade ao alizarol na concentração mínima de 72% v/v	Estável
Densidade relativa a 15°C	Entre 1,028 e 1,034
Índice crioscópico	Entre -0,530 °H e -0,555 °H
Agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou do índice crioscópico	Não deve apresentar
Resíduos de produtos de uso veterinário e contaminantes acima dos limites máximos previstos em normas complementares	Não deve apresentar

Fonte: Brasil (2018a); Brasil (2020).

O processo de melhoria da qualidade do leite cru refrigerado depende da atuação de todos os elos que compõem a sua cadeia produtiva – produtores, indústria e governo. O governo deve regulamentar e fiscalizar, a indústria deve dar suporte aos produtores para que as metas sejam atingidas, e, finalmente, os produtores precisam atuar como parte interessada na melhoria da qualidade do leite (Lima *et al.*, 2020), que é um dos temas mais discutidos no cenário nacional da atividade leiteira. O estudo dos principais pontos que interferem na melhoria da matéria prima e seu impacto na cadeia de lácteos torna-se cada vez mais necessário para que se possa padronizar a atividade e com isso conquistar novos mercados consumidores, uma vez que estes estão mais exigentes e a demanda cada vez maior (Strassburger *et al.*, 2019).

Rempel; Muller (2021), em análise de artigos de revisão integrativa compreendendo o período de 2012 a 2020, demonstraram que os parâmetros físico-químicos em leite bovino no Brasil não apresentaram alterações significativas na maior

parte das amostras analisadas nos estudos em questão. Já em relação aos parâmetros microbiológicos, 93% dos estudos analisados demonstraram alterações microbiológicas no leite, a exemplo da presença de coliformes, *Salmonella* spp. e mastitogênicos como *Staphylococcus* spp., que também podem ser considerados indicadores em biossegurança. A adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) é importante para sanar essa contaminação, bem como a instrução dos produtores quanto às questões higiênico-sanitárias envolvidas no processo de ordenha. A forma de armazenamento do leite também é essencial para garantir a sua qualidade, evitando assim perdas na mesma, que acarretam também perdas econômicas ao produtor, além de risco à saúde da população consumidora.

Os produtos lácteos apresentam grande importância no suprimento de alimentos e na geração de empregos e renda no Brasil, sendo potencializadores, por influenciar substancialmente na composição do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (Alvarenga; Gajo; Aquino, 2020). Segundo pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no ano de 2022, a produção de leite nas propriedades atingiu, aproximadamente, R\$ 80 bilhões (IBGE, 2022).

Além da importância econômica, o leite tem papel muito relevante na dieta humana por ser um pilar fundamental ao longo da evolução, fornecendo uma fonte rica e diversificada de nutrientes essenciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde em todas as fases da vida (Dias *et al.*, 2024). Os produtos lácteos podem desempenhar um papel importante no corpo, devido às suas propriedades funcionais, como por exemplo, algumas de suas proteínas e peptídeos que podem apresentar atividades biológicas, incluindo ação antioxidante, antibacteriana, imunomoduladora, antitumoral e anti-hipertensiva (Baptista; Gigante, 2022). Assim, estudos são fundamentais a fim de promover a oferta de leite bovino de qualidade para a população.

## **2. PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL, EM MINAS GERAIS E NO MUNICÍPIO DE UBÁ**

O papel do Brasil como produtor de leite em relação ao mundo se impõe à medida que se entende que o espaço territorial é grande e que muitos estados brasileiros são maiores do que muitos países (Barros *et al.*, 2022).

A bovinocultura leiteira é uma das principais atividades econômicas do Brasil, desempenhando papel importante na renda de milhões de famílias e na

alimentação de qualidade (Santos *et al.*, 2021). Dados do IBGE de 2022 medidos pela Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) informam que 34,6 e 9,4 bilhões de litros correspondem à quantidade de leite produzido no Brasil e em Minas Gerais, respectivamente, para o ano mencionado (IBGE, 2022). Já no segundo trimestre de 2024, a produção no país aproximou-se de 6 bilhões de litros (IBGE, 2024).

No Brasil, o agronegócio do leite registrou um crescimento de 18% entre 2022 e 2023, sendo Minas Gerais o estado maior produtor de leite no país com valor de produção de R\$ 22,88 bilhões de reais, que representa 29% do valor da produção leiteira do Brasil (IBGE, 2022; IBGE, 2023).

O país possui um grande rebanho de gado leiteiro e Minas Gerais é o estado com maior número de produtores desse alimento. Entretanto, existe muito a se fazer para melhorar a qualidade e a quantidade de leite produzido no estado (Martins; Mata, 2020). Minas Gerais ainda possui muitas falhas nos procedimentos de obtenção do leite (Condé *et al.*, 2019). Segundo Linhares *et al* (2021), é necessário promover a conscientização dos produtores de leite na manutenção de boas práticas higiênicas na ordenha, influenciando na busca pela melhoria da qualidade. É indispensável que haja fiscalização em todas as etapas e realização de testes que comprovem a eficácia das ações adotadas na cadeia leiteira para a obtenção de leite de qualidade, que está relacionada a capacitação dos ordenhadores, a existência de instalações adequadas e à nutrição e saúde adequada dos animais (Pereira *et al.*, 2022).

No âmbito global, o ano de 2021 foi desafiador para a cadeia produtiva do leite, motivado pelo cenário de incertezas advindas da pandemia de COVID19. No Brasil, com consumo mais fraco e custos de produção em alta, a rentabilidade da atividade leiteira caiu, e também diminuiu a produção. O volume de leite adquirido pelos laticínios fechou 2021 em 25,079 bilhões de litros com uma queda de 2,19% em relação a 2020 (Rocha; Carvalho, 2021). Segundo dados da pesquisa trimestral do leite do IBGE, os dados de aquisição de leite cru demonstram o valor de 24,4 bilhões de litros de leite cru no ano de 2023 e 12 bilhões de litros no primeiro semestre de 2024.

Nota-se que a disponibilidade atual de leite no Brasil ainda não é suficiente para abastecer o mínimo recomendado pelo Ministério da Saúde, que indica a ingestão em torno de 400 mL de leite por dia para crianças até 10 anos, 700 mL/dia para adolescentes de 10 a 19 anos e para um adulto saudável, 600 mL/dia

(Ministério da Saúde, 2014). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2022) detectou que o brasileiro consome 89% e 41% a mais de refrigerantes e cerveja, respectivamente, quando comparados com a ingestão de leite fluido. Estes resultados são agravados quando se comparam os gastos oriundos do consumo de diversas bebidas. Neste contexto, tem-se que o brasileiro gasta 144% e 137% a mais com refrigerantes e cerveja, respectivamente, quando comparados aos gastos com o consumo de leite fluido (Ministério da Saúde, 2014).

De acordo com IBGE, segundo dados de 2022, o município de Ubá que está localizado na Zona da Mata Mineira tem 103.365 habitantes. Dados do mesmo ano, aferidos pela Pesquisa da Pecuária Municipal informam que a quantidade de leite produzido em Ubá foi 10.372 mil litros, representando 0,1% da produção bovino leiteira do estado, enquadrando o município no 244º lugar de Minas Gerais e totalizando uma receita de, aproximadamente, 24,9 milhões para o ano (IBGE, 2022). O envolvimento das ações governamentais municipais além dos aspectos voltados a regulamentação e fiscalização pode ser o viés que deflagre o sucesso das práticas voltadas à qualidade do leite.

Em Ubá, a SSAN da Prefeitura Municipal tem ações voltadas ao fortalecimento da agricultura familiar e promoção do Direito Humano a Alimentação Adequada, com ênfase a realização de atividades educativas de ampla abrangência ao longo da cadeia produtiva de alimentos. O leite e seus derivados são foco de interesse para as políticas públicas municipais a fim de fornecer em quantidade e qualidade à população, as fontes alimentares ricas em proteínas e demais nutrientes, além de serem possíveis propulsores de desenvolvimento econômico local e regional.

### **3. PRODUÇÃO DE LEITE E AGRICULTURA FAMILIAR**

A agricultura familiar é caracterizada pela geração de empregos e produção de alimentos focada no autoconsumo e apresenta menor produtividade e incorporação tecnológica. A produção familiar também se destaca como fonte de recursos financeiros para famílias de baixa renda, além de reduzir o êxodo rural (Peres *et al.*, 2019).

Apesar da significativa importância socioeconômica da atividade leiteira, este setor ainda necessita de mudanças para se tornar competitivo e sustentável. Assim, faz-

se necessário adotar na propriedade rural procedimentos de manejo adequados para a obtenção de leite cru de alta qualidade, garantir a qualidade do mesmo no processo de estocagem e adequação do seu transporte para a indústria (Strassburger *et al.*, 2019).

A qualidade do leite cru é fundamental para as indústrias se manterem competitivas no mercado. Com o consumidor cada vez mais exigente e uma legislação cada vez mais preocupada em garantir a inocuidade do produto final, as indústrias passaram a procurar meios de incentivar seus produtores a investirem em sua produção. Assim, o pagamento pela qualidade se tornou o modelo mais aceito na cadeia produtiva. No entanto, para que o Sistema de Pagamento por Qualidade cumpra com seu objetivo, é necessário a aceitação e entendimento dos produtores. Além disso, é fundamental que a indústria ofereça a seus produtores, assistência e acompanhamento técnico, garantindo a efetiva melhora na qualidade (Meneghetti *et al.*, 2020).

Tendo em vista que a agricultura familiar desempenha papel importante na economia do país, pois este grupo está diretamente relacionado com desenvolvimento social e econômico, movimentando bilhões de reais no Brasil, auxiliando também na geração de empregos, as ações devem começar pelo produtor rural por ser um dos elos mais importante da cadeia de lácteos. Assim, ele deve ser constantemente treinado com relação às BPA, adequação das etapas de armazenamento e transporte, no intuito de atender às necessidades dos clientes, do mercado e da legislação. A adequação dos procedimentos adotados para a produção de leite deve ser implementada em todos os elos da cadeia, de forma a garantir a produção de acordo com os padrões legais, tendo como objetivo a melhoria de renda do produtor, melhor desempenho das indústrias e segurança ao consumidor final (Strassburger *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021).

Entre os agricultores familiares, a produção de leite é uma das principais atividades desenvolvidas. Constata-se no estudo realizado por Peres *et al.* (2019), que das propriedades rurais analisadas em Bambuí/MG grande parte não possuía rebanho especializado na produção de leite e os profissionais envolvidos não recebiam assistência técnica, assim, trabalhar com métodos de manejo agrícola em linguagens simplificadas e impactantes podem afetar positivamente a gestão da produção em pequenas e médias propriedades.

#### 4. MICROBIOTA CONTAMINANTE DO LEITE CRU E PROBLEMAS TECNOLÓGICOS PARA A INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

Apesar do Brasil estar entre os maiores produtores de leite no mundo, os problemas relacionados à produtividade e à qualidade do leite cru ainda são frequentes e graves, sendo esta última associada, principalmente, à excessiva contaminação por microrganismos, levando à rápida deterioração do produto. A vida útil do leite beneficiado está diretamente relacionada à contagem microbiana inicial no leite cru e à composição desta microbiota constitui-se, principalmente, por deteriorantes produtores de enzimas extracelulares (Marioto *et al.*, 2020).

O aumento da CBT pode proporcionar alterações na composição química do leite, levando a prejuízos econômicos para os produtores. Elevadas contagens de CBT são indicativas de falha de manejo relacionadas aos cuidados de higiene na ordenha e dos demais aspectos da produção. O tempo que leva até o leite ser resfriado é outro ponto crítico para esse dado, já que a temperatura é um fator que influencia diretamente a multiplicação dos microrganismos no leite (Santos *et al.*, 2021).

Strassburger *et al.* (2019) objetivaram avaliar a qualidade do leite cru ao longo da sua cadeia de produção até a chegada à indústria processadora, em função do tipo de ordenha, armazenamento e condições de transporte. Os autores realizaram uma revisão sistemática da literatura de 19 artigos dos últimos 10 anos para avaliação nas áreas de produção primária, armazenamento e transporte da matéria prima. Foram constatados resultados insatisfatórios com relação ao limite definido pela legislação para a CBT em todos os trabalhos avaliados, evidenciando falhas nos procedimentos adotados para a produção da matéria prima, armazenamento e transporte.

Para obtenção de leite bovino, Pereira *et al.* (2022) observaram quanto à ordenha, pressões de vácuo elevadas, manejos incorretos nos procedimentos de extração de leite e no processo de limpeza. Quanto aos demais procedimentos como: tratamento de mastite, linha de ordenha e terapia de vaca seca, todos eram realizados de forma empírica pelas propriedades. Os autores concluíram que a falta de informação e treinamento quanto à qualidade no manejo e higiene de ordenha é uma realidade nas propriedades.

A fim de evitar perdas financeiras e tecnológicas, mesmo a temperatura de refrigeração, há que se estabelecer mecanismos de controle de microrganismos

mesófilos aeróbios e de psicotróficos produtores de enzimas extracelulares termorresistentes que multiplicam em temperatura abaixo de 7 °C e levam a hidrólise das caseínas e gorduras do leite (Barbosa *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012; Condé *et al.*, 2019; Condé *et al.*, 2020).

As bactérias psicotróficas destacam-se como as principais contaminantes responsáveis pela deterioração do leite (Araújo *et al.*, 2019). O termo psicotrófico refere-se aos microrganismos capazes de multiplicar em temperaturas de refrigeração (Maziero; Vianna; Bersot., 2010). Pinto *et al.* (2015) encontraram predominância de *Pseudomonas* dentre os gêneros isolados em leite cru refrigerado, situação confirmada por Araújo *et al.* (2019). A contaminação por bactérias psicotróficas é um grande problema no leite cru refrigerado, pois elas multiplicam em temperaturas baixas (< 7,0 °C), sendo essa microbiota constituída por espécies de bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Rahnella*, e Gram-positivas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* (Qüigley *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2015; Vithanage *et al.*, 2016; Condé *et al.*, 2022).

Essa microbiota possui alto potencial deteriorador sobre o leite quando armazenado por um longo período refrigerado pela ação das enzimas hidrolíticas (Condé *et al.*, 2022). Essas enzimas causam transtornos na indústria de laticínios pelo fato de muitas serem resistentes aos tratamentos térmicos amplamente usados como pasteurização e esterilização comercial.

Quando o leite é refrigerado, a maior parte dos microrganismos aeróbios mesófilos é inibida, contudo mesmo após a refrigeração, os psicotróficos ainda se multiplicam (Martins *et al.*, 2019b; Santos *et al.*, 2021). Segundo Condé *et al.* (2019), a refrigeração em tanques de graneralização pode ser uma selecionadora de bactérias psicotróficas deteriorantes em leite cru. Com isto, esse grupo de bactérias representa para a indústria de laticínios um desafio na preservação da matéria-prima devido aos problemas tecnológicos que ocasionam como: instabilidade do leite ao calor, geleificação do leite UHT (Ultra Alta Temperatura), sabor, odor e cor alterados no leite e derivados, perda de rendimento na produção de queijos, alteração na viscosidade em produtos lácteos fermentados, dentre outros (Sorhaug; Stepaniak, 1997; Barbosa *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2015; Condé *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2024).

Entretanto, para minimizar os problemas tecnológicos existentes, a indústria de laticínios pode adotar alternativas como termização, microfiltração, entre outros processos. Os tratamentos térmicos e a refrigeração do leite cru contribuem para o aumento da segurança e vida útil do leite e de seus derivados (Pinto *et al.*, 2019). A maioria dos microrganismos psicotróficos contaminantes do leite cru são inativados com a termização, tratamento térmico aplicado ao leite em temperaturas mais baixas que a pasteurização para inibir temporariamente o crescimento de microrganismos psicotróficos. Outras medidas importantes para o controle da deterioração do leite cru, por atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas termosensíveis de origem microbiana é a redução no tempo entre a produção e a pasteurização, além da manutenção do leite a temperaturas abaixo de 4 °C. Por outro lado, a demanda por produtos alimentícios sem conservantes e mais próximos ao natural possível é crescente e a biopreservação é uma alternativa potencial para substituir ou reduzir o uso de conservantes químicos em alimentos (Souza *et al.*, 2022).

## **5. CULTURAS BIOPROTETORAS E SUA APLICAÇÃO EM LEITE E DERIVADOS**

O conceito de Biopreservação passou a ser definido a partir de 2015 como o uso de microrganismos antagônicos e/ou seus metabólitos para inibir microrganismos indesejáveis e aumentar a vida útil dos alimentos com o mínimo de modificação de suas características sensoriais (Vignolo; Fadda, 2015).

