

VIVIANE VIEIRA GUSMÃO

**Qualidade Microbiológica e Ocorrência de
Leveduras em Leite Pasteurizado Tipos A,
B e C**

VIVIANE VIEIRA GUSMÃO

Qualidade Microbiológica e Ocorrência de Leveduras em Leite Pasteurizado Tipos A, B e C

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

São José do Rio Preto
2005

VIVIANE VIEIRA GUSMÃO

**Qualidade Microbiológica e Ocorrência de Leveduras em
Leite Pasteurizado Tipos A, B e C**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
Presidente e Orientador

Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti
2º Examinador

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
3º Examinador

São José do Rio Preto, 04 de Março de 2005.

DADOS CURRICULARES

VIVIANE VIEIRA GUSMÃO

NASCIMENTO: 18.09.1980 - Tietê - SP

FILIAÇÃO: Henrique Gusmão Neto
Neli Vieira Gusmão

1998/2002: Curso de Graduação em Medicina Veterinária -
Universidade Estadual de Londrina - UEL - PR

2003/2004: Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos), nível de Mestrado, no Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista
(UNESP) - Campus de São José do Rio Preto - SP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

*À memória de João José Sobrinho, dos profundos olhos azuis,
que me ama, me compreende, me protege,
e sobretudo por continuar ao meu lado,
ainda que tão distante...*

...dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho, gostaria de prestar meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a sua concretização. Dentre elas, agradeço particularmente:

- ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, por todos os momentos de auxílio, dedicação, confiança, paciência e amizade;

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo incentivo e apoio financeiro.

- aos membros titulares e suplentes da banca examinadora, pelas valiosas sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho;

- à Vanerli Beloti, por ter sempre se preocupado com minha formação profissional e pessoal e especialmente por ter me mostrado o prazer de se pesquisar;

- à Tânia Maria Vinturim Gonçalves, pelo incansável auxílio, compreensão, paciência e principalmente a amizade a mim destinada;

- às companheiras Fátima Aparecida Carnicel e Maria Luiza Silva Fázio, pelo incentivo, auxílio e amizade;

- aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pelo apoio e incentivo;

- aos meus pais, Henrique e Neli, pela renúncia pessoal em favor da

minha formação pessoal e profissional, por terem sempre acreditado em mim, e especialmente, por estarem ao meu lado em todos os momentos;

- ao meu irmão, Vinícius, pela infinita e incomparável cumplicidade, amizade e amor;

- ao meu bem, Juliano, por ter compreendido os meus anseios, ter me dedicado tanto amor, carinho, atenção, compreensão, paciência e amizade, tão necessários para que eu pudesse atingir meu objetivo;

- à minha querida tia Irene, por toda compreensão, dedicação, incentivo e carinho;

- à Mara Corsini, irmã de alma, que esteve comigo nos bons e maus momentos, dedicando muito carinho, compreensão e amizade;

- à Mirlene, que com tanta ternura e apressado conquistou a minha mais sincera amizade.

- a todos os amigos, principalmente a Alida, Carol, Luciane, Ludmila, Máira, Raquel e Rosa, pelos bons momentos em que vivemos juntos;

- à minha família, em especial aos tios e primos, que sempre acreditaram e torceram por mim, e;

- finalmente, a Deus, por ter me devolvido a vida, pois sem esta nada seria possível.

*O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.*

*Isaac Newton
(1643-1727)*

RESUMO

No Brasil, o leite possui uma posição de destaque, tanto do ponto de vista social como do econômico. Devido a sua composição peculiar rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, é considerado como um excelente meio de cultura, pois constitui um ambiente adequado para o desenvolvimento de vários microrganismos. A contaminação microbiana altera a qualidade do alimento e pode agir como veículo de microrganismos patogênicos, que podem provocar o desenvolvimento de doenças infecciosas ou intoxicações alimentares, que colocam em risco a saúde do consumidor e levam à condenação do leite, além da perda da qualidade nutricional do produto. O leite é freqüentemente relacionado com surtos de toxinfecções alimentares, o que justifica a necessidade de avaliações constantes de sua qualidade garantindo a sua condição de consumo. Neste trabalho foram coletadas 23 amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, obtidas no comércio varejista da região de São José do Rio Preto - SP, que foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias aeróbias mesófilas, enumeração de bolores e leveduras, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. Das amostras de leite analisadas foram isoladas 31 culturas de leveduras, submetidas às provas taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de assimilação de diversas fontes de carbono. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que apenas 2 (8,70%) amostras apresentaram coliformes fecais acima do limite da legislação, resultado este, inferior aos diversos trabalhos encontrados em leite pasteurizado,

desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil. A presença de *Escherichia coli* foi constatada em apenas 3 amostras, sendo todas do tipo C. A de *Salmonella* spp não foi verificada em nenhuma das 23 (100,00%) analisadas, o que está de acordo com o padrão estabelecido pela legislação em vigor. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a maioria das amostras (91,30%) apresentou coliformes a 45°C \leq 4 NMP/mL, conseqüentemente foram classificadas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias”, portanto “produtos de acordo com os padrões legais vigentes”. Os resultados das provas taxonômicas demonstraram a ocorrência de 30 (96,77%) leveduras classificadas como *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* e 1 (3,23%) da var. *hansenii*. As leveduras classificadas como *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foram testadas quanto a resistência aos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em diferentes concentrações, assim como com relação à sensibilidade ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos. Verificou-se que nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, o conservante benzoato de sódio apresentou 10,00; 13,33 e 40,00% de eficácia, respectivamente, contra 6,67% do sorbato de potássio, o que demonstrou maior ação do benzoato. Em relação à sensibilidade ao tratamento térmico a 63°C por 30 minutos, 21 (70,00%) das leveduras testadas foram resistentes, ou seja, 30,00% de eficiência do processo de pasteurização.

Palavras-chave: microbiologia, leite pasteurizado, leveduras, conservantes e tratamento térmico.

ABSTRACT

In Brazil, milk has a prominent position, as much of social point of view as of economic, due to its particular composition rich in proteins, fats, carbohydrates, mineral salts and vitamins, and consequently it is considered like an excellent medium, because it's an adequate atmosphere for the development of several microorganism. The microbial contamination changes the food quality, so that it may act like vehicle of pathogenic microorganism, promoting disease or food poisoning, risking consumer's health and milk may be condemned; besides the loss of product's nutritional quality. Milk is frequently related to outbreaks of food toxoinfection, what justify the need for constant evaluations of its quality as well as the guarantee of its condition of consumption. In this study 23 samples of kinds A, B and C pasteurized milk were obtained from the retail trade of São José do Rio Preto (SP) region and were done the following microbiological analyses: counting of mesophilic aerobic bacteria, listing of molds and yeasts, determination of most probable number (MPN) of total coliforms and fecal coliforms, research of *E. coli* and *Salmonella spp.*. Thirty one yeast cultures were isolated from the samples. They were submitted to taxonomic, morphological, and physiological tests and to carbon source assimilation test. According to the results obtained, only 2 (8.70%) had fecal coliforms above the regulation limit. The percentage out of the microbiological standard (8.70%) was lower than several studies found in pasteurized milk, developed in different regions of Brazil. *E. coli* was detected in 3 samples of kind C. *Salmonella spp.* was not detected in any sample analyzed, what is in accordance with the current regulation. In conclusion, most of the samples (91.30%) had coliforms a 45°C \leq 4 MPN/mL,

consequently were labeled as “products in satisfactory sanitary conditions”, therefore “products in accordance with current legal standards”. The results of the taxonomic tests showed the occurrence of 30 (100.00%) types of yeasts classified as *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* and 1 (3.23%) classified as *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*. The yeasts classified as *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* were tested for resistance to food preservatives sodium benzoate and potassium sorbate in different concentrations, and for sensibility to thermal treatment. At the concentrations of 0.1; 0.2 and 0.4% was verified that the preservative sodium benzoate obtained 10.00; 13.33 and 40.00% of efficacy, and 6.67% of potassium sorbate. As regards to the behavior cultures in face of the thermal treatment, 21 (70.00%) of the cultures tested were resistant to treatment, consequently 30.00% of efficiency of pasteurization process.

Keywords: microbiology, pasteurized milk, yeast, food preservatives and thermal treatment.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Produção de leite e derivados no Brasil (milhões de L ou Kg).....	23
Figura 1: Produção percentual de leite e derivados no Brasil em 1997.....	24
Figura 2: Fluxograma do beneficiamento de leite pasteurizado.....	30
Tabela 2: Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises microbiológicas.....	72
Tabela 3: Freqüência relativa das variedades de leveduras isoladas.....	76
Tabela 4: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo I.....	77
Tabela 5: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo II.....	79
Tabela 6: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo III.....	80
Tabela 7: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo IV.....	81
Tabela 8: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras dos grupos V, VI, VII e VIII.....	82

Tabela 9: Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.....	85
Tabela 10: Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas.....	87
Tabela 11: Frequência relativa de leveduras resistentes ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos.....	89

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xiii
SUMÁRIO	xv
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Leite.....	21
3.2 Pasteurização	29
3.3 Qualidade Microbiológica do Leite.....	31
3.3.1 Contaminação microbiana em leite e derivados	34
3.4 Principais Microrganismos em Leite e Derivados	39
3.4.1 Coliformes totais	39
3.4.2 Coliformes fecais - <i>Escherichia coli</i>	40
3.4.3 <i>Salmonella</i> spp	42
3.4.4 Bolores e leveduras	44
3.5 Conservantes	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Obtenção das Amostras	57
4.2 Preparo das Amostras	57
4.3 Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas	58
4.4 Enumeração de Bolores e Leveduras.....	58

4.5	Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais	59
4.6	Determinação do NMP de Coliformes Fecais	59
4.7	Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	59
4.8	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	60
4.9	Isolamento das Culturas de Leveduras	60
4.10	Provas Taxonômicas	61
4.10.1	Provas morfológicas	61
4.10.2	Provas fisiológicas	62
4.10.2.1	Capacidade fermentativa	62
4.10.2.2	Desenvolvimento em diversas temperaturas	62
4.10.2.3	Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato	63
4.10.2.4	Resistência à pressão osmótica	63
4.10.2.5	Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida	64
4.10.2.6	Síntese de amido	64
4.10.3	Provas de assimilação de fontes de carbono	64
4.11	Ensaio de Resistência aos Principais Conservantes Alimentícios Encontrados na Legislação Brasileira para Derivados Lácteos	65
4.12	Prova de Sensibilidade ao Tratamento Térmico de 63°C por 30 min.	65
4.13	Técnica de “Replica-Plate”	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	Análises Microbiológicas	67
5.2	Isolamento das Culturas de Leveduras	73
5.3	Ensaio de Resistência aos Principais Conservantes Alimentícios Encontrados na Legislação Brasileira para Derivados Lácteos	83
5.3.1	Benzoato de sódio (INS - 211)	83

5.3.2	Sorbato de potássio (INS - 202)	86
5.4	Prova de Sensibilidade ao Tratamento Térmico de 63°C por 30 minutos	88
6	CONCLUSÕES.....	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o leite possui uma posição de destaque, tanto do ponto de vista social como do econômico. É importante ressaltar que a indústria de laticínios no Brasil é bastante expressiva e apresenta grande variedade de produtos derivados no mercado. Em termos individuais, o leite pasteurizado representa no país a segunda maior parte do leite beneficiado, sendo suplantado pelo leite ultrapasteurizado. O número de subprodutos produzidos a partir do leite é bastante acentuado o que demonstra que tais alimentos representam uma parcela importante em toda a economia mundial (FRANCO et al., 2000; GOULART et al., 2003).

O mercado consumidor de leite e derivados tem se tornado progressivamente mais exigente em relação à qualidade, sob diferentes aspectos. Dentre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, as características microbiológicas são importantes por fornecer informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de obtenção, processamento, armazenamento e distribuição, bem como estimar sua inocuidade e vida útil.

Devido a sua composição peculiar rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, o leite pode ser considerado como suficientemente saudável para alimentação de recém-nascidos, crianças e idosos. Os elementos nutricionais contidos no produto transformam-no em um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos o que altera a sua qualidade, além disso, pode agir como veículo de microrganismos patogênicos, o que pode levar ao aparecimento de doenças infecciosas ou intoxicações alimentares e como consequência colocar em risco a saúde do consumidor e levar à condenação do

leite. Por este motivo, deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até a ocasião de seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (BELOTI, 1996; OLIVEIRA, 2001; GOULART et al., 2003).