A utilização de culturas bioprotetoras em alimentos têm respondido a uma tendência de mercado, denominada “*Clean Label*” visando a comercialização de alimentos com o mínimo de conservantes, com vida de prateleira prolongada e, principalmente, para melhorar a segurança dos alimentos. Bactérias do ácido láctico (BAL) selecionadas têm ganhado atenção como culturas bioprotetoras por serem tradicionalmente usadas na produção de alimentos e por apresentarem atividade antimicrobiana contra deteriorantes e patógenos (Souza *et al.*, 2022).

As BAL desempenham papel importante na indústria de alimentos funcionais pois produzem antimicrobianos naturais, além de algumas apresentarem propriedades probióticas. Elas sintetizam vários metabólitos biologicamente ativos e antimicrobianos como ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas, que podem

inibir o desenvolvimento da microbiota patogênica e deterioradora, atuando como biocontrole (Meruvu; Harsa, 2022; Abedin *et al.*, 2023).

Um estudo avaliou a atividade antifúngica de BAL e a eficácia e aplicabilidade das culturas bioprotetoras contra esporos fúngicos em produtos lácteos. *Lactiplantibacillus plantarum* N7 foi o escolhido e estudado uma vez que afetou a atividade antifúngica constatada por meio da análise de superfície de resposta. Os índices físico-químicos e microbianos de bebidas de soro de leite durante o armazenamento indicaram que *L. plantarum* N7 retardou o crescimento de leveduras e foi de interesse para aplicações industriais (XU *et al.*, 2021).

A incorporação de BAL e dos metabólitos produzidos por esses microrganismos tais como peptídeos antimicrobianos e antifúngicos, diacetil e ácidos orgânicos têm sido elencados como estratégias promissoras na biopreservação de alimentos (Kaveh *et al.*, 2023).

Aljasir *et al.* (2020) demonstram a eficácia de Culturas Bacterianas Protetoras (CBP) produzidas comercialmente e identificaram tratamentos individuais e combinados que poderiam ser usados como estratégias naturais para controlar patógenos. Os autores relataram que o sobrenadante livre de células e sua combinação sinérgica com as CBP têm potencial para uso em uma variedade de aplicações alimentícias. Os resultados da cocultura identificaram aplicações únicas e combinadas de CBP para uso no controle de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos em produtos lácteos crus. Os autores defenderam a necessidade de estudos futuros para investigar a eficácia de CBP em queijos de leite cru e entender os mecanismos das combinações sinérgicas.

Independente dos estudos e caracterização completa dos perfis dos compostos, o efeito protetor das culturas biopreservadoras pode sofrer variações em diferentes e complexas matrizes alimentares e com diferentes espécies e suas combinações. O desafio atual no desenvolvimento de culturas protetoras eficazes reside na identificação dos compostos produzidos nas diferentes matrizes alimentares e sua ação/eficácia sobre os diferentes tipos de microrganismos alvo. Muitos dos compostos não foram detectados pelas técnicas empregadas; no entanto, o avanço na sensibilidade e precisão das ferramentas analíticas pode ser o fator chave no isolamento e identificação de compostos potenciais com atividade antimicrobiana. Assim, ainda é um desafio desenvolver culturas bioprotetoras com efeitos significativos devido à complexidade das interações e matrizes alimentares.

Além disso, as culturas podem ser combinadas com outros métodos de preservação, sendo a sinergia a forma de garantir a eficácia (Souza *et al.*, 2022).

Os fagos são alternativas importantes para combater bactérias deteriorantes na indústria alimentícia e usados com sucesso em muitas aplicações (Tayyarcan; Boyaci, 2023). Nascimento *et al.* (2022) observaram que os fagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6 foram eficazes contra *P. fluorescens*, reduzindo a contagem bacteriana durante toda a fase de crescimento exponencial em caldo formulado com leite a 4 °C e 10 °C, sendo culturas promissoras a fim de retardar a deterioração proteolítica do leite cru durante o armazenamento refrigerado. Os fagos UFJF\_PfDIW6 e UFJF\_PfSW6 apresentaram títulos de 9,7 e 7,6 log UFP/mL e período latente de 115 e 25 minutos. Apresentaram especificidade alta para a bactéria hospedeira, foram morfolologicamente classificados como da família *Podoviridae*, estáveis em pH 5 a 11, não inativados a 63 °C ou 72 °C por 30 min. e muito eficazes contra *P. fluorescens*, reduzindo a contagem dessa bactéria durante toda a fase de crescimento exponencial a 4 °C e 10 °C em caldo formulado com leite, inibindo por pelo menos 2 dias a produção de proteases, retardando, assim, a clivagem das proteínas do leite.

Devido ao aumento de patógenos resistentes a antibióticos veiculados por alimentos, a aplicação de bacteriófagos como novos agentes antibacterianos em matrizes alimentares tornou-se uma estratégia emergente. Um fago denominado *Salmonella* PS3-1 com alta atividade lítica contra *Salmonella* Typhimurium foi estudado por Zhao *et al.* (2023). Já Abdelaziz *et al.* (2024) tiveram como foco o isolamento e a caracterização de bacteriófagos com atividade contra cepas produtoras de toxinas de *Bacillus cereus sensu stricto* e observaram no referido estudo que a combinação do fago vB\_BceS-M2 e nisina mostrou-se promissora para neutralizar *B. cereus* toxigênico e resistente a antibióticos em alimentos. Biocontrole contra *B. cereus* em produtos lácteos foi estudado por Li *et al.* (2022), que observaram a ação do fago DLn1 com redução eficiente na contagem dessa bactéria no leite em seis horas. Húngaro *et al.* (2022) realizaram a caracterização genômica do fago UFJF\_PfDIW6 que apresenta ciclo lítico em *P. fluorescens* e, que, portanto, possui potencial para biocontrole na indústria de laticínios. Assim, muitos estudos têm sido realizados para testar a ação bioprotetora de diferentes culturas microbianas em leite e derivados lácteos (QUADRO 1).

**Quadro 1.** Estudos relacionados à inclusão de culturas bioprotetoras em leite e derivados

Leite ou derivado lácteo	Cultura utilizada	Resultados	Referência
Coalhada obtida do leite cru de búfala	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 10.4 e <i>Lactococcus lactis</i> L4A8f	Os isolados em associação inibiram <i>L. monocytogenes</i> , com redução na contagem de $2,67 \times 10^7$ UFC/g para $1,35 \times 10^4$ UFC/g após 24 horas	Motta <i>et al.</i> (2023)
Queijo Minas Frescal	1% de leite fermentado de kefir e 1% de cultura láctica mesofílica (5% de <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> e 95% de <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> )	O kefir reduziu a contagem de <i>Escherichia coli</i> , evidenciando seu possível uso como biocontrole. Como cultura bioprotetora o kefir apresentou potencial de inibição frente a patógenos alimentares	Martins (2023)
Leite cru a 4 °C	Bacteriófagos infectantes de <i>P. fluorescens</i>	Inibição em pelo menos dois dias na produção de proteases, retardando a clivagem das proteínas do leite. Redução da contagem de bactérias totais, psicrotróficas e <i>Pseudomonas</i> em 3,0 log UFC/mL	Nascimento <i>et al.</i> (2022)
Leite Integral	<i>Lactobacillus sakei</i> ou <i>L. plantarum</i>	Potencial bioconservante para controlar <i>L. monocytogenes</i>	Hossain <i>et al.</i> (2021)
Queijos frescos e curados de pasta mole e semimole	Bacteriocinas produzidas por BAL, bacteriófagos e culturas produtoras de bacteriocinas	O uso de biocontrole foi uma opção para inibir <i>L. monocytogenes</i> . Bacteriocinas e culturas produtoras das mesmas parecem ser eficazes na redução da contagem inicial de patógenos. A adição de uma barreira bacteriostática é sugerida para evitar a multiplicação subsequente de <i>L. monocytogenes</i>	Falardeau <i>et al.</i> (2021)
Leite e derivados lácteos	Fagos	Os constituintes da matriz láctica interferem na difusão dos fagos e podem se ligar aos mesmos, levando a uma diminuição na sua eficácia como biocontrole	Anaya <i>et al.</i> (2020)

Fonte: autoria própria.

Lačanin *et al.* (2017) estudaram a atividade antifúngica potencial de 112 isolados de LAB por meio de triagem após a aplicação em ágar leite. Duas estirpes

testadas, *Lactocaseibacillus paracasei* SYR90 e *Lactocaseibacillus rhamnosus* BIOIII28, mostraram propriedades antifúngicas para biopreservação de iogurte ou outros produtos lácteos. Os autores sugeriram a condução de estudos em escala piloto para esclarecer o mecanismo de ação.

Tendo em vista a impossibilidade do leite cru conter conservantes, os agentes de biocontrole seriam opção para uso nessa matriz alimentar. Desse modo, a avaliação da bioproteção no leite cru refrigerado granelizado exercido por BAL é relevante a fim de controlar a deterioração desse alimento por enzimas extracelulares termorresistentes produzidas por bactérias psicrófilas, bem como pela inibição de microrganismos patogênicos veiculados por mastite bovina a exemplo de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

A redução do uso de conservantes químicos sintéticos é foco de consumidores exigentes que buscam aliar qualidade e promoção de saúde. Essa demanda leva os pesquisadores a realizarem estudos com bioprotetores que possuam potencial antimicrobiano contra deterioradores e patógenos, e que não afetem o microbioma intestinal, sendo os mesmos alternativos aos componentes sintéticos (Kaveh *et al*, 2023). Nesse contexto, destacam-se os estudos com BAL e fagos.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O treinamento constante em BPA, de ordenha e de fabricação dos envolvidos na produção de leite é essencial para garantir a qualidade e segurança deste alimento de grande importância na geração de renda e manutenção do homem no campo. Os treinamentos devem envolver uma abordagem global, transdisciplinar, transcultural, integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde de pessoas, animais e ecossistemas, sendo essencial para alcançar o conceito da Saúde Única e, conseqüentemente, melhorar a qualidade do leite cru produzido no Brasil.

A bioconservação é desejável na área da ciência e tecnologia de alimentos, uma vez que substitui a adição de substâncias conservadoras e vai ao encontro da demanda do mercado consumidor por alimentos com alegações funcionais, mais naturais e com adição de uma quantidade menor de ingredientes. Além disso, os agentes de biocontrole podem ser coadjuvantes na qualidade do leite cru refrigerado

granelizado, pois eles podem contribuir com a manutenção da qualidade do leite se inibirem a microbiota psicotrófica deterioradora, além de patógenos.

Portanto, como o leite cru não pode ser adicionado de conservantes, as culturas bioprotetoras representam uma barreira a mais, podendo controlar desvios na aplicação das boas práticas, devendo a cultura bioprotetora apresentar contagem maior do que os microrganismos indesejáveis contaminantes do leite.

## REFERÊNCIAS

- ABEDIN, M.M.; CHOURASIA, R.; PHUKON, L.; PUJA, S.; RAMESH. C. R.; SUDHJIR, P. S.; AMIT, K. R. Lactic acid bacteria in the functional food industry: biotechnological properties and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p.1-15, 2023.
- ALJASIR, S. F.; GENSLER, C.; SUN, L.; D'AMICO, D. J. The efficacy of individual and combined commercial protective cultures against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, O157 and non-O157 shiga toxinproducing *Escherichia coli* in growth medium and raw milk. **Food Control**, Connecticut, v.109, p. 1-12, 2020.
- ALVARENGA, T. H. P.; GAJO, A. A.; AQUINO, A. C. M. S. Cadeia produtiva agroindustrial do leite: uma revisão no escopo do agronegócio. **Revista Agropampa**, v. 1, n. 1, p. 50-62, 2020.
- ANAYA, M. C. G.; SEPULVEDA, D. R.; MENDOZA, A. I. S.; VELASCO, C. R.; FLORES, P. B. Z.; MUÑIZ, C. H. A. Phages as biocontrol agents in dairy products. **Trends in Food Science & Technology**, v.95, p. 10–20, 2020.
- ARAÚJO, L. G.; JUNIOR J. C. R.; ALVES, B.K.; CESAR, K. K. F. A.; LOPES, J. B. A. Identification of deteriorating activity and the *apr* gene in the microbiota isolated from raw milk in Caxias, MA. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 74, n. 4, p. 219-230, 2019.
- BAPTISTA, D. P.; GIGANTE, M. L. Prato cheese with addition of *Lactobacillus helveticus*: Effect of culture preparation on peptide profile. **Applied Food Research**, v. 2, n.1, p. 1-6, 2022.
- BARBOSA, J. B.; TALMA, S.V.; BATISTA, C. S.; MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. de O. Avaliação de rendimento da produção dos queijos minas frescal, minas padrão em mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.64, n.371, p.27-34, 2009.
- BARROS, M. V.; SALVADOR, R.; MACIEL, A. L.; FERREIRA, M. A. B.; PAULA, V. R. de.; FRANCISCO, A. C. de.; ROCHA, C. H. B.; PIEKARSKY, C.M. An analysis of Brazilian raw cow milk production systems and environmental product declarations of whole Milk. **Journal of Cleaner Production**, v.367, p.1- 12, 2022.
- BELOTI, V.; JUNIOR, J. C. R.; GUIMARÃES, J. de T.; LEVORATO, J.; CRUZ, A. G da.; OLIVEIRA, C. A. F de.; CORASSIM, C. H. Sistema de qualidade no processamento de leite e derivados. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. A. F.; CORASSIM, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 12, p.229- 259, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 77, de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 10.468, de 18 de agosto de 2020. Altera o decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de agosto de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do Leite: Políticas Públicas e Privadas para o leite**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>. Acesso em 28 jun 2023.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R. Leite inspecionado: Minas Gerais mantém liderança. **Anuário do Leite 2021: Saúde única e total**, p. 14-24, 2021.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L, de O.; GANDRA, S. O.; CAMPOS, R. C. A. B.; SILVA, R. R. da.; COSTA, J. F. da.; MARTINS, M. L. Storage temperature and microbiological quality of bulk Ray Milk in Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 3, p.149-161, 2019.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L, de O.; GANDRA, S. O.; TREVIZANO, L. M.; CAMPOS, A. N. da R.; SILVA, R. R. da.; MARTINS, M. L. Proteolytic Action of Psychrotrophic Bacteria in Bovine Milk Caseins. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 6, p. 40220-40236, 2020.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L, de O.; GANDRA, S. O.; CAMPOS, R. C. A. B.; SILVA, R. R. da.; COSTA, J. F. da.; MARTINS, M. L. Identification of the contaminating psychrotrophic bacteria in refrigerated bulked raw milk and the assessment of their deteriorating potential. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 43, n. 2, p. 739-750, 2022.

DIAS, Y. H. F.; GOUVÊA, C. M. M. Y.; MUFFATO, B. G.; MOREIRA, M. V.; SANTOS, A. B. B. dos; FRADE, V. L.; DUTRA, L. M. Leite de vaca na alimentação humana: uma revisão atualizada com base em evidências. **Journal of Social Issues and Health Sciences**, v. 1, n. 5, p. 1-9, 2024.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Embrapa. **Agronegócio de leite: composição**. Disponível em: [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/composicao). Acesso em: 01 mai. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Embrapa. **O leite bovino que produzimos e consumimos**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1145076/o-leite-bovino-que-produzimos-e-consumimos>. Acesso em: 13 nov. 2022.

FALARDEAU, J.; TRMČIĆ, A.; WANG, S. A ocorrência, crescimento e biocontrole de *Listeria monocytogenes* em queijos frescos e curados de pasta mole e semimole. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p.1-30, 2021.

FERREIRA, A. A.; MARQUES, K. de A.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, E. M. F.; PINTO, C. L. de O.; MARTINS, M. L. Influence of enzymatic activity of *Pseudomonas Fluorescens* 041 in Labneh. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 17-24, 2012.

FRIGERI, K. D. M.; SANTIN, T. P.; AGOSTINI, A.; NOGARA, K. F.; FRIGERI, K. D. M.; KALLES, N. Z.; TONELLO, G.; SCHORR, L. P. B.; COELHO, E. M. Longitudinal study on the effect of seasons of the year on production, centesimal composition, microbiological quality and price of milk liter on a dairy farm in Rio Grande Do Sul-Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. 1-28, 2020

HOSSAIN, I.; KIM, K.; MIZAN, F. R.; TOUSHIK, S. H.; ASHRAFUDOULLA; ROY, P. K.; NAHAR, S.; JAHID, I. K.; CHOI, C.; PARK, S. H.; HA, S. Comprehensive molecular, probiotic, and quorum-sensing characterization of anti-listerial lactic acid bacteria, and application as bioprotective in a food (milk) model. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.6, p. 6516-6534, 2021.

HUNGARO, H. M.; VIDIGAL, P. M. P.; NASCIMENTO, E. C.; OLIVEIRA, G. C. F.; GONTIJO, M. T. P.; LOPEZ, M. E. S. Genomic Characterisation of UFJF\_PfDIW6: A Novel Lytic *Pseudomonas fluorescens*-Phage with Potential for Biocontrol in the Dairy Industry. **Viruses**. v. 14, n. 3, p. 1-15, 2022.

HWANG, J. H., JUNG, A. H., J. YU, S. S., PARK, S. H. Rapid freshness evaluation of cow milk at different storage temperatures using in situ electrical conductivity measurement. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v.81, 2022. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856422001989>. Acesso em: 17 ago.2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Censo Demográfico, 2022**. Brasil, 2022. Disponível em: <https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>. Acesso em 18 ago. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Produção de Leite, 2022**. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>. Acesso em 18 ago. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Estatísticas Agropecuárias. **Pesquisa Trimestral do Leite, 2023**. Brasil, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21121-primeiros-resultadios-2leite.html>. Acesso em: 18 ago. 2024

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Estatísticas Agropecuárias. **Pesquisa Trimestral do Leite, 2024**. Brasil, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21121-primeiros-resultadios-2leite.html>. Acesso em: 18 ago. 2024

KAVEH, S.; HASHEMI, S. M. B.; ABEDI, E.; AMIRI, M. J.; CONTE, F.L. Bio-Preservation of meat and fermented meta products by lactid acid bactéria strains and their antibacterial metabolites. **Sustainability**, v.15, n.10154, p. 1-17, 2023.

LAČANIN, I.; MOUNIER, J.; PAWTOWSKI, A.; DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.188, n.33, p. 1-8, 2017.

LI, N.; YUAN, X.; LI, C.; CHEN, N.; WANG, J.; CHEN, B.; YU, S.; YU, P.; ZHANG, J.; ZENG, H.; WU, S.; YANG, X.; YANG, M.; ZHANG, J.; WU, Q.; DING, Y. A novel *Bacillus cereus* bacteriophage DLn1 and its endolysin as biocontrol agents against *Bacillus cereus* in milk. **Int J Food Microbiol**, 2022.

LIMA, L. P.; BRAGA, G. B.; PEREZ, R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Evolution of the legal framework of refrigerated raw milk in Brazil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 75, n. 3, p. 190-203, 2020.

LINHARES, C. J.; LANDIN, A. P. M.; RIBEIRO, L. F. Avaliação das boas práticas agropecuárias (bpa's) na ordenha em relação à qualidade do leite. **Revista GeTeC, Gestão, Tecnologia e Ciências**, v. 10, n. 32, 2021. Disponível em: <https://www.revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/issue/view/157>. Acesso em 15 ago. 2024 .

MARIOTO, L. R. M.; DANIEL, G. C.; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v.21, p. 1-12, 2020.

MARTINS, A. D. de O. Queijo minas frescal elaborado com kefir e cultura lática: efeito antagônico frente a patógenos. **Interfaces Científicas - Saúde E Ambiente**, v.9, n.2, p. 575–588, 2023. Disponível: <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2023v9n2p575-588>. Acesso 19 ago. 2024.

MARTINS, L. M.; PINTO, C. L de O.; MARTINS, A. D. de O.; BENEVENUTO, W. C. A. do N.; MARTINS, E. M. F.; SILVA, H. L. A. de.; CRUZ, A. G. da. Microbiologia do processamento do Leite pasteurização. *In*: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. A. F.; CORASSIM, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de**

**qualidade no processamento de leites e derivados.** Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 3, p.43-70, 2019a.

MARTINS, L. M.; BATISTA, C. de S.; PINTO, C. L de O.; CAMPOS, N. L. F.; MARTINS, A. D. de O.; MARTINS, E. M. F.; BENEVENUTO, W. C. A. do N.; CRUZ, A. G. da. Microbiologia do processamento do Leite UHT. *In*: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. A. F.; CORASSIM, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados.** Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 4, p.71-96, 2019b.

MARTINS, N. J.; MATA, J. F. Gestão de qualidade do leite bovino em propriedades rurais. **Revista Liberato**, v.21, n.36, p.159–168, 2020.

MENEGHATTI, M. R.; GRIEBELER, A.; FARIÑA, L. O. de.; BERTOLINI, G. R. F. Impactos do sistema de pagamento por qualidade do leite em uma cooperativa da agricultura familiar. **DRd - Desenvolvimento Regional Em Debate**, v.10, p.1203–1234, 2020.

MERUVU, H.; HARSA, S. Lactic acid bacteria: isolation–characterization approaches and industrial applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.63, n. 26, p. 8337-8356, 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano mais pecuária, 2023.** Disponível em: [Http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/Publicacao\\_v2.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf). Acesso em: 04 de julho de 2023.

MOTTA, A.S.; QUADROS, D.S.; LERMEN, A. M. Cultivo associado de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8: propriedades antimicrobianas e potencial aplicação. **Veterinária e Zootecnia**, v.30, p.1-12, 2023.

NASCIMENTO, E. C. do.; SABINO, M. C.; CORGUINHA, L. da R.; TARGINO, B. N.; LANGE, C. C.; PINTO, C. L. de O.; PRISCILA, P.F.; VIDIGAL, P. M.P.; SANT'ANA, A.S.; HUNGARO, H.M. Lytic bacteriophages UFJF\_PfDIW6 and UFJF\_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. **Food Microbiology**, v.101, p.1-8, 2022.

OLIVEIRA, G. B.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R. H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313-321, 2015.

PEREIRA, M. de A.; MARTINS, L. T.; CARVALHO, B. H. de O.; FERREIRA, C. E.C. Avaliação da obtenção do leite bovino no município de Três Corações, Minas Gerais. **Pubvet**, Paraná, v.16, n.4, p.1-13, 2022.

PERES, F. D.; PARREIRA, D. P.; VALENTIM, J. K.; PAULA, K. L. C. de.; PACIULLI, S. de O. D.; SILVA, D. A. L. Milk quality evaluation of dairy farmers in the Alto São Francisco Region. **Realização**, v.6, n.12, p.108–120, 2019.

PINTO, C. L de O.; MACHADO, S. G.; MARTINS. L. M.; VANETTI, M. C. D. Identification of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk and characterization of its spoilage potential. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.70, n.2, p.105-116, 2015.

PINTO, C. L de O.; MARTINS. L. M.; CAMPOS, N. L. F.; MARTINS, A. D. de O.; BENEVENUTO, W. C. A. do N.; MARTINS, E. M. F.; SILVA, H. L. A. da.; CRUZ, A. G. da. Microbiologia do Leite Cru. *In*: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. A. F.; CORASSIM, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 2, p.32-42, 2019.

QÜIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. The complex microbiota of raw Milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 664-698, 2013.

REMPEL, C.; MULLER, T. Quality of bovine milk produced in Brazil – physical-chemical and microbiological parameters: an Integrative review. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.9, n.3, p.122-129, 2021.

RODRIGUES, R. da S.; MACHADO, S. G.; CARVALHO, A. F. de.; NERO, L. A. *Pseudomonas* sp. as the causative agent of anomalous blue discoloration in Brazilian fresh soft cheese (Minas Frescal). **International Dairy Journal**, v.117, 2021.

RODRIGUES, R. da S.; MACHADO, S. G.; CARVALHO, A. F. de.; NERO, L. A. Comparative genomic and functional annotation of *Pseudomonas* spp. genomes responsible for blue discoloration of Brazilian fresh soft cheese. **International Dairy Journal**, v.140, 2023.

SANTOS, N. S.; MEDEIROS, C. F. DE; SILVA, J. C. DE S.; ARAÚJO, C. de A.; SARMENTO, T. C. de F.; FONTES, C. N. Impacto do pré dipping, padrão racial e ordem dos jatos de leite sobre a atividade microbiológica e físico-química do leite cru bovino. **Diversitas Journal**, v.6, n.3, p.3694–3705, 2021.

SOUZA, L. V.; MARTINS, E.; MOREIRA, I. M. F. B.; CARVALHO, A. F. de. Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. **International Journal of Microbiology**, p. 1-16, 2022.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and Their Enzymes in Milk and Dairy Products: Quality Aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p. 35-41, 1997.

SILVA, A.F.; VALENTIM, J.K.; ZANELLA, J.; MENDES, A.; MENDES, J.P. The importance of incentives in dairy farming for small producers. **Realização**, v.8, n.15, p.115–123, 2021.

STRASSBURGER, A. H.; CAYE, V. A. H.; COSTELLA, M. F.; DALCANTO, F. Análise da variação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado: uma revisão

sistemática de literatura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 74, n. 1, p. 60-72, 2019.

**Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA)**. Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.2. São Paulo, 2023. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. Acesso em: 18 ago. 2023.

TAYYARCAN, E. K.; BOYACI, I. H. Isolation, characterization, and application of bacteriophage cocktails for the biocontrol of *Pseudomonas fluorescens* group strains in whole and skimmed milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2023, v. 54, n. 4, p. 3061-3071. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37914971/>. Acesso em: 03 set. 2024.

UBALDO, N. R. P.; CARRANZA, B. V., ORDOÑEZ, V. V, RUIZ, L. D., BASTIDA, A. Z. Mastite bovina, uma doença de impacto mundial: prevalência, resistência antimicrobiana e abordagens alternativas viáveis. **Veterinary and Animal Science**, v. 21, p. 1-14, 2023. Disponível em: Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches - PMC (nih.gov). Acesso em: 16 ago. 2024

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Serviço de Pesquisa Agrícola. **Food Data Central, 2019**. Estados Unidos, 2019. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173441/nutrients>. Acesso em: 18 ago. 2024

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Serviço Internacional de Agricultura. **Dairy and Products Annual, 2023**. Brasília, 2024. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/brazil-dairy-and-products-annual-10>. Acesso em: 18 ago. 2024

VIGNOLO, G.; FADDA, S. Starter cultures: bioprotective cultures. In: **Handbook of fermented meat and poultry**, Fidel Toldrá, p. 147–157, 2015.

VITHANAGE, N. R.; DISSANAYAKE, M.; BOLGE, G.; PALOMBO, E. A.; YEAGER, T. R.; DATTA, N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, p. 80-90, 2016.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTES, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2.ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 782p, 2006.

XU, R.; REN, S.; JUNWEI, J.; LANLAN, L.; XIAO, W.; GUORONG, L. "Screening of Antifungal Lactic Acid Bacteria as Bioprotective Cultures in Yogurt and a Whey Beverage. **Journal of Food Protection**, v. 84, n.6, p.953-961, 2021.

ZHAO, J.; LIN, Y.; WANG, C.; ZAYDA, M.; MAUNG, A.T.; MOHAMMADI, T. N.; DUC, H.M.; YU, P.; MA, M.; GONG, D.; SATO, J.; MASUDA, Y.; HONJOH, K. I.; MIYAMOTO, T.; ZENG, Z. Biocontrol of Salmonella Typhimurium in milk, lettuce, raw pork meat and ready-to-eat steamed-chicken breast by using a novel bacteriophage with broad host range. **International journal of food microbiology**, v. 402, 2023.

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES E DE AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MINAS GERAIS

#### RESUMO

O leite é um alimento importante para a nutrição humana e tem grande relevância econômica, contribuindo para a agropecuária brasileira. A refrigeração do leite e as boas práticas agropecuárias são necessárias a fim de garantir a segurança deste alimento ao consumo. Assim, objetivou-se caracterizar produtores e amostras de leite cru refrigerado granelizado do município de Ubá, MG. As categorias de um banco de dados municipal com 29 produtores de leite foram estudadas e amostras de leite cru granelizado refrigerado de oito tanques de expansão do município foram coletadas e caracterizadas. As amostras foram fracionadas e armazenadas a 4 °C por 0, 24, 48 e 72 h para determinação das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos, psicrotróficos produtores de lecitinase, estafilococos e de bactérias lácticas. Além disso, determinou-se a acidez titulável das amostras ao longo do armazenamento. Constatou-se que 72% dos produtores cadastrados detinham a certificação sanitária do seu empreendimento. Quanto ao grau de escolaridade dos ordenhadores e proprietários, 80% e 60%, respectivamente, portavam nível de instrução do ensino fundamental incompleto e ensino médio. A frequência de vacinação do rebanho foi de 100%, a de ordenha mecanizada 93%, sendo as teteiras higienizadas após a ordenha em 83% dos casos. Além disso, em 90% das propriedades realizava-se a eliminação dos três primeiros jatos na ordenha e em 85% havia mais de 30 dias sem uso de antibióticos no rebanho. Entretanto, 50% dos ordenhadores nunca foram treinados por especialistas e a padronização de higienização dos equipamentos e utensílios usados na ordenha não era bem descrita pelos respondentes. No entanto, era relatado frequência acima de 80% na realização dos procedimentos de higienização. Quanto a higienização de mãos de ordenhadores, 7% não adotam a prática. Além disso, somente 17% realizavam o pré *dipping* e 13% resfriavam o leite imediatamente após a ordenha. O compartilhamento de tanques de granelização acontecia em 24% das propriedades avaliadas. Na maioria das propriedades (86%), os animais produziam mais leite que a média nacional que é de 6 litros por dia por vaca. Entretanto, não se constatou ( $p>0,05$ ) interferência do nível de escolaridade dos proprietários e dos ordenhadores, bem como dos treinamentos realizados na eficiência do volume de leite produzido pelas vacas em lactação. A contagem média de microrganismos mesófilos aeróbios (5,12 log UFC/mL), psicrotróficos (4,69 log UFC/mL), psicrotróficos proteolíticos (4,69 log UFC/mL), psicrotróficos lipolíticos (3,43 log UFC/mL), psicrotróficos produtores de lecitinase (3,81 log UFC/mL) e de bactérias lácticas (4,66 log UFC/mL) aumentou ( $p<0,05$ ) ao longo do armazenamento a 4 °C e a contagem média de estafilococos (1,87 log UFC/mL) manteve-se constante ( $p>0,05$ ) ao longo do tempo. A acidez média das amostras aumentou ( $p<0,05$ ) de 0,15 g de ácido láctico/100 mL logo após a coleta para 0,18 g de ácido láctico/100 mL após 72 h a 4,0 °C. Portanto, o conhecimento das características locais dos produtores e da qualidade do leite cru são fundamentais para

institucionalização e implementação de políticas públicas municipais e de projetos de extensão a fim de promover o escoamento do leite de qualidade e em quantidade suficiente, sem, contudo, causar prejuízo ao ambiente e aos consumidores.

**Palavras-chave:** Leite bovino. Produtores. Caracterização. Qualidade.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos produtos que mais contribui para a economia brasileira e apresenta alto valor nutritivo, sendo constituído, em média, por 87% de água e 13% de sólidos como gordura, proteína, lactose, sais minerais e vitaminas (WALSTRA *et al.*, 2006). Por possuir elevado valor nutricional, o leite se torna um ótimo meio de cultura para microrganismos, o que pode acarretar em prejuízos tanto para a indústria como para o consumidor, sendo de suma importância garantir a sua qualidade (Gualberto *et al.*, 2022).

Entende-se por leite cru refrigerado, o leite produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial (Brasil, 2017). A cadeia produtiva do leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil, com forte efeito na geração de emprego e renda. Conforme o Ministério da Agricultura e Pecuária, em 2021, o país contava com mais de 1 milhão de propriedades produtoras de leite e as projeções do agronegócio da Secretaria de Política Agrícola, estimam que, para 2030, irão permanecer apenas os produtores mais eficientes, que se adaptarem à nova realidade de adoção de tecnologia, melhorias na gestão e com maior eficiência técnica e econômica (Brasil, 2024).

Por ser uma atividade que garante o recebimento mensal pelo produto, muitos produtores optam por produzir leite para ter uma renda mensal garantida, fato que mostra a necessidade de políticas públicas para os médios e pequenos produtores, principalmente aqueles da agricultura familiar (Silva, 2023).

Em estudo que acompanhou a evolução da qualidade do leite cru produzido por produtores da Zona da Mata, no estado de Minas Gerais, entre 2012 e 2018, concluiu-se que a qualidade do leite cru refrigerado piorou ao longo do período de análise, apesar das ações implementadas pelo Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite – PNMQL (Lima *et al.*, 2020).

Em Ubá, uma cidade da Zona da Mata mineira, a Seção de Segurança Alimentar e Nutricional (SSAN) está inserida no organograma da Secretaria Municipal de Desenvolvimento Social da Prefeitura Municipal e atua na gestão do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), recebendo alimentos adquiridos da agricultura familiar e os destinando a população em insegurança alimentar do município. A maior parte do leite produzido em Ubá, MG, é destinado a laticínios

pelos produtores. Entretanto, não há um cadastro robusto dos mesmos e as ações da SSAN da prefeitura está construindo um banco de dados para a melhoria da qualidade do leite e fortalecimento da cadeia leiteira do município.