No Brasil, o leite *in natura* apresenta, de maneira geral, altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes, o que pode indicar uma deficiência na higiene de produção (BELOTI et al., 1999). A venda de leite e produtos derivados direta do produtor ao consumidor sem qualquer tratamento prévio expõe a população ao risco de doenças (OLIVEIRA; FONSECA; GERMANO, 1999).

Devido à importância de se oferecer um produto isento de riscos a saúde humana é imprescindível submeter o leite a um tratamento térmico específico, ou seja, a pasteurização, com o propósito de destruir totalmente a biota patogênica sem prejuízo das características naturais do leite. A pasteurização consiste no aquecimento do produto a uma certa temperatura, durante um tempo determinado com resfriamento logo depois, o que assegura a distribuição de um produto isento de riscos maiores à população, o mesmo se aplicando para todos os seus derivados (OLIVEIRA; FONSECA; GERMANO, 1999; BEHMER, 1999).

Diversos autores encontraram, em várias regiões do Brasil, amostras de leite fora do padrão, o que justifica a necessidade de constantes levantamentos microbiológicos nestes alimentos, com a finalidade de detecção de fraudes e contaminações desses produtos, com o objetivo de garantir a qualidade, minimizar os riscos e conseqüências para a Saúde Pública (MURATA et al., 1998).

2 OBJETIVOS

Realizar, nas diferentes amostras de leite pasteurizado, obtidas do comércio varejista, as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias aeróbias mesófilas, enumeração de bolores e leveduras, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais (termotolerantes), pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp;

Identificar as diversas leveduras isoladas deste tipo de alimento;

Verificar a resistência das mesmas em relação aos principais conservantes alimentícios constantes na legislação brasileira para derivados lácteos;

Investigar a sensibilidade dessas leveduras frente ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite

Segundo a Instrução Normativa n°. 51, o leite é definido como, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Se a obtenção for feita sob circunstâncias naturais, o leite se apresentará como uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado (BEHMER, 1999; FRANCO et al., 2000).

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza, composto aproximadamente por 87,0% de água, 3,6% de gordura, 3,6% de proteínas, 4,5% de lactose e 0,8% de vitaminas e sais minerais, sendo que a porcentagem de cada elemento pode variar conforme a espécie, raça, individualidade, alimentação, tempo de gestação, intervalos entre ordenhas, “stress” ou ação de drogas medicamentosas (BEHMER, 1999). Desse modo, o leite possui um valor nutritivo considerado muito importante na alimentação humana, como relatado em vários trabalhos (FURTADO, 1981; NADER FILHO, 1996; SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 1998).

O leite, por ser um alimento altamente nutritivo, está presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais, principalmente na dieta de crianças e idosos. Desta forma, a expectativa dos consumidores é que o leite seja mais seguro e sadio que os demais alimentos, sendo a isenção de

resíduos químicos e microbiológicos considerada um importante parâmetro de segurança (GOULART et al., 2003).

Contudo esses elementos nutricionais contidos no leite transformam-no em um ótimo substrato para o desenvolvimento de microrganismos, o que pode aumentar o risco de veiculação de microrganismos patogênicos e deteriorantes (FRANCO et al., 2000; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Por essa razão, o leite tem recebido grande atenção por parte de pesquisadores e autoridades ligados às áreas de saúde e de tecnologia de alimentos (MACIEL et al., 2003).

O Brasil tem na indústria leiteira uma fonte importante de rendimentos. De acordo com a Confederação Nacional de Agricultura, embora o leite tenha sido o único produto da pecuária brasileira a registrar queda do faturamento bruto no primeiro quadrimestre de 2002, com uma redução de R\$ 400 milhões em relação ao mesmo período de 2001, o Valor Bruto da Produção (VBP) alcançou a marca de R\$ 6,3 bilhões (GERMANO; GERMANO, 2001).

Para se ter uma idéia da produção de leite no Brasil, em litros, em 2001 foram produzidos 20,85 bilhões; e, em 2002, 21,24 bilhões. Segundo a Embrapa, a queda do VBP deu-se devido à diminuição dos preços praticados ao produtor, pois o pecuarista de leite é o elo mais fraco da cadeia produtiva e tem sido penalizado com a atual política de preços do setor. Dentre as muitas soluções apontadas para esta problemática destaca-se a que considera necessário o aumento do consumo interno, o que garantiria a estabilidade dos preços. O consumo de leite no Brasil está abaixo dos índices preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o incentivo à exportação seria outra medida importante, contudo há necessidade que o produto brasileiro ganhe em qualidade para se tornar aceitável e competitivo, sobretudo nos

países da União Européia, Estados Unidos e México (GERMANO; GERMANO, 2001).

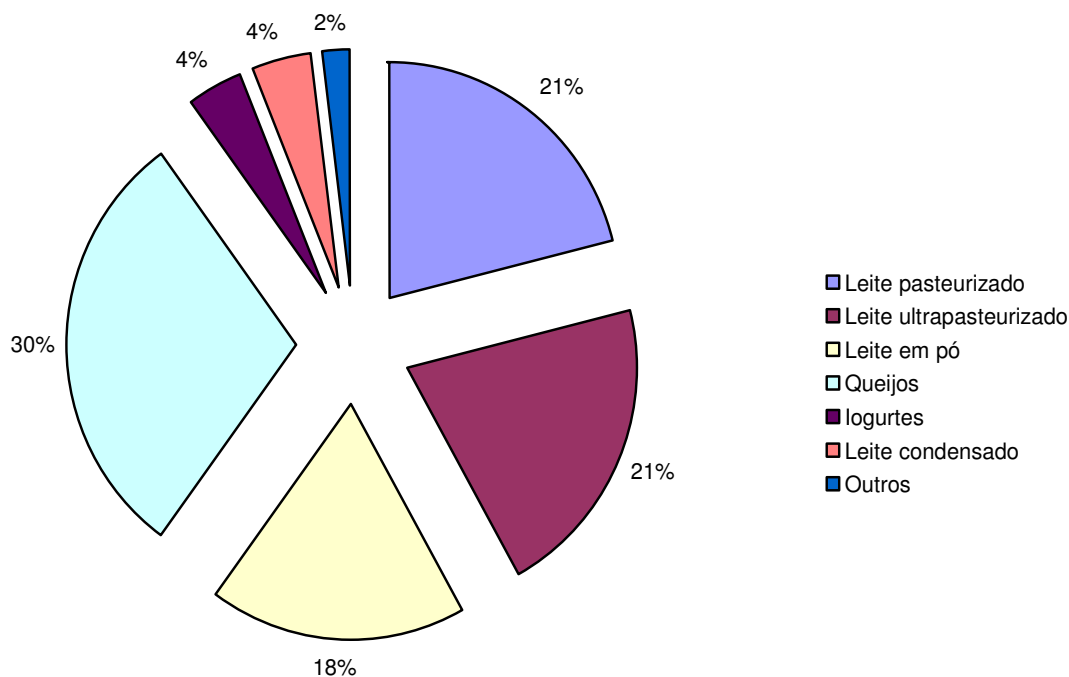
No Brasil, a indústria de laticínios é bastante expressiva, e apresenta um elevado nível de desenvolvimento tecnológico, o que pode ser demonstrado pela grande variedade de produtos derivados existentes no mercado. Nos últimos anos, houve um notável aumento da produção de leites ultrapasteurizados (UHT), resultante da crescente demanda por produtos de maior praticidade, sobretudo em grandes cidades, conforme se observa na Tabela 1. Deste modo, em termos individuais, o leite pasteurizado, subdividido nos tipos A, B e C, passou a representar a segunda maior parte do leite beneficiado. Entretanto, deve-se destacar que cerca de 58% do leite produzido no país é destinado à elaboração de produtos industrializados, principalmente de queijo e leite em pó, conforme se observa na Figura 1 (OLIVEIRA; FONSECA; GERMANO, 1999; FRANCO et al., 2000; GERMANO; GERMANO, 2001).

Tabela 1: Produção de leite e derivados no Brasil (milhões de L ou Kg).