O consumo de leite e produtos lácteos tem sido objeto de estudo em diversas áreas da saúde e nutrição, dada sua importância na dieta humana e os potenciais impactos na saúde (Dias *et al.*, 2024). No entanto, a garantia da qualidade do leite é de extrema importância para sua viabilidade comercial, enfatizando a necessidade de assegurar esses aspectos desde a etapa de produção até a chegada à indústria (Ströher *et al.*, 2023).

Assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar os dados referentes aos produtores de leite inscritos na SSAN da Prefeitura de Ubá, MG, bem como traçar o perfil dos mesmos e determinar a qualidade de amostras de leite cru refrigerado granelizado do município.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. COLETA E ANÁLISE DE DADOS DAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE DE UBÁ**

Características e condutas relacionadas ao manejo de vacas foram obtidos de um banco de dados da SSAN da Prefeitura Municipal de Ubá, MG. Os dados foram coletados pelo setor público por meio da aplicação no ano de 2023, de um questionário semiestruturado no formato online (Apêndice 1).

As informações acessadas sobre os dados de identificação; escolaridade; socioeconômico; manejo; vacinação, nutrição e quantidade do rebanho, e de adesão às Boas Práticas Agropecuárias (BPA) foram analisadas, reservando o direito conforme a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD) (BRASIL, 2018b).

A amostra de dados contou com n amostral de 29 questionários disponibilizados pela SSAN. Todos os dados foram analisados e compilados com auxílio de planilhas de Excel.

Para fins de entendimento dos dados, denomina-se *pre dipping*, a desinfecção dos tetos por imersão por 20 a 30 segundos em solução apropriada antes da ordenha e secagem dos mesmos com papel toalha descartável (Mendonça *et al.*, 2020).

Como estratégia de avaliação dos dados quantitativos de produção de leite foi criado um índice fazendo a relação do volume de leite produzido por dia na propriedade e o número de vacas em lactação como preditor de eficiência quantitativa de cada propriedade.

Em seguida comparou-se com a média de leite produzido por vaca no Brasil segundo os dados do último censo agropecuário obtida por meio da memória de cálculo disposta na equação 1 (IBGE, 2022).

$$\text{Volume de leite (L) produzido por vaca/dia} = \frac{\text{Volume de leite de vaca (IBGE 2022)}}{\text{Vacas ordenhadas (IBGE 2022) x n}} \quad \text{Eq.1}$$

n: dias em um ano (365 dias)

## 2.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU E AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DO PRODUTO NO TANQUE DE GRANELIZAÇÃO

Entre outubro de 2023 e maio de 2024, foram coletadas, assepticamente, amostras de 1000 mL de leite cru refrigerado armazenado por no máximo 24 horas, em 8 tanques de granelização do município de Ubá, MG. A temperatura do leite foi determinada no momento de cada coleta com utilização de termômetro de mercúrio. As amostras foram transferidas, assepticamente, dos tanques de expansão para frascos de vidro esterilizados e, durante o transporte foram acondicionadas em caixas térmicas, em banho de gelo reciclável, com temperatura inferior a 4,0 °C e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, para realização dos experimentos.

As amostras de 1000 mL de leite cru de cada um dos 8 tanques de expansão foram fracionadas assepticamente para 4 frascos de vidro esterilizados, devidamente identificados com etiquetas contendo o número do tanque e o tempo da análise (0, 24, 48 e 72 h) para determinação da qualidade ao longo do tempo de armazenado do produto a 4,0 °C.

## 2.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG

A análise microbiológica de Contagem Padrão em Placas (CPP) foi utilizada como indicador de qualidade do leite. Diluições decimais sucessivas das amostras de leite cru refrigerado foram realizadas. Para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, transferiu-se 1 mL das respectivas diluições para placas Petrifilm™ AC (3M do Brasil), incubando-se a  $32 \pm 1$  °C por 48 horas, seguido de enumeração das colônias que se tornaram vermelhas devido à redução do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

As diluições das amostras de leite cru também foram plaqueadas em Ágar Caseinato para Métodos Padronizados (SMCA - Himedia, Mimbai, Índia), para contagem de bactérias psicotróficas (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001) e psicotróficas proteolíticas viáveis (MARCY; PAYTON PRUETT, 2001), em PCA adicionado de 1,0% de tributirina para contagem de bactérias psicotróficas lipolíticas e em Ágar Trypticaseína de Soja (TSA - Kasvi, Pinhais, Paraná, Brasil), adicionado de 5,0% de emulsão gema de ovo para contagem de bactérias psicotróficas produtoras da enzima lecitinase, com incubação, a  $6,5 \pm 0,5$  °C, por 10 dias (HAAS, 2001).

A enumeração de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada de acordo com o protocolo ISO (2019). Alíquotas de 0,1 mL das amostras de leite cru foram transferidas diretamente para placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) enriquecido com emulsão de gema de ovo em solução salina 0,85% (1:1) e solução de telurito de potássio 1%. Após espalhamento da alíquota, com auxílio de alça de Drigalsky, as placas foram incubadas invertidas em estufa a  $37 \pm 2$  °C por 48h, sendo contadas as colônias típicas e atípicas. Foram consideradas colônias típicas de *Staphylococcus aureus* as que se apresentavam negras, brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio e, como colônias atípicas as acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos.

A viabilidade das bactérias lácticas nas amostras foi determinada pela contagem padrão em placas de acordo com Hall; Ledenbach; Flowers (2001). O plaqueamento das diluições foi realizado em Ágar de Man Rogosa Sharpe (MRS - Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando a técnica de profundidade. Após a completa solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 32 °C, durante 72 horas em atmosfera microaerófila, utilizando-se jarra de anaerobiose para tal finalidade.

As contagens ocorreram no tempo 0 (logo após o fracionamento das 8 amostras de leite cru) e com 24, 48 e 72 h de armazenamento das amostras a 4,0 °C.

#### 2.4. AVALIAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram avaliadas quanto a acidez titulável nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de incubação a 4,0 °C (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2022a).

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As possíveis associações entre as categorias analisadas foram obtidas por meio de análise estatística usando o software STATA (College station, TX, EUA), versão 14.

Neste estudo, denominou-se indicador de eficiência do rebanho em lactação, a relação entre o volume médio de leite produzido por vaca.

Por meio do teste ANOVA *oneway* com posterior correção de Bonferroni, avaliou-se a relação entre o volume de leite produzido por animal e a frequência de treinamento dos ordenhadores, e escolaridade de ordenhadores e de proprietários.

Além disso, os dados referentes às contagens microbianas das amostras foram analisados utilizando-se Delineamento em Blocos Casualizados comparando-se as médias por meio da análise de variância ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE LEITE DE UBÁ

Os dados de identificação de 29 produtores de leite de Ubá, MG, cadastrados na SSAN foram expostos na Tabela 1, que quantifica o perfil dos produtores por meio da categorização dos dados cadastrais.

**Tabela 1** - Identificação de uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Inscrição no cadÚnico</b>	Sim	7	24,14
	Não	22	75,86
<b>Posse de DAP/CAF</b>	Sim	24	82,76
	Não	5	17,24
<b>Posse de certificado sanitário</b>	Sim	21	72,41
	Não	8	27,59
<b>Grau de escolaridade dos ordenhadores</b>	Ensino fundamental incompleto	9	31,03
	Ensino fundamental completo	12	41,38
	Ensino médio completo	2	6,90
	Curso técnico completo	2	6,90
	Ensino superior completo	4	13,79
<b>Grau de escolaridade dos proprietários</b>	Ensino fundamental incompleto	6	20,69
	Ensino fundamental completo	7	24,14
	Ensino médio completo	4	13,79
	Curso técnico completo	2	6,90
	Ensino superior completo	10	34,48
<b>Total</b>		29	100,00

Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo o Ministério de Desenvolvimento Social e Assistência Social, Família e Combate à Fome (MDS), o Cadastro Único (CadÚnico) é um registro criado pelo governo federal, operacionalizado e atualizado pelos municípios a fim de identificar quem são e como vivem as famílias de baixa renda no Brasil (Brasil, 2023b). Aproximadamente, 24% dos produtores de leite cadastrados na SSAN são inscritos no cadÚnico (Tabela 1), público que prioritariamente pode ser contemplado em projetos e políticas públicas de fomento da cadeia produtiva de leite no município estudado.

O Cadastro Nacional da Agricultura Familiar (CAF) é o instrumento instituído pelo Ministério da Agricultura e Pecuária para identificar e qualificar o público beneficiário da Política Nacional da Agricultura Familiar, sendo a maioria dos produtores avaliados cadastrados (Tabela 1). A inscrição no CAF vem substituindo a Declaração de Aptidão ao Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (DAP) para fins de acesso às diversas políticas públicas direcionadas ao desenvolvimento e fortalecimento da agricultura familiar (Brasil, 2023b).

O conceito institucionalizado pelo governo federal enquadra como agricultor familiar aquele que pratica atividades no meio rural, atendendo, simultaneamente, aos requisitos de não deter área produtiva superior a quatro módulos fiscais. Em Minas Gerais, essa área equivale a 80 hectares, aproximadamente. Dentro do enquadramento da lei, as atividades econômicas do empreendimento devem utilizar mão-de-obra da própria família, predominantemente, e a renda do mesmo deve ter percentual mínimo definido por legislação pertinente (Brasil, 2006; Brasil, 2011; Brasil, 2022b).

A certificação sanitária é essencial para garantir que produtos de origem animal sejam seguros para o consumo humano, pois passam por rigorosos processos de segurança e controle de qualidade (Graça *et al.*, 2023). O Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), atendendo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), estabelece que a inspeção de leite e derivados abrange desde a sanidade do rebanho, obtenção da matéria-prima, sua análise e seleção até a expedição do produto final (Brasil, 2017). Assim, 72% dos produtores detêm a certificação sanitária do seu empreendimento (Tabela 1), necessitando ações articuladas de extensão rural para promover adequação sanitária desses pequenos empreendimentos envolvidos na pecuária leiteira.

Ao realizar o levantamento do grau de escolaridade dos ordenhadores e proprietários, 79% e 59%, respectivamente, portam nível de instrução do ensino fundamental incompleto até o ensino médio (Tabela 1).

A minoria dos respondentes possui curso técnico ou superior (Tabela 1), fato que configura uma demanda importante de qualificação desse público a fim de promover as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de gestão da propriedade a fim de melhorar a qualidade do leite produzido e de tecnificação da produção para melhorar a produtividade e manutenção dos mesmos na atividade.

### 3.2. ADEQUAÇÃO ÀS BPA E AO MANEJO EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DE UBÁ, MG

Ao estudar adesão às BPA e ao manejo, constatou-se pontos positivos, uma vez que a frequência de vacinação do rebanho bovino foi de 100%, de ordenha mecanizada 93% (Tabela 2), sendo as teteiras higienizadas após a ordenha em 83%

dos casos. Além disso, em 90% das propriedades realizava-se a eliminação dos três primeiros jatos na ordenha e em 85% havia mais de 30 dias sem uso de antibióticos no rebanho (Tabela 2).

**Tabela 2** – Manejo e BPA em uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG “(continua)”

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Vacinação</b>	Sim	29	100,00
	Não	0	0,00
<b>Tipo de ordenha</b>	Manual	2	6,90
	Mecânica	27	93,10
<b>Realização de pré-dipping</b>	Sim	5	17,24
	Não	24	82,76
<b>Refrigeração do leite pós ordenha</b>	Sim	29	100,00
<b>Compartilhamento de tanque</b>	Sim	7	24,14
	Não	22	75,86
<b>Tempo de transporte do leite até o tanque de expansão após a ordenha</b>	Imediatamente após a ordenha	4	13,79
	Demora de 1 a 2 horas	25	86,21
<b>Refrigeração do leite a temperatura <math>\leq</math> a 4°C</b>	Sim	26	89,66
	Não	3	10,34
<b>Tempo para o leite atingir 4°C após a transferência para o tanque</b>	Menos de 1 hora	2	6,90
	De 1 a 2 horas	22	75,86
	Mais de 2 horas	2	6,90
	Não sabe	3	10,34
<b>Higienização do tanque</b>	Sim	26	89,66
	Não sabe	3	10,34
<b>Soluções utilizadas para higienizar o tanque</b>	Alcool e detergente em pó concentrado de média alcalinidade	1	3,45
	Cloro	2	6,90
	Detergente alcalino	1	3,45
	Detergente em pó concentrado de média alcalinidade	1	3,45
	Detergente neutro	7	24,14
	Detergente clorado e ácido peracético	1	3,45
	Detergente clorado e desengordurante	1	3,45
	Detergente e Cloro	12	41,38
Não se aplica	3	10,34	

**Tabela 2** - Manejo e BPA em uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG “(continua)”

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Higienização do latão</b>	Sempre higieniza após a coleta do leite cru	24	82,76
	Não costuma higienizar	2	6,90
	Não se aplica (ordenha canalizada)	3	10,34
<b>Soluções utilizadas para higienizar o latão</b>	Cloro	2	6,90
	Detergente neutro	12	41,38
	Detergente ácido e alcalino	1	3,45
	Detergente e ácido peracético	1	3,45
	Detergente e cloro	8	27,59
	Detergente em pó concentrado de média alcalinidade	1	3,45
	Não se aplica	3	10,34
	Sabão	1	3,45
<b>Frequência de higienização das teteiras</b>	Sempre higieniza após a ordenha	24	82,76
	Higieniza 3 a 5 vezes por semana	1	3,45
	Higieniza 1 a 2 vezes por semana	1	3,45
	Higieniza 1 vez/mês	1	3,45
	Não se aplica	2	6,90
<b>Higienização das mãos dos ordenhadores</b>	Higieniza antes e depois da ordenha	6	20,69
	Não costuma higienizar	2	6,90
	Sempre higieniza ao mudar de função	21	72,41
<b>Frequência de treinamento dos ordenhadores/ano</b>	Nunca	15	51,72
	1 vez por ano	3	10,34
	2 vezes por ano	3	10,34
	4 vezes por ano	4	13,79
	12 vezes por ano (mensalmente)	4	13,79
<b>Eliminação dos três primeiros jatos na ordenha</b>	Sim	26	89,66
	Não	3	10,34
<b>Destino do leite cru das vacas com mastite</b>	Descarte	19	65,52
	Bezerro	10	34,48

**Tabela 2** - Manejo e BPA em uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG “(continua)”

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Alimentação/nutrição dos animais</b>	Pastagem e ração	8	27,59
	Ração	1	3,45
	Pastagem	2	6,90
	Pastagem, ração, cana de açúcar e capim	1	3,45
	Pastagem, ração, cana de açúcar, capim e silagem	1	3,45
	Pastagem, ração e silagem	7	24,14
	Pastagem, ração, silagem, capim	1	3,45
	Pastagem, silagem	2	6,90
	Ração, silagem	4	13,79
	Ração, silagem, cana de açúcar, capim	1	3,45
	Ração, silagem e capim	1	3,45
<b>Disponibilidade de água em livre demanda para os animais</b>	Sim	29	100,00
	Não	0	0,00
<b>Frequência de higienização da caixa de desedentação (vezes/mês)</b>	1	5	17,24
	2	5	17,24
	8	11	37,93
	20	4	13,79
	30	3	10,34
	Não se aplica (água de poço)	1	3,45
<b>Tratamento dos resíduos (dejetos como esterco e urina)</b>	Sim	4	13,79
	Não	25	86,21
<b>Destino do esterco</b>	Armazenamento "a céu aberto" para "curar" e coloco, posteriormente, em áreas de cultivo.	7	24,14
	Armazenamento em local coberto e que possibilita o escoamento	1	3,45
	Aplicação direta em áreas de cultivo	17	58,62
	Destinação para esterqueira ou composteira	4	13,79
<b>Recolhimento do chorume</b>	Sim	7	24,14
	Não	22	75,86

**Tabela 2** - Manejo e BPA em uma amostra (n=29) de produtores de leite cadastrados na SSAN de Ubá, MG “(conclusão)”

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Tempo em dias de uso de antibiótico pela última vez</b>	1 dia	2	6,90
	5 dias	1	3,45
	15	1	3,45
	30	5	17,24
	45	1	3,45
	60	2	6,90
	90	2	6,90
	120	1	3,45
	Raramente (acima de 120 dias)	11	37,93
	Não lembrava	3	10,34
<b>Total</b>		29	100,00

Fonte: elaborado pelo autor.