Produto	1990	1998
Leite ordenhado	13.885	19.247
Leite pasteurizado	4.666	2.745
Leite ultrapasteurizado	168	3.100
Leite em pó	231	303
logurtes	206	470
Queijos	198	330
Manteiga	56	74
Requeijão	18	36

Fonte: Anuário MILKBIZZ, 1999

Destino do leite sob Inspeção Federal no Brasil - 1997



Fonte: Anuário MILKBIZZ, 1999

Figura 1: Produção percentual de leite e derivados no Brasil em 1997.

Ao contrário do que muitos pensam, o que classifica o leite não é a quantidade de gordura e sim as condições de obtenção, beneficiamento e a colocação no ponto de venda. O Serviço de Inspeção Federal (SIF), órgão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento regulamenta as normas para a classificação do leite (BRASIL, 2002).

O leite tipo A é aquele pasteurizado em indústria que fica na própria fazenda ou sítio, sendo mantido resfriado até o momento da pasteurização, que é imediata e com ordenha mecânica. O tipo B é produzido em sistema de ordenha

preferencialmente mecânica, devendo ser transportado e resfriado em no máximo 6 horas após a ordenha. O tipo C é produzido por meio de ordenha manual ou mecânica e deve ser mantido resfriado.

Conforme descrito na Instrução Normativa nº. 51 o leite tipo C possui prazo de vigência máximo de 01/07/2005 para as Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e até 01/07/2007 para as Regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2002).

O leite utilizado na elaboração de derivados, incluindo o leite UHT, segue as mesmas normas estabelecidas para o leite tipo C sendo: produzido em fazendas leiteiras; recolhido por caminhões; levado até postos de refrigeração; e, finalmente transportado até a usina de beneficiamento. Esta cadeia tem sido utilizada por varias décadas e constitui, atualmente, a principal forma de captação de leite pelas industrias. Entretanto, este modelo necessita de uma profunda revisão, uma vez que, com a implementação de programas de qualidade total, as empresas deverão exigir, cada vez mais, melhor qualidade do leite *in natura*. Uma das estratégias mais aceita é a utilização de um incentivo ao produtor: o estabelecimento de preços variáveis em função da qualidade do leite, a exemplo do que já ocorre com relação ao pagamento diferenciado pelo teor de gordura do leite (BRASIL, 2002).

Nos últimos anos, tem sido crescente a preocupação dos agentes de inspeção sanitária no que diz respeito às condições higiênicas do leite distribuído ao consumo. Tal situação é decorrente da constatação de que a qualidade do leite, muitas vezes, não atende aos padrões estabelecidos pela legislação, além da possibilidade de transmissão de infecções e/ou toxinfecções de origem alimentar (BALLOD; BRAMORSKI, 1990).

O mercado consumidor de leite e derivados tem se tornado progressivamente mais exigente em relação à qualidade, sob diferentes aspectos. Dentre os vários parâmetros que determinam a qualidade de um alimento, as características microbiológicas são importantes por fornecer informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de obtenção, processamento, armazenamento e distribuição, bem como estimar sua inocuidade e vida útil (MURATA et al., 1998).

O leite é um produto de importância nacional dadas as suas características alimentares, o que o configura como um produto de destaque, tanto do ponto de vista social como do econômico. É importante ressaltar que a cadeia produtiva de lácteos no Brasil vem enfrentando mudanças importantes desde a segunda metade da década de 80, que transformaram as condições de produção, lançando novos desafios em busca de aumento da eficiência produtiva (OLIVEIRA, 1999).

Os profissionais do setor de leite e derivados andam atentos às mudanças de normas previstas com a Instrução Normativa nº. 51 que aprova novos regulamentos para a produção de leite, como resultado da Portaria 056. Esta legislação estabeleceu critérios mais rígidos para a produção, identidade e qualidade dos leites tipo A, B e C, além dos leites pasteurizado e cru (GERMANO, GERMANO, 2001).

Algumas das principais novidades são: a exigência de resfriamento do leite na fazenda, seu transporte a granel da fazenda até a plataforma, a exigência de que a distribuição do leite pasteurizado seja feita a temperatura máxima de 4°C e distribuição do produto em veículos com carrocerias providas de isolamento térmico, dotadas de unidade frigorífica, para chegar ao ponto de venda com temperatura

nunca superior a 7°C. Segundo Marion Ferreira Gomes, assessor da Divisão de Normas Técnicas do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), as novas medidas farão com que o leite brasileiro seja visto com maior confiabilidade, tanto no mercado externo como no interno (BALINT, 2002; BRASIL, 2002).