Ströher *et al.* (2023) reforçaram a importância de identificar pontos críticos de contaminação durante a produção, coleta e armazenamento do leite cru refrigerado, a fim de implementar medidas preventivas e corretivas para garantir a qualidade dos produtos lácteos. Portanto, o levantamento de inadequações de manejo e que contrariam as BPA precisa ser foco de atenção a fim de proposição de melhorias na cadeia leiteira no município estudado. No banco de dados da SSAN consta que apenas 17% dos cadastrados realizam pré *dipping* (Tabela 2) e que apenas 13% resfriam o leite imediatamente após a ordenha, sendo que o restante dos produtores demora de uma a duas horas para resfria-lo.

O leite deverá ser armazenado sob refrigeração à temperatura máxima de 4,0°C (Brasil 2018c). Segundo os dados obtidos, todos os produtores avaliados refrigeraram o leite cru pós ordenha. Destes, 90% relataram temperatura de refrigeração menor ou igual a 4,0 °C (Tabela 2). Na avaliação *in locu*, o leite dos oito tanques de granelização confirmaram adequação em relação a legislação, ou seja, apresentou temperatura de no máximo 4,0 °C.

Um fator apontado para laticínios bem-sucedidos é atrair e reter funcionários qualificados (Edwards; Kuhn-Sherlock, 2021), no entanto mais de 50% dos ordenhadores da amostra avaliada nunca foram treinados (Tabela 2). Além disso, a padronização de higienização dos equipamentos e utensílios usados na ordenha

não é bem descrita pelos respondentes do formulário aplicado pela SSAN da prefeitura de Ubá, MG. No entanto, é relatado frequências de realização dos procedimentos acima de 80%. Quanto a higienização de mãos de ordenhadores, apenas 7% não adotam a prática (Tabela 2).

Entende-se que apenas animais saudáveis poderiam usar sua capacidade genética e produzir grandes quantidades de leite, apesar de haver limites fisiológicos (Gross, 2022). Singh *et al.* (2022) afirmam que os padrões comportamentais dos animais leiteiros são afetados negativamente pela restrição do fornecimento de água a eles e recomendam que o fornecimento de água em livre deve ser garantido aos animais para evitar prejuízo à saúde e desempenho dos mesmos. Uma das categorias avaliadas na amostra foi a disponibilidade de água em livre demanda para os animais e o banco de dados mostra 100% de respostas positivas (Tabela 2).

Quanto a nutrição dos animais, a maioria é alimentado com pastagem e ração (28%), outros 24% associam a silagem e 14%, com ração e silagem (Tabela 2). Segundo Santos *et al.* (2021), o manejo nutricional exerce influência sobre a produção e qualidade do leite de vacas em lactação.

O compartilhamento de tanques de granelização acontece em 24% das propriedades avaliadas (Tabela 2), sendo três produtores em média por tanque comunitário (Tabela 2). Tanque comunitário é o equipamento de refrigeração por sistema de expansão direta, utilizado de forma coletiva para conservação do leite cru refrigerado (BRASIL, 2017).

### 3.3. REBANHO BOVINO E PRODUÇÃO LEITEIRA EM PROPRIEDADES RURAIS DE UBÁ, MG

Em 2022, Ubá, MG possuía o número de 3628 vacas ordenhadas (IBGE, 2022). Entre as propriedades estudadas, aproximadamente, 86% possuíam até 45 animais (Tabela 3).

Quanto ao percentual de vacas em lactação em relação ao total do rebanho (Tabela 3), constatou-se que há espaço para ações de extensão a fim de otimizar os períodos entre partos para aumentar a produtividade das propriedades.

Por meio da relação entre o volume de leite ordenhado e o número de vacas em lactação, ou seja, a eficiência do volume produzido pelos animais constatou-se

que a maioria do rebanho das propriedades avaliadas produz mais que a média nacional (Tabela 3).

**Tabela 3** - Dados quantitativos 29 produtores de leite de Ubá, MG

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Total de vacas</b>	Até 45 vacas (Percentil 1)	25	86,21
	De 46 a 90 vacas (Percentil 2)	3	10,34
	De 136 a 180 vacas (Percentil 4)	1	3,45
<b>Vacas em lactação em relação ao total do rebanho</b>	até 50%	7	24,14
	de 51 a 75%	17	58,62
	76 a 100%	5	17,24
<b>Volume de leite/vaca em lactação</b>	Até 6L / dia/ vaca	4	13,79
	Maior que a média nacional de 7L / dia/ vaca (IBGE 2022)	25	86,21
<b>Produção própria de derivados de leite</b>	Sim	4	13,79
	Não	25	86,21
<b>Total</b>		29	100,00

Fonte: elaborado pelo autor.

O baixo percentual de estabelecimentos produtores de derivados lácteos constatado nesse estudo (Tabela 3) chama atenção para a possibilidade de fomento às agroindústrias com o objetivo de agregar valor ao leite e desenvolvimento econômico local.

As possíveis associações entre algumas categorias foram avaliadas (Tabela 4). As categorias de escolaridade foram agrupadas em três níveis, sendo considerado escolaridade inferior (ensino fundamental incompleto e completo), média (ensino médio incompleto e completo) e superior (curso técnico completo e curso superior incompleto e completo). Entretanto, não se constatou ( $p > 0,05$ ) interferência do nível de escolaridade dos proprietários e dos ordenhadores, bem como dos treinamentos realizados na eficiência do volume de leite produzido pelas vacas em lactação dos rebanhos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Interferência de escolaridade e treinamento de ordenhadores e proprietários no volume de leite produzido por vaca

	n (%)	Eficiência do volume de leite produzido pelos animais (L/vaca em lactação)	p
<b>Escolaridade dos proprietários<sup>1</sup></b>			
Escolaridade superior	14 (48,28)	15,71 ± 5,36 <sup>a</sup>	0,664
Escolaridade média	5 (17,24)	12,80 ± 8,25 <sup>a</sup>	
Escolaridade inferior	10 (34,48)	13,90 ± 7,85 <sup>a</sup>	
<b>Escolaridade dos ordenhadores<sup>1</sup></b>			
Escolaridade superior	7 (24,14)	15,00 ± 3,82 <sup>a</sup>	0,869
Escolaridade média	5 (17,24)	15,80 ± 8,04 <sup>a</sup>	
Escolaridade inferior	17 (58,62)	14,05 ± 7,42 <sup>a</sup>	
<b>Treinamento dos ordenhadores<sup>2</sup></b>			
Presença	14 (48,28)	16,71 ± 1,53 <sup>a</sup>	0,090
Ausência	15 (51,72)	12,60 ± 1,80 <sup>a</sup>	

Legenda: <sup>1</sup>ANOVA *one-way* ( $\alpha = 0,050$ ): média e desvio padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença entre as médias. <sup>2</sup>Teste t de *Studente* ( $\alpha = 0,050$ ): média e desvio padrão.

Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.4. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO OBTIDAS DE TANQUES DE GRANELIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG

A microbiota contaminante que acessa o leite cru é procedente de várias fontes, o que constitui um desafio na produção de laticínios (Cao *et al.*, 2021). A contagem média de microrganismos mesófilos aeróbios aumentou ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento das amostras de leite cru a 4,0 °C (Tabela 5).

**Tabela 5** - Contagem média (n=8) de microrganismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos nas amostras de leite cru

Tempo	Mesófilos (log UFC/mL)
0	5,12 ± 0,82 <sup>a</sup>
24	5,67 ± 0,62 <sup>ab</sup>
48	5,90 ± 0,47 <sup>ab</sup>
72	6,42 ± 0,62 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando o limite estabelecido pela legislação, as amostras de leite cru refrigerado apresentaram contagem média de microrganismos mesófilos aeróbios

adequadas no tempo 0 h. No entanto, a partir de 24 h a 4,0 °C, as mesmas não atenderam ao padrão estabelecido pela legislação (Brasil, 2018c), sugerindo a necessidade de padronizar pontos de controle no processo de ordenha e armazenamento a fim de reduzir a contagem inicial de microrganismos e prolongar a vida de útil do leite cru.

Perin *et al.* (2021) relataram que por meio de práticas orientativas e acompanhamento de produtores de leite de um município do Sudoeste Paranaense alcançou-se melhores resultados na qualidade do leite produzido, sendo necessário a adoção dessas práticas em Ubá, MG.

Constatou-se aumento ( $p < 0,05$ ), ao longo do armazenamento, das contagens médias de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos, psicotróficos lipolíticos e psicotróficos produtores de lecitinase (Tabela 6), fato que merece atenção para o uso desse leite como matéria prima na indústria de laticínios devido a atividade das enzimas deterioradoras que comprometem a qualidade do leite devido a hidrólise de proteína e gordura. Portanto, há necessidade da adoção de BPA e BPF nas propriedades para minimizar o acesso da microbiota deterioradora no leite cru, além da redução do tempo de armazenamento deste alimento nos tanques de expansão avaliados e de pasteurização precoce quando o leite chegar aos laticínios a fim de promover o processamento seguro. Entretanto, algumas lipases e proteases produzidas por psicotróficos resistem ao tratamento térmico modificando as características sensoriais nos produtos lácteos, além de ocasionarem perdas de rendimento na produção e instabilidade do leite ao calor (Goulart *et al.*, 2022).

Apesar de não haver na legislação brasileira valores limítrofes para contagem de psicotróficos em leite cru, considerando o potencial deteriorante, a contagem média de psicotróficos proteolíticos foi  $> 4,00 \log \text{ UFC/mL}$  em todos os tempos nas amostras estudadas (Tabela 6), o que representa a possibilidade de problemas tecnológicos no processamento do leite pela indústria de laticínios (Condé *et al.*, 2022) em consequência da proteólise do leite e derivados.

Falhas nas BPA impactam na qualidade do leite cru e ratifica a urgência de delimitar os pontos de controle desde a ordenha até o armazenamento do leite nos tanques de granelização que compuseram a amostra estudada a fim de indicar etapas do processo que precisam ser controladas para proposição de medidas preventivas e corretivas, qualificando a cadeia leiteira de Ubá, MG.

**Tabela 6** - Qualidade microbiológica (log UFC/mL) das amostras (n=8) de leite cru

Contagem	Tempo	(log UFC/mL)
<b>Psicrotróficos</b>	0	4,69 ± 0,96a
	24	5,42 ± 1,28ab
	48	6,21 ± 1,04bc
	72	6,68 ± 0,96c
<b>Média</b>		<b>5,74 ± 1,27</b>
<b>Psicrotróficos proteolíticos</b>	0	4,69 ± 0,97a
	24	5,15 ± 1,30ab
	48	5,91 ± 1,13bc
	72	6,44 ± 1,01c
<b>Média</b>		<b>5,51 ± 1,26</b>
<b>Psicrotróficos lipolíticos</b>	0	3,43 ± 1,67a
	24	3,60 ± 1,57a
	48	4,75 ± 1,14b
	72	4,98 ± 0,90b
<b>Média</b>		<b>4,19 ± 1,47</b>
<b>Psicrotróficos produtores de lecitinase</b>	0	3,81 ± 0,74a
	24	4,10 ± 0,94a
	48	4,78 ± 0,77ab
	72	5,63 ± 1,13b
<b>Média</b>		<b>4,58 ± 1,12</b>
<b>Estafilococos</b>	0	1,99 ± 2,34a
	24	1,73 ± 2,14a
	48	1,71 ± 2,00a
	72	2,07 ± 2,29a
<b>Média</b>		<b>1,87 ± 2,01</b>
<b>Bactérias lácticas</b>	0	4,66 ± 0,74a
	24	4,63 ± 0,71a
	48	4,85 ± 0,48ab
	72	5,51 ± 0,92b
<b>Média</b>		<b>4,91 ± 0,98</b>

Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

A contagem média de estafilococos manteve-se constante ( $p > 0,05$ ) ao longo do armazenamento do leite cru refrigerado (Tabela 6). No entanto, a presença destes microrganismos nas amostras indica falhas de higiene no processo (Massini *et al.*, 2023). Por outro lado, a contagem média de bactérias lácticas aumentou ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento a 4,0 °C (Tabela 6), o que indica a ocorrência de bactérias psicrotróficas neste grupo, que pode levar a acidificação do leite refrigerado armazenado por longos períodos.

### 3.5. ACIDEZ DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO OBTIDAS DE TANQUES DE GRANELIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG

Apesar da acidez titulável apresentar valor médio de acordo com os padrões legais vigentes (Brasil, 2018c), a mesma aumentou ( $p < 0,05$ ) ao longo de 72 h a 4,0 °C (Tabela 7), o que evidencia hidrólise de lactose em ácido láctico pela ação da microbiota presente, indicando deterioração do leite pelo aumento da contagem bacteriana (Cardoso *et al.*, 2023).

**Tabela 7** – Acidez das amostras (n=8) de leite cru

	Tempo	
<b>Acidez (g de ácido láctico/100mL)</b>	0	0.15 ± 0,03a
	24	0.16 ± 0,01ab
	48	0.17 ± 0,02b
	72	0.18 ± 0,01b
<b>Média</b>		0,17 ± 0,02

Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferença ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

Em acordo com os dados coletados pela SSAN associados às categorias do banco de dados analisado, sugere-se algumas causas para a contagem elevada de microrganismos no leite cru refrigerado e aumento da acidez durante o armazenamento como a carência de treinamento de ordenhadores, a não realização de pre *dipping*, a higienização inadequada dos utensílios e equipamentos usados e o longo tempo de transporte do leite até o tanque de expansão após a ordenha.

## 4. CONCLUSÃO

Sugere-se novos estudos, ampliando a amostra, com aplicação do questionário já padronizado pela SSAN para mais produtores de Ubá, MG, em concomitância com a realização de análises microbiológicas e físico-químicas de forma continuada a fim de qualificação da cadeia leiteira bem como garantir a oferta de leite e derivados de qualidade adequada para os usuários dos setores públicos, entidades, programas e projetos no âmbito da Política Municipal de Segurança Alimentar e Nutricional ( PMSAN) de Ubá, MG.

Ressalta-se a necessidade de fiscalização, monitoramento e orientação pelos órgãos competentes, a fim de assegurar a conformidade do leite cru refrigerado com as legislações brasileiras. Este estudo permitiu o entendimento dos desafios enfrentados na captação e armazenamento do leite cru em Ubá, MG, e a importância do fomento para adesão às normas estabelecidas a fim de garantir o escoamento de leite e derivados lácteos em acordo com padrões físico-químicos e microbiológicos.

Recomenda-se a implementação de projetos por meio da articulação de parcerias para realização de trabalhos de extensão, a fim de promover as BPA, definição dos pontos de controle no processo, de medidas corretivas e preventivas, como o aprimoramento por meio do treinamento dos ordenhadores e da disseminação das adequações das condições de higiene e refrigeração, a fim de reduzir as não conformidades identificadas e promover a excelência na cadeia produtiva do leite em Ubá, MG.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei nº 11.326, de 24 de julho de 2006. Estabelece as diretrizes para a formulação da Política Nacional da Agricultura Familiar e Empreendimentos Familiares Rurais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de julho de 2006.

BRASIL. Lei nº 12.512, de 14 de outubro de 2011. Institui o Programa de Apoio à Conservação Ambiental e o Programa de Fomento às Atividades Produtivas Rurais; altera as Leis nºs 10.696, de 2 de julho de 2003, 10.836, de 9 de janeiro de 2004, e 11.326, de 24 de julho de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de outubro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de março de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de julho de 2018a.

BRASIL. Lei nº 13.709, de 14 de agosto de 2018. Institui Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de agosto de 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, MAPA, 2022a.

BRASIL. Instrução especial nº 5, de 29 de julho de 2022. Dispõe sobre os índices básicos cadastrais e os parâmetros para o cálculo do módulo rural. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 de agosto de 2022b.

BRASIL. Lei nº 14.628, de 20 de julho de 2023. Institui o Programa de Aquisição de Alimentos (PAA) e o Programa Cozinha Solidária; altera as Leis nºs 12.512, de 14 de outubro de 2011, e 14.133, de 1º de abril de 2021 (Lei de Licitações e Contratos Administrativos); e revoga dispositivos das Leis nºs 11.718, de 20 de junho de 2008, 11.775, de 17 de setembro de 2008, 12.512, de 14 de outubro de 2011, e 14.284, de 29 de dezembro de 2021. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 de julho de 2023a.

BRASIL. Ministério de Desenvolvimento Social e Assistência Social, Família e Combate à Fome (MDS). **Serviços e informações do Brasil**, 2023b. Disponível em:

<https://www.gov.br/pt-br/servicos/inscrever-se-no-cadastro-único-para-programas-sociais-do-governo-federal>. Acesso em: 13 jun. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Mapa do leite: políticas públicas e privadas para o leite**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CAO, H.; YAN, Y.; WANG, L.; DONG, L.; PANG, X.; TANG, S.; LI, A.; XIANG, A.; ZHANG, L.; ZHENG, B. High-Throughput Sequencing Reveals Bacterial Diversity in Raw Milk Production Environment and Production Chain in Tangshan City of China. **Food Science of Animal Resource**, v. 41, n.3, p. 452-467, 2021.

CARDOSO, P. F.; OLIVEIRA, J. R.; PEREIRA, J. B. Análise microbiológica e físico-química do leite in natura refrigerado em diferentes tempos de armazenamento. **Revista Animal em Foco**, v. 3, p. 36-45, 2023.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L. de O.; GANDRA, S. O.; CAMPOS, R. C. A. B.; SILVA, R. R. da.; COSTA, J. F. da.; MARTINS, M. L. Identification of the contaminating psychrotrophic bacteria in refrigerated bulked raw milk and the assessment of their deteriorating potential. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 43, n. 2, p. 739-750, 2022.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F. P., ITO, K., (Eds). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 13, p. 159-166, 2001.

DIAS, Y. H. F.; GOUVÊA, C. M. M. Y.; MUFFATO, B. G.; MOREIRA, M. V.; SANTOS, A. B. B. dos; FRADE, V. L.; DUTRA, L. M. Leite de vaca na alimentação humana: uma revisão atualizada com base em evidências. **Journal of Social Issues and Health Sciences**, v. 1, n. 5, p. 1-9, 2024.

EDWARDS, J. P.; KUHN-SHERLOCK, B. Opportunities for improving the safety of dairy parlor workers. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.1, p. 419–430, 2021.

GOULART, J. Q.; PRADO, P. C do.; MATIAS, C.L.; PINTO, A. T. Estudo do comportamento de microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados de leite cru refrigerado. **PUBVET**, v.16, n.01, p.1-7, 2022.

GRAÇA, B. A.; BARRETO, E. M.; ALE, V. M. M. A importância da certificação sanitária para garantir a segurança alimentar em produtos de origem animal. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 2, p. 6557–6573, 2023. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/58516>. Acesso em: 04 ago. 2024.

GROSS, J.J. Limiting factors for milk production in dairy cows: perspectives from physiology and nutrition. **Jornal of Animal Science**, v.100, n.3, 2022.

GUALBERTO, I. M.do C.; BRITO, I. B.; VIEIRA, I. S. Influência do tempo e da temperatura de armazenamento na contagem bacteriana total e no teor de sólidos do leite cru refrigerado. **Revista de Ciências da Faculdade Univértix Faculdade Vértice**, v.1, n.1, p. 1-15, 2022.

HAAS, M. J. Lipolytic microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 15, 2001, p.175-180.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. A. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. p. 201-207.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Produção de Leite, 2022**. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>. Acesso em 18 ago. 2024.

LIMA, L.P.; BARAG, G, B.; PEREZ, R.; CARVALHO, A, F. Chilled raw milk quality: a case study in Zona da Mata region, Minas Gerais State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4,2020.

MARCY, J. A.; PAYTON PRUETT, W. Jr. Proteolytic microorganisms. DOWNES, F. P.; ITO, K., (Eds). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 16, p. 183-186, 2001.

MASSINI, L. S.; PICCOLO, M da P.; CLIPES, R. C.; FIGUEREDO, I. C de S.; SILVA, Y. D.; DONATELE, D. M. Quantificação de bactérias psicrófilas e células somáticas em amostras de leite cru armazenado em tanques de refrigeração. In: CORDEIRO, C. A. M.; BARRETO, N. S. E.; SANCHES, A.G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil**. São Paulo: Editora Científica Digital Ltda, 2023.

MENDONÇA, B. S. de; SILVA JUNIOR, R. C.; YOSHIMURA, E. H.; KNUPP, I. S. da SILVA; BANKUTI, F.I.; POZZA, M.S. S. dos. Comparativo entre desinfetantes utilizados no pre-*dipping* de vacas leiteiras. **Ciência Animal**, v.30, n.2, p.23-33, 2020.

PERIN, R. L.; GOBATO, I.; BUSATTA, h.; RANKRAPE, f.; STARIKOFF, K. Boas práticas agropecuárias em propriedade leiteira da agricultura familiar. **Revista Ciência em Extensão**, v.17, p.65-77, 2021.

SANTOS, N. S.; MEDEIROS, C. F. DE; SILVA, J. C. DE S.; ARAÚJO, C. de A.; SARMENTO, T. C. de F.; FONTES, C. N. Impacto do pré dipping, padrão racial e ordem dos jatos de leite sobre a atividade microbiológica e físico-química do leite cru bovino. **Diversitas Journal**, v.6, n.3, p.3694–3705, 2021.

SILVA, R. de O. P. E. Panorama do Mercado de Leite em 2023. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1-7, 2023.

SINGH, A. K.; BHAKAT, C.; SINGH, P. A review on water intake in dairy cattle: associated factors, management practices, and corresponding effects. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 154, 2022.

STRÖHER, J. A.; SANTOS JUNIOR, L. C. O. dos; SALAZAR, M. M. Evaluation of the microbiological quality of refrigerated raw milk on the way from the field to the industry: a case study in Rio Grande do Sul. **Nutrivisa**, v.10, p. 1-11, 2023.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTES, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2.ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 782p, 2006.

## CAPÍTULO III

### ADIÇÃO DE CULTURAS BIOPROTETORAS NO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO

#### RESUMO

Durante o armazenamento refrigerado do leite cru há multiplicação de bactérias psicrotróficas deterioradoras. Entretanto, culturas bioprotetoras podem ser uma alternativa interessante para inibir essa microbiota contaminante indesejável, pois são considerados agentes naturais. Assim, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos bioprotetores do bacteriófago UFJF\_PfSW6 e de uma cultura comercial de *Pediococcus acidilactici* no leite cru refrigerado granelizado e a influência de seu uso na qualidade deste alimento. Amostras de leite cru refrigerado do município de Ubá/MG foram coletadas e inoculadas com  $5,0 \times 10^5$  UFP/mL do fago UFJF\_PfSW6 ou com  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL da cultura de *Pediococcus acidilactici*. O tratamento controle consistiu das amostras não inoculadas. Posteriormente, as amostras foram fracionadas e armazenadas a 4,0 °C por 0, 24, 48 e 72 h para determinação das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos, psicrotróficos produtores de lecitinase, estafilococos e de bactérias lácticas. Além disso, determinou-se a acidez titulável das amostras ao longo do armazenamento. O fago UFJF\_PfSW6, bem como a cultura láctica testada não apresentaram efeito bioprotetor contra a microbiota deteriorante do leite cru refrigerado granelizado, uma vez que não foi constatada ( $p > 0,05$ ) diferença entre as contagens de microrganismos das amostras do tratamento controle e inoculadas. Além disso, constatou-se na maioria das amostras avaliadas aumento da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos e psicrotróficos deterioradores, além das bactérias lácticas ao longo do armazenamento das amostras a 4,0 °C. Portanto não foi constatado efeito bioprotetor do fago UFJF\_PfSW6 e da cultura comercial (*P. acidilactici*) na microbiota contaminante das amostras de leite cru refrigerado granelizado. Assim, sugere-se mais estudos a fim de identificar biocontroles aplicáveis ao leite cru a fim de reduzir a deterioração deste alimento.

Palavras-chave: Leite bovino. Bacteriófago. Cultura comercial. Bioproteção.

## 1.INTRODUÇÃO

O leite é um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira, contribuindo para o agronegócio do país. Entretanto, mesmo com a refrigeração do leite cru nas fazendas, a sua qualidade microbiológica continua sendo um problema importante, principalmente, devido a multiplicação de bactérias psicrófilas deterioradoras, que contaminam facilmente o leite durante a produção e se multiplicam durante o armazenamento refrigerado deste alimento (Condé *et al.*, 2022).

Impedir a deterioração incipiente do leite e derivados é de suma importância a fim de evitar o desperdício e problemas tecnológicos no processamento e armazenamento. Estratégias para minimizar a deterioração prematura incluem reduzir a contaminação da matéria-prima na fazenda, remover fisicamente os microrganismos contaminantes, rastrear e eliminar as fontes de contaminação usando técnicas moleculares avançadas e empregar agentes de biocontrole para reduzir a multiplicação de microrganismos indesejáveis (Martin *et al.*, 2021).

Bacteriófagos, vírus específicos de bactérias, têm sido aplicados em alimentos no biocontrole de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Wang; Zhao, 2022). Eles podem ser uma alternativa interessante para inibir a microbiota psicrófila contaminante do leite cru, pois são considerados agentes naturais e apresentam especificidade ao microrganismo alvo (Húngaro *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2022; Vidigal; Húngaro; 2023).

Por outro lado, o uso de culturas bacterianas vem se destacando na indústria de alimentos pois produzem antimicrobianos naturais como: ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e bacteriocinas, que podem inibir a multiplicação da microbiota patogênica e deterioradora, atuando como biocontrole (Abedin *et al.*, 2023; Kaveh *et al.*, 2023; Meruvu; Harsa, 2022; Souza *et al.*, 2022). Relatos informais de profissionais que atuam na indústria de laticínios destacam a ação bioprotetora em leite cru de *Pediococcus acidilactici*, sendo relevante a avaliação científica dessa informação.

O presente estudo teve como objetivo determinar a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, psicrófilos, psicrófilos proteolíticos, psicrófilos lipolíticos, psicrófilos produtores de lecitinase, *Staphylococcus* spp. e de bactérias lácticas ao longo de três dias de armazenamento a 4,0 °C nas

amostras de leite cru controle e após a inoculação de bacteriófago UFJF\_PfSW6 ou da cultura potencialmente bioprotetora comercial de *P. acidilactici*, além de avaliar a acidez titulável das amostras controle e inoculadas.

## 2.MATERIAL E MÉTODOS

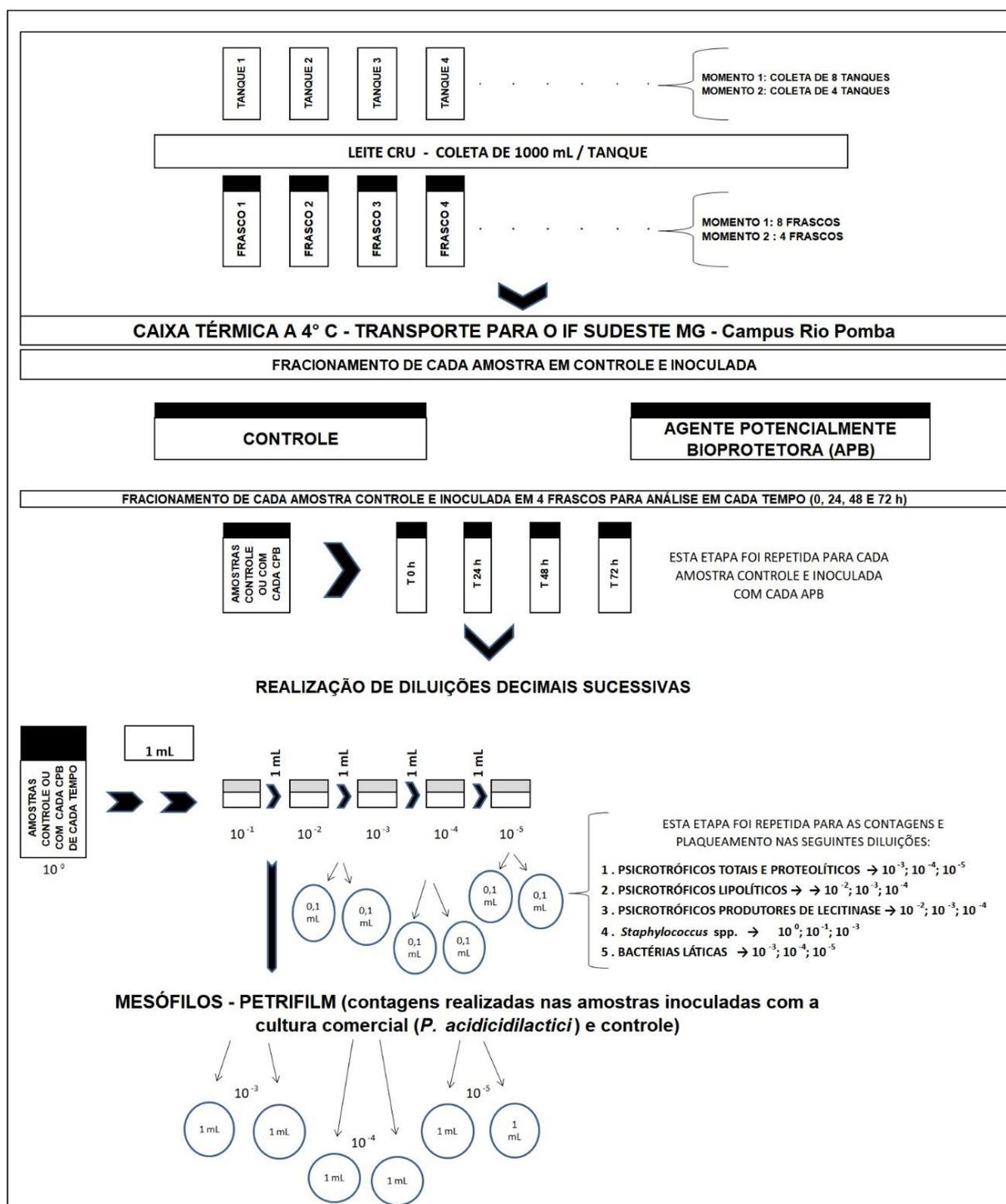
### 2.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU E AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DO TANQUE DE GRANELIZAÇÃO

Entre outubro de 2023 e maio de 2024, foram coletadas amostras de 1000 mL de leite cru refrigerado armazenado por no máximo 24 horas, em tanques de granelização do município de Ubá, Minas Gerais (Figura 1). A temperatura do leite foi determinada no momento de cada coleta. Após as coletas, as amostras foram transferidas assepticamente para frascos de vidro esterilizados e, durante o transporte foram acondicionadas em caixas térmicas com temperatura inferior a 4,0 °C e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, para realização dos experimentos (Figura 1).

### 2.2. INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE COM AGENTES POTENCIALMENTE BIOPROTETORES

As amostras de leite cru refrigerado coletadas dos tanques de expansão foram divididas em frascos esterilizados e separadas em controle e inoculadas com os agentes potencialmente bioprotetores (Figura 1). O tratamento controle consistiu das amostras não inoculadas. As coletas ocorreram em dois momentos, sendo no primeiro, coletados 8 tanques e no segundo 4 tanques (Figura 1). No primeiro, as amostras foram inoculadas com  $5,0 \times 10^5$  UFP/mL do fago UFJF\_PfSW6 e no segundo, com  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL de *P. acidilactici* (bactéria láctica potencialmente bioprotetora em leite cru segundo relatos informais de profissionais que atuam na indústria de laticínios). Posteriormente, as amostras foram fracionadas e armazenadas a 4 °C por 0, 24, 48 e 72 h para determinação das contagens de microrganismos (Figura 1).

**Figura 1.** Fluxograma de obtenção e caracterização das amostras de leite cru controle e inoculadas individualmente com agentes potencialmente bioprotetores



Fonte: elaborado pelo autor.

### 2.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO DO MUNICÍPIO DE UBÁ, MG

A análise microbiológica de Contagem Padrão em Placas foi utilizada como indicador de qualidade do leite. Diluições decimais sucessivas das amostras de leite cru refrigerado foram realizadas. Para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios das amostras controle e inoculadas com os agentes de biocontrole, transferiu-se 1 mL das respectivas diluições para placas Petrifilm™ AC (3M do Brasil), incubando-se a  $32 \pm 1$  °C por 48 horas, seguido de enumeração das colônias que se tornaram vermelhas devido à redução do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

As diluições das amostras de leite cru controle e inoculadas também foram plaqueadas em Ágar Caseinato para Métodos Padronizados (SMCA - Himedia, Mimbai, Índia), para contagem de bactérias psicotróficas (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2001) e psicotróficas proteolíticas viáveis (MARCY; PAYTON PRUETT, 2001), em PCA adicionado de 1,0% de tributirina para contagem de bactérias psicotróficas lipolíticas e em Ágar Trypticaseína de Soja (TSA - Kasvi, Pinhais, Paraná, Brasil), adicionado de 5,0% de emulsão gema de ovo, para contagem de bactérias psicotróficas produtoras da enzima lecitinase, com incubação, a  $6,5 \pm 0,5$  °C, por 10 dias (HAAS, 2001).

A enumeração de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada de acordo com o protocolo ISO (2019). Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas diretamente das amostras de leite cru para placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) enriquecido com emulsão de gema de ovo em solução salina 0,85% (1:1) e solução de telurito de potássio 1%. Após espalhamento da alíquota, com auxílio de alça de Drigalsky, as placas foram incubadas invertidas em estufa a  $37 \pm 2$  °C por 48h, sendo contadas as colônias típicas e atípicas. Foram consideradas colônias típicas de *Staphylococcus aureus* as que se apresentavam negras, brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio e, como colônias atípicas as acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos.

A viabilidade das bactérias lácticas nas amostras foi determinada pela contagem padrão em placas de acordo com Hall; Ledenbach; Flowers (2001). O plaqueamento das diluições foi realizado em Ágar de Man Rogosa Sharpe (MRS -

Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando a técnica de profundidade. Após a completa solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 32 °C, durante 72 horas em atmosfera microaerófila, utilizando-se jarra de anaerobiose para tal finalidade.

As contagens ocorreram no tempo 0 (logo após o fracionamento das oito amostras de leite cru para os experimentos que se utilizou o fago como biocontrole, ou logo após o fracionamento das quatro amostras de leite cru para os experimentos que se utilizou *P. acidilactici* como biocontrole) e com 24, 48 e 72 h de armazenamento das amostras a 4,0 °C.

#### 2.4. AVALIAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram avaliadas quanto a acidez titulável nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de incubação a 4,0 °C (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).

#### 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados referentes às contagens microbianas das amostras e de acidez titulável foram analisados em Delineamento em Blocos Casualizados e comparação das médias, por meio da análise de variância ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite cru em todos os tanques avaliados neste estudo apresentou temperatura inferior a 4,0 °C estando de acordo com o estabelecido na legislação brasileira (Brasil, 2018b).

#### 3.1. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO CONTROLE E INOCULADO COM O FAGO UFJF\_PfSW6

Constatou-se aumento ( $p < 0,05$ ) ao longo do armazenamento das contagens médias de microrganismos psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos, psicrotróficos produtores de lecitinase e de bactérias lácticas tanto nas amostras do tratamento controle quanto nas amostras inoculadas com o fago

UFJF\_PfSW6. Entretanto, as contagens médias destes grupos microbianos não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos (Tabela 1), evidenciando que o fago UFJF\_PfSW6 não apresentou inibição dos microrganismos avaliados. Por outro lado, a contagem média de estafilococos manteve-se constante ( $p>0,05$ ) ao longo do tempo e entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1** - Contagem média (n=8) de microrganismos nas amostras de leite cru controle (não inoculadas) e inoculadas com fago UFJF\_PfSW6

Contagem	Tempo	Controle (log UFC/mL)	Inoculado (log UFC/mL)
<b>Psicrotróficos</b>	0	4,69 ± 0,96Aa	4,64 ± 0,89Aa
	24	5,42 ± 1,28Aab	5,62 ± 1,24Ab
	48	6,21 ± 1,04Abc	6,04 ± 0,64Abc
	72	6,68 ± 0,96Ac	6,64 ± 0,91Ac
<b>Média</b>		<b>5,74 ± 1,27A</b>	<b>5,69 ± 1,17A</b>
<b>Psicrotróficos proteolíticos</b>	0	4,69 ± 0,97Aa	4,52 ± 0,77Aa
	24	5,15 ± 1,30Aab	5,31 ± 1,31Aab
	48	5,91 ± 1,13Abc	5,73 ± 0,67Abc
	72	6,44 ± 1,01Ac	6,31 ± 0,94Ac
<b>Média</b>		<b>5,51 ± 1,26A</b>	<b>5,43 ± 1,13A</b>
<b>Psicrotróficos lipolíticos</b>	0	3,43 ± 1,67Aa	3,29 ± 1,47Aa
	24	3,60 ± 1,57Aa	3,26 ± 0,98Aa
	48	4,75 ± 1,14Ab	4,49 ± 0,79Ab
	72	4,98 ± 0,90Ab	5,20 ± 0,87Ab
<b>Média</b>		<b>4,19 ± 1,47A</b>	<b>4,06 ± 1,31A</b>
<b>Psicrotróficos produtores de lecitinase</b>	0	3,81 ± 0,74Aa	3,74 ± 0,88Aa
	24	4,10 ± 0,94Aa	4,19A ± 0,95ab
	48	4,78 ± 0,77Aab	5,16A ± 0,75bc
	72	5,63 ± 1,13 Ab	5,47 ± 1,27Ac
<b>Média</b>		<b>4,58 ± 1,12 A</b>	<b>4,64 ± 1,17A</b>
<b>Estafilococos</b>	0	1,99 ± 2,34Aa	1,69 ± 1,91Aa
	24	1,73 ± 2,14Aa	1,54 ± 1,83Aa
	48	1,71 ± 2,00Aa	1,59 ± 1,91Aa
	72	2,07 ± 2,29Aa	1,67 ± 2,07Aa
<b>Média</b>		<b>1,87 ± 2,01A</b>	<b>1,62 ± 1,84A</b>
<b>Bactérias láticas</b>	0	4,66 ± 0,74Aa	4,20 ± 0,96Aa
	24	4,63 ± 0,71Aa	4,26 ± 0,46Aa
	48	4,85 ± 0,48Aab	4,87 ± 0,64Aab
	72	5,51 ± 0,92Ab	5,31 ± 1,00Ab
<b>Média</b>		<b>4,91 ± 0,98A</b>	<b>4,66 ± 0,88A</b>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna e por letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

Portanto, não foi constatado efeito bioprotetor do fago UFJF\_PfSW6 contra a microbiota contaminante dessas amostras de leite cru refrigerado granelizado, provavelmente por sua especificidade contra *Pseudomonas fluorescens*. Ressalta-se que em estudos realizados previamente, a contagem inicial do fago UFJF\_PfSW6 estava dois ciclos log acima da contagem da cultura de *Pseudomonas* inoculada no leite (Húngaro *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2022; Vidigal; Húngaro; 2023). Além disso, a amplitude do espectro lítico dos bacteriófagos é a chave para o sucesso da sua aplicação em biocontrole. Portanto, é necessária a busca por bacteriófagos promíscuos que infectem a ampla diversidade de bactérias psicotróficas deterioradoras contaminantes encontrada neste alimento.

### 3.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO CONTROLE E INOCULADAS COM *P. acidilactici*

De forma geral, as contagens médias dos microrganismos avaliados aumentaram ao longo do armazenamento (Tabelas 2) quando *P. acidilactici* foi usado como cultura bioprotetora. Entretanto, as contagens médias destes grupos microbianos não diferiram entre os tratamentos, exceto para bactérias lácticas (Tabela 2). Assim, constatou-se que *P. acidilactici*, assim como o fago UFJF\_PfSW6, não inibiu a microbiota deterioradora contaminante das amostras de leite cru coletadas no município de Ubá, MG. Entretanto, espera-se que biocontroles exerçam atividade antimicrobiana contra deteriorantes (Souza *et al.*, 2022). Porém, o fabricante informa que a cultura comercial utilizada nos testes (*P. acidilactici*) deve ser aplicada em leite pós tratamento térmico e resfriamento, metodologia que não foi seguida pela proposta em virtude dos objetivos deste trabalho.

Assim, apesar de relatos informais de profissionais que atuam na indústria de laticínios que destacaram a ação bioprotetora em leite cru de *P. acidilactici*, essa cultura que inibe, segundo seu fabricante, a multiplicação e atividade de alguns microrganismos indesejados em leite como *Clostridium* e *Bacillus*, além de outros Gram-positivos, não apresentou atividade de biocontrole contra as bactérias psicotróficas, que em sua maioria, no leite cru, são Gram-negativas (Condé, 2018).

**Tabela 2** - Contagem (n=4) de microrganismos nas amostras de leite cru controle (não inoculadas) e inoculadas com *P. acidilactici*

Contagem	Tempo	Controle (log UFC/mL)	Inoculado (log UFC/mL)
<b>Mesófilos</b>	0	5,14 ± 0,70Aa	5,41 ± 0,59Aa
	24	5,38 ± 0,77Aa	5,35 ± 0,68Aa
	48	5,54 ± 0,59Aa	5,74 ± 0,64Aab
	72	6,81 ± 0,75Ab	6,46 ± 0,61Ab
<b>Média</b>		<b>5,71 ± 0,92A</b>	<b>5,74 ± 0,72A</b>
<b>Psicrotróficos</b>	0	5,31 ± 0,81Aa	5,69 ± 0,68Aa
	24	4,96 ± 0,95Aab	4,46 ± 0,56Aab
	48	5,98 ± 0,45Abc	5,47 ± 1,01Abc
	72	6,71 ± 1,25Ac	6,90 ± 1,15Ac
<b>Média</b>		<b>5,78 ± 1,09A</b>	<b>5,74 ± 1,14A</b>
<b>Psicrotróficos proteolíticos</b>	0	4,86 ± 1,13Aa	4,60 ± 1,20Aa
	24	4,13 ± 0,22Aab	4,89 ± 0,17Aa
	48	5,50 ± 0,42Abc	4,87 ± 0,86Aa
	72	6,39 ± 1,28Ac	5,57 ± 1,39Ba
<b>Média</b>		<b>5,28 ± 1,20A</b>	<b>4,99 ± 1,02A</b>
<b>Psicrotróficos lipolíticos</b>	0	2,00 Aa	2,00 Aa
	24	2,00 Aa	2,00 Aa
	48	2,41 ± 0,83Aab	2,30 ± 0,60Aab
	72	3,20 ± 0,91Ab	3,18 ± 1,09Ab
<b>Média</b>		<b>2,40 ± 0,75A</b>	<b>2,37 ± 0,75A</b>
<b>Psicrotróficos produtores de lecitinase</b>	0	3,75 ± 1,10Aa	3,65 ± 1,30Aa
	24	3,72 ± 1,25Aa	3,39 ± 0,67Aa
	48	4,14 ± 1,31Aab	4,01 ± 1,20Aab
	72	5,68 ± 1,69Ab	5,43 ± 1,41Ab
<b>Média</b>		<b>4,27 ± 1,40A</b>	<b>4,17 ± 1,35A</b>
<b>Bactérias lácticas</b>	0	4,30 ± 0,22Aab	5,05 ± 0,18Ba
	24	4,01 ± 0,40Aa	4,75 ± 0,12Ba
	48	4,30 ± 0,44Aab	4,90 ± 0,13Aa
	72	5,45 ± 0,83Ab	6,06 ± 0,96Ab
<b>Média</b>		<b>4,52 ± 0,18A</b>	<b>5,19 ± 0,69B</b>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna e por letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

A microbiota do leite cru na Zona da Mata de Minas Gerais possui alta diversidade genética (Martins et al., 2006; Condé, 2018), o que limita a ação dos agentes de biocontrole. No entanto, precisa-se atentar que o biocontrole é apenas uma barreira a mais e que a redução da qualidade microbiológica do leite cru pode ser minimizada pela adoção das Boas Práticas agropecuárias (Ribeiro et al., 2018).

Em ambos tratamentos (Tabela 2), a contagem de estafilococos ao longo do tempo nas amostras foi  $< 1,0$  log UFC/mL, satisfazendo os protocolos das Boas Práticas Agropecuárias (BPA). A presença destes microrganismos no leite cru pode ser oriunda de falhas nas práticas de higiene durante a produção de leite cru e ocorrência de mastite nas vacas leiteiras. A contagem elevada de estafilococos em alimentos pode resultar em intoxicação alimentar (Massini *et al.*, 2023; Forouzani-Moghaddam *et al.*, 2024).

O leite cru não atendeu a legislação vigente em relação à contagem de microrganismos mesófilos aeróbios a partir de 48 h de armazenamento a 4,0 °C (Tabela 2). Portanto, o tempo para refrigeração do leite na propriedade deve ser o menor possível, sendo que o tempo de captação do leite nos tanques de expansão nas propriedades não deve exceder a 48 h, que é o tempo máximo estabelecido na legislação (Brasil, 2018b) para que o leite cru atenda a qualidade exigida que é de 300.000 UFC/mL (5,48 log UFC/mL).

A contagem média de microrganismos psicotróficos foi superior a  $10^6$  UFC/mL após 72 h de armazenamento das amostras a 4,0 °C (Tabela 2). De acordo com Pinto *et al.* (2019), é imprudente direcionar o leite cru para a produção de queijos e de leite UHT quando a contagem de microrganismos psicotróficos está acima deste valor de contagem, o que reforça a necessidade de se respeitar o período máximo de 48 h de armazenamento do leite cru refrigerado no tanque de expansão previamente a coleta pelos laticínios. Além disso, constatou-se contagem média de microrganismos psicotróficos proteolíticos acima  $10^4$  UFC/mL imediatamente após a coleta (Tabelas 1 e 2), o que pode comprometer de forma significativa a produção de queijos e de leite UHT (Ultra Alta Temperatura) em função da ação de proteases extracelulares termorresistentes (Pinto *et al.*, 2019).

Portanto, contagens elevadas de microrganismos psicotróficos deterioradores como os avaliados neste estudo (proteolíticos, lipolíticos e produtores de lecitinase) pode levar a problemas tecnológicos como instabilidade do leite ao calor, geleificação do leite UHT, sabor, odor e cor alterados no leite e derivados, perda de rendimento na produção de queijos e alteração na viscosidade em produtos lácteos fermentados. Essas alterações ocorrem em função da produção de enzimas deterioradoras como proteases e lipases termorresistentes (Condé *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2023).

### 3.3. ACIDEZ DAS AMOSTRAS DE LEITE CRU CONTROLE OU INOCULADO COM CULTURAS POTENCIALMENTE BIOPROTETORAS

A acidez titulável média das amostras apresentou-se de acordo com os padrões legais vigentes (Brasil, 2018b), exceto para as amostras utilizadas para avaliação do efeito bioprotetor de *P. acidilactici*, que em 72 h de armazenamento a 4,0 °C apresentou acidez muito elevada (Tabela 3). A elevação ( $p < 0,05$ ) da acidez pode estar relacionado ao aumento ( $p < 0,05$ ) da contagem de bactérias lácticas (Tabela 2), que fermentam a lactose com consequente produção de ácido láctico e pode indicar a diversidade de bactérias lácticas psicrótróficas nas amostras de leite cru de baixa qualidade.

Entretanto, apesar do aumento ( $p < 0,05$ ) de acidez constatado nas amostras controle e inoculadas ao longo de 72 h a 4,0 °C, a mesma não diferiu entre os tratamentos controle (não inoculado) e inoculado (Tabela 3).

**Tabela 3** – Acidez (g de ácido láctico/100mL) das amostras de leite cru controle e inoculado com agentes potencialmente bioprotetores

Cultura	Tempo	Controle (log UFC/mL)	Inoculado (log UFC/mL)
<b>fago UFJF_PfSW6</b>	0	0,15 ± 0,03Aa	0,15 ± 0,01Aa
	24	0,16 ± 0,01Aab	0,16 ± 0,02Aab
	48	0,17 ± 0,02Ab	0,16 ± 0,02Aab
	72	0,18 ± 0,01Ab	0,17 ± 0,01Ab
	<b>Média</b>	<b>0,17 ± 0,02A</b>	<b>0,16 ± 0,01A</b>
<b><i>P. acidilactici</i></b>	0	0,15 ± 0,09Aa	0,14 ± 0,09Aa
	24	0,15 ± 0,09Aa	0,14 ± 0,09Aa
	48	0,17 ± 0,10Aa	0,16 ± 0,10Aa
	72	0,42 ± 0,27Ab	0,43 ± 0,27Ab
	<b>Média</b>	<b>0,22 ± 0,13A</b>	<b>0,22 ± 0,12A</b>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna e por letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

## 4. CONCLUSÃO

Não foi constatado efeito bioprotetor do fago UFJF\_PfSW6 e da cultura comercial *P. acidilactici* na microbiota contaminante das amostras de leite cru

refrigerado granelizado. Portanto, mais estudos são necessários com outros agentes em busca de bioprotetores efetivos com aplicabilidade no leite cru refrigerado granelizado a fim de inibir, principalmente, a microbiota psicotrófica deterioradora.

Sugere-se, nos estudos futuros, utilizar culturas autóctones como bioprotetoras devido sua adaptação prévia em leite e derivados, o que pode facilitar seu potencial tecnológico de inibição de microrganismos deterioradores como os psicotróficos. Recomenda-se ainda, que a contagem inicial dos potenciais agentes de biocontrole a serem inoculados sejam maiores que a dos microrganismos que se deseja inibir a fim de avaliar o impacto dos mesmos nas amostras estudadas.

O momento da inoculação do agente de bioproteção deve receber atenção, levantando o questionamento sobre a possível interferência da refrigeração a 4,0 °C na produção de compostos inibidores, suscitando como alternativa a adição direta no leite após ordenha antes de refrigerar, oportunizando tempo para liberação dos compostos antimicrobianos pelos agentes em teste. Outra hipótese experimental seria a necessidade de usar agentes de biocontrole termorresistentes tendo em vista que o leite passará pelo tratamento futuro de pasteurização e os mesmos permanecerão viáveis no alimento.

Ratifica-se ainda que estudos envolvendo a adição de agentes de biocontrole são importantes para atender a demanda dos consumidores por novas tecnologias que possibilitem a ingestão de alimentos com redução do uso de conservantes por meio de processo limpo, sustentável e saudável, podendo ser coadjuvantes na qualidade do leite cru refrigerado granelizado.

## REFERÊNCIAS

ABEDIN, M.M.; CHOURASIA, R.; PHUKON, L.; PUJA, S.; RAMESH. C. R.; SUDHJIR, P. S.; AMIT, K. R. Lactic acid bacteria in the functional food industry: biotechnological properties and potential applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p.1-15, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de julho de 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 77, de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018c.

CONDÉ, P. R. **Potencial deteriorador e diversidade da microbiota do leite cru granelizado**. 2018. 121f. Dissertação (Mestrado Profissional Stricto Sensu em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba, 2018.

CONDÉ, P. R.; PINTO, C. L. de O.; GANDRA, S. O.; CAMPOS, R. C. A. B.; SILVA, R. R. da.; COSTA, J. F. da.; MARTINS, M. L. Identification of the contaminating psychrotrophic bacteria in refrigerated bulked raw milk and the assessment of their deteriorating potential. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 43, n. 2, p. 739-750, 2022.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F. P., ITO, K., (Eds). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 13, p. 159-166, 2001.

FOROUZANI-MOGHADDAM, M. J.; HABIBI, S.; HOSSEINI-SAFA, A.; KHANALIHA, K.; MOKARINEJAD, R.; AKHOUNDZADEH, F.; OSHAGHI, M. Rapid detection of major enterotoxin genes and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk in the Yazd province, Iran. **Veterinary medicine and Science**, v.10, n.3, 2024.

HAAS, M. J. Lipolytic microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 15, p.175-180, 2001.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. A. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA) p. 201-207, 2001.

HUNGARO, H.M.; VIDIGAL, P. M. P.; NASCIMENTO, E. C.; GOMES, C. O. F.; GONTIJO, M. T. P.; LOPEZ, M. E. S. Genomic Characterisation of UFJF\_PfDIW6: A Novel Lytic *Pseudomonas fluorescens*-Phage with Potential for Biocontrol in the Dairy Industry. **Viruses**, v.14, n. 3, 2022.

ISO - International Organization for Standardization - ISO 6888-1. Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Métodos horizontais para enumeração de estafilococos coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). Parte 1: Técnica usando meio ágar Baird-Parker, 2019.

KAVEH, S.; HASHEMI, S. M. B.; ABEDI, E.; AMIRI, M. J.; CONTE, F.L. Bio-Preservation of meat and fermented meta products by lactid acid bactéria strains and their antibacterial metabolites. **Sustainability**, v.15, n.10154, p. 1-17, 2023.

MARCY, J. A.; PAYTON PRUETT, W. Jr. Proteolytic microorganisms. DOWNES, F. P.; ITO, K., (Eds). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association – APHA, Chapter 16, p. 183-186, 2001.

MARTIN, N.H.; TORRES-FRENZEL, P.; WIEDMANN, M. Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. **Journal Dairy Science**, v.104, n.2, p.1251-1261, 2021.

MARTINS, M. L.; PINTO, C., L. O.; ROCHA, R. B.; ARAÚJO, E.F.; VANETTI, M. C. D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p.144–148, 2006.

MASSINI, L. S.; PICCOLO, M da P.; CLIPES, R. C.; FIGUEREDO, I. C de S.; SILVA, Y. D.; DONATELE, D. M. Quantificação de bactérias psicrotróficas e células somáticas em amostras de leite cru armazenado em tanques de refrigeração. In: CORDEIRO, C. A. M.; BARRETO, N. S. E.; SANCHES, A.G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil**. São Paulo: Editora Científica Digital Ltda, 2023.

MERUVU, H.; HARSA, S. Lactic acid bacteria: isolation–characterization approaches and industrial applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.63, n. 26, p. 8337-8356, 2023.

NASCIMENTO, E. C. do.; SABINO, M. C.; CORGUINHA, L. da R.; TARGINO, B. N.; LANGE, C. C.; PINTO, C. L. de O.; PRISCILA, P.F.; VIDIGAL, P. M.P.; SANT'ANA, A.S.; HUNGARO, H.M. Lytic bacteriophages UFJF\_PfDIW6 and UFJF\_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. **Food Microbiology**, v.101, p.1-8, 2022

PINTO, C. L de O.; MARTINS, L. M.; CAMPOS, N. L. F.; MARTINS, A. D. de O.; BENEVENUTO, W. C. A. do N.; MARTINS, E. M. F.; SILVA, H. L. A. da.; CRUZ, A. G. da. Microbiologia do Leite Cru. *In*: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA C. A. F.; CORASSIM, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 2, p.32-42, 2019.

RIBEIRO, J. J. C.; TAMANINI, R.; OLIVEIRA, A.; ALFIERI, A. A.; BELOTI, V. Genetic diversity of thermotolerant spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. **Journal Dairy Science**. v.101, n.8, p.6927-6936, 2018.

RODRIGUES, R. da S.; MACHADO, S. G.; CARVALHO, A. F. de.; NERO, L. A. Comparative genomic and functional annotation of *Pseudomonas* spp. genomes responsible for blue discoloration of Brazilian fresh soft cheese. **International Dairy Journal**, v.140, 2023.

SOUZA, L. V.; MARTINS, E.; MOREIRA, I. M. F. B.; CARVALHO, A. F. de. Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. **International Journal of Microbiology**, p. 1-16, 2022.

VIDIGAL, P. M. P.; HUNGARO, H. M. Genome sequencing of *Pseudomonas fluorescens* phage UFJF\_PfSW6: a novel lytic *Pijolavirus* specie with potential for biocontrol in the dairy industry. **3 Biotech**, v.13, n.2, 2023.

WANG, Z.; ZHAO, X. The application and research progress of bacteriophages in food safety. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 4, p. 2137–2147, 2022.

ZHUANG, J.; HOU, Y.; WANG, Y.; GAO, Y.; CHEN, Y.; QI, J.; LI, P.; BIAN, Y.; JU, N. Relationship between microorganisms and milk metabolites during quality changes in refrigerated raw milk: A metagenomic and metabolomic exploration. **International journal of food microbiology**, v. 425, 2024.

## CONCLUSÃO GERAL

Sugere-se novos estudos, ampliando a amostra, com aplicação do questionário já padronizado pela SSAN para mais produtores de Ubá, MG, em concomitância com a realização de análises microbiológicas e físico-químicas de forma continuada a fim de qualificação da cadeia leiteira bem como garantir a oferta de leite e derivados de qualidade adequada para os usuários dos setores públicos, entidades, programas e projetos no âmbito da Política Municipal de Segurança Alimentar e Nutricional (PMSAN) de Ubá, MG.

Uma alternativa de grande relevância para fomento à cadeia leiteira é a implementação de projetos por meio da articulação de parcerias para realização de trabalhos de extensão, a fim de promover as BPA, definição dos pontos de controle no processo, de medidas corretivas e preventivas, como o aprimoramento por meio do treinamento dos ordenhadores e da disseminação das adequações das condições de higiene e refrigeração, a fim de reduzir as não conformidades identificadas e promover a excelência na cadeia produtiva do leite.

O treinamento constante em BPA, de ordenha e de fabricação dos envolvidos na produção de leite é essencial para garantir a qualidade e segurança do leite cru refrigerado, a fim de promover geração de renda e manutenção do homem no campo. Os treinamentos devem envolver uma abordagem global, transdisciplinar, transcultural, integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde de pessoas, animais e ecossistemas, sendo essencial para alcançar o conceito da Saúde Única e, conseqüentemente, melhorar a qualidade do leite cru produzido no Brasil.

Ressalta-se a necessidade de fiscalização, monitoramento e orientação pelos órgãos competentes, a fim de assegurar a conformidade do leite cru refrigerado com as legislações brasileiras. Este estudo permitiu o entendimento dos desafios enfrentados na captação e armazenamento do leite cru em Ubá, MG, e a importância do fomento para adesão às normas estabelecidas a fim de garantir o escoamento de leite e derivados lácteos em acordo com padrões físico-químicos e microbiológicos.

Não foi constatado efeito bioprotetor do fago UFJF\_PfSW6 e de cultura comercial de *P. acidilactici* na microbiota contaminante das amostras de leite cru refrigerado granelizado. Portanto, mais estudos são necessários com outras

culturas em busca de bioprotetores efetivos com aplicabilidade no leite cru refrigerado granelizado a fim de inibir principalmente a microbiota psicrotrófica deterioradora. Estudos envolvendo a bioproteção do leite cru são importantes para atender a demanda dos consumidores por novas tecnologias que possibilitem a ingestão de alimentos com redução do uso de conservantes por meio de processo limpo, sustentável e saudável.

## APÊNDICE

### CAPÍTULO II - APÊNDICE 1

Questionário on-line aplicado pela Seção de Segurança Alimentar e Nutricional de Ubá/MG

Este formulário é destinado ao cadastramento de Produtores de leite de Ubá e Microrregião para integrar um projeto da Seção de Segurança Alimentar e Nutricional de Ubá/MG.

#### IDENTIFICAÇÃO

ENDEREÇO COMPLETO (SÍTIO/FAZENDA; RUA/COMUNIDADE; NÚMERO; ZONA RURAL; CIDADE)

TELEFONE

WHATSAPP

É INSCRITO NO cadÚnico?

SIM . NIS: \_\_\_\_\_

NÃO

POSSUI DAP/CAF?

SIM

NÃO

POSSUI CERTIFICADO SANITÁRIO (IMA OU SIM OU OUTRO)

SIM

NÃO

Se sim qual? \_\_\_\_\_

QUAL O GRAU DE ESCOLARIDADE DOS ORDENHADORES?

Analfabeto

Ensino fundamental incompleto

Ensino fundamental completo

Ensino médio incompleto

Ensino médio completo

Ensino superior

QUAL O GRAU DE ESCOLARIDADE DO PROPRIETÁRIO?

Analfabeto

Ensino fundamental incompleto

- Ensino fundamental completo
- Ensino médio incompleto
- Ensino médio completo
- Ensino superior

### **DADOS QUANTITATIVOS DA PROPRIEDADE**

QUANTAS VACAS POSSUI? \_\_\_\_\_

QUANTOS VACAS EM LACTAÇÃO? \_\_\_\_\_

QUANTOS LITROS DE LEITE PRODUZ EM MÉDIA POR DIA? \_\_\_\_\_

PRODUZ DERIVADOS DE LEITE? PODE MARCAR MAIS DE UM ITEM

- Não produzo derivados de leite, comercializo o leite cru para laticínios
- Não produzo derivados de leite, comercializo o leite cru por conta própria
- Queijo Minas Frescal
- Queijo Minas Padrão
- Muçarela
- Iogurte
- Bebida láctea
- Doce de Leite
- Requeijão
- Ricota
- Cottage
- Manteiga

Outros: \_\_\_\_\_

### **MANEJO E BPA**

AS VACAS SÃO VACINADAS?

- Sim
- Não

Quais vacinas são aplicadas nas vacas? \_\_\_\_\_

TIPO DE ORDENHA

- Manual
- Mecânica

VOCÊ FAZ PRÉ-DIPPING (DESINFECÇÃO DOS TETOS POR IMERSÃO POR 20 A 30 SEGUNDOS EM SOLUÇÃO APROPRIADA ANTES DA ORDENHA)?

- Sim
- Não

APÓS O PRÉ-DIPPING, FAZ A SECAGEM DO TETO COM PAPEL TOALHA DESCARTÁVEL?

- Sim
- Não

APÓS A ORDENHA, O LEITE É REFRIGERADO?

- Sim. Tenho tanque
- Sim. O tanque é compartilhado com outros produtores. Quantos produtores? \_\_\_\_\_
- Sim. Refrigero de outra forma. Qual? \_\_\_\_\_
- Não

QUANTO TEMPO VOCÊ DEMORA PARA TRANSPORTAR O LEITE ATÉ O LOCAL PARA A REFRIGERAÇÃO APÓS A ORDENHA?

- Imediatamente após a ordenha
- Demoro de 1 a 2 horas
- Demoro mais de 2 horas
- Não tenho controle mas demora bastante
- Outro tempo: \_\_\_\_\_

A TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO É DE 2 °C A 4 °C ?

- Sim.
- Não controlo a temperatura de refrigeração
- Não refrigero o leite após a ordenha

QUANTO TEMPO O LEITE DEMORA PARA CHEGAR A 4 °C APÓS A TRANSFERÊNCIA PARA O LOCAL DE REFRIGERAÇÃO?

- Demora de 1 a 2 horas
- Demora mais de 2 horas
- Não tenho controle mas demora bastante
- Outro tempo: \_\_\_\_\_

APÓS CADA COLETA, O TANQUE É LIMPO E SANITIZADO?

- SIM
- NÃO
- NÃO TENHO TANQUE

Quais soluções são utilizadas? \_\_\_\_\_

DESCREVA O PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA HIGIENIZAR O TANQUE

---

---

HIGIENIZA O REFRIGERADOR? COM QUAL FREQUÊNCIA?

- Não costumo higienizar
- Sempre higienizo após a coleta do leite cru
- Higienizo 1 a 2 vezes por semana
- Higienizo 3 a 5 vezes por semana
- Higienizo 3 vezes por mês
- Higienizo 2 vezes por mês
- Higienizo 1 vez por mês

HIGIENIZA O LATÃO? COM QUAL FREQUÊNCIA?

- Não costumo higienizar
- Sempre higienizo após a coleta do leite cru
- Higienizo de 1 a 2 vezes por semana
- Higienizo de 3 a 5 vezes por semana
- Higienizo 3 vezes por mês
- Higienizo 2 vezes por mês
- Higienizo 1 vez por mês

Quais soluções são utilizadas? \_\_\_\_\_

DESCREVA O PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA HIGIENIZAR O LATÃO

---

---

HIGIENIZA AS TETEIRAS? COM QUAL FREQUÊNCIA?

- Não costumo higienizar
- Sempre higienizo após a ordenha
- Higienizo 1 a 2 vezes por semana
- Higienizo 3 a 5 vezes por semana
- Higienizo 3 vezes por mês
- Higienizo 2 vezes por mês
- Higienizo 1 vez por mês

Quais soluções são utilizadas? \_\_\_\_\_

DESCREVA O PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA HIGIENIZAR AS TETEIRAS

---

---

OS ORDENHADORES HIGIENIZAM AS MÃOS?

- Não costumam higienizar
- Sempre higienizam ao mudar de função
- Higienizam antes e depois da ordenha

Qual solução é utilizada? \_\_\_\_\_

DESCREVA O PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA HIGIENIZAR AS MÃOS

---

---

OS ORDENHADORES RECEBEM TREINAMENTOS?

- Sim. Mensalmente
- Sim. Trimestralmente
- Sim. Duas vezes por ano
- Sim. Anualmente

Não

NA ORDENHA, ELIMINA OS TRÊS PRIMEIROS JATOS?

Sim

Não

DESTINO DO LEITE CRU DAS VACAS COM MASTITE:

Descarte

O bezerro mama

Outro: \_\_\_\_\_

NUTRIÇÃO (ALIMENTAÇÃO) DOS ANIMAIS. PODE MARCAR MAIS DE UM ITEM

Pastagens

Ração

Suplementos. Quais: \_\_\_\_\_

outros: \_\_\_\_\_

É DISPONIBILIZADO ÁGUA EM LIVRE DEMANDA (A VONTADE) PARA OS ANIMAIS?

Sim

Não

HIGIENIZA A CAIXA DE DESEDENTAÇÃO (ÁGUA)? COM QUAL FREQUÊNCIA?

Não costumo higienizar

Higienizo diariamente

Higienizo 1 a 2 vezes por semana

Higienizo 3 a 5 vezes por semana

Higienizo 2 vez por mês

Higienizo 1 vez por mês

Outra: \_\_\_\_\_

OS RESÍDUOS (DEJETOS - ESTERCO E URINA) SÃO TRATADOS?

Sim

Não

QUAL O DESTINO DO ESTERCO?

- Armazeno em local coberto e que possibilita o escoamento
- Destino para esterqueira ou composteira
- Coloco diretamente em áreas de cultivo
- Armazeno "a céu aberto" para "curar" e coloco, posteriormente, em áreas de cultivo

O CHORUME É RECOLHIDO?

- Sim
- Não. Vai direto para o solo

QUANDO USOU ANTIBIOTICO NA PROPRIEDADE PELA ÚLTIMA VEZ?

---