A prática da estocagem do leite cru sob refrigeração na fonte de produção, apesar de empregada desde a década de 50 em países desenvolvidos, teve o início de sua implementação no Brasil somente a partir da década de 90 e foi regulamentada no ano de 2002 (PINTO et al., 2003). Esta prática tem reduzido a presença de bactérias aeróbias mesófilas. Entretanto, este processo também pode permitir um desenvolvimento de bactérias psicotróficas principalmente quando a obtenção do leite não é feita de modo higiênico (CELESTINO, 1996).

A presença de microrganismos psicotróficos pode ocasionar diversos problemas tecnológicos e econômicos. Aspectos como aparência, odor, sabor e vida útil nas prateleiras refrigeradas podem ser modificados. Além disso, a qualidade dos produtos lácteos pode ser afetada pela ação das enzimas secretadas pelos microrganismos psicotróficos antes do processamento do leite. Apesar da maioria das bactérias psicotróficas serem destruídas pela pasteurização, muitas enzimas produzidas por estes microrganismos, como as proteases e/ou lipases, são termo-resistentes, resistindo ao processo de pasteurização e ultrapasteurização. Os principais efeitos destas enzimas manifestam-se na forma de alterações no sabor dos produtos lácteos, as enzimas proteolíticas geram um sabor amargo no leite armazenado e seus derivados, enquanto que as enzimas lipolíticas predis põem à ocorrência de sabor rançoso, em função da quebra dos ácidos graxos de cadeia

curta (GOMES; 1988; MURPHY; SAEMAN; GALTON, 1989; RENEAU; PACKARD, 1991).

A cadeia produtiva do leite compreende diversas fases, desde a origem do leite ainda nas propriedades rurais, até sua chegada ao comércio varejista como produto industrializado, na forma de leite pasteurizado, ou, como produto derivado. Embora todas as fases sejam importantes para a preservação da qualidade do leite, a de maior relevância é a da produção e conseqüentemente do leite *in natura* (GERMANO; GERMANO, 2001).

No Brasil, de um modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, e em conseqüência, apresenta elevado número de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico. Em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiênicos para evitar a contaminação devem ser iniciados desde a ordenha e continuados até a obtenção do produto final (RIEDEL, 1992).

Fatores como a qualidade do ar dos estábulos, sanidade dos ordenhadores e dos animais e principalmente, utensílios não perfeitamente higienizados, também contribuem, de modo decisivo, para o estado microbiológico do leite (SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 1998). A obtenção e a armazenagem do leite fresco relacionam-se diretamente com a qualidade microbiológica do produto o que pode determinar, inclusive, o seu prazo de vida útil (HARDING, 1995).

Na indústria de laticínios, os procedimentos inadequados de higiene, limpeza e de sanitização dos equipamentos e a microbiota contaminante do ambiente de processamento são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos. A presença de microrganismos acumulados na forma de biofilmes em superfícies de

contato com os alimentos pode levar a contaminações antes e após o processamento, o que pode ocasionar deteriorações ou enfermidades de origem alimentar (GOULART et al., 2003).

A venda de leite e produtos derivados direta do produtor ao consumidor, sem qualquer tratamento prévio, notadamente a pasteurização, expõe a população ao risco de doenças como tuberculose e brucelose entre outras, além de não assegurar a distribuição de um produto íntegro (BADINI; NADER FILHO; AMARAL, 1996; OLIVEIRA; FONSECA; GERMANO, 1999).

3.2 Pasteurização

Entende-se por pasteurização o emprego conveniente do calor com a finalidade de destruir totalmente a biota patogênica sem causar alteração sensível da constituição física e no equilíbrio químico do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades sensoriais normais (BRASIL, 2002). Segundo Chiappini, Franco e Oliveira (1995) este processamento é efetivo contra os microrganismos, porém não neutraliza as enterotoxinas eventualmente presentes (Figura 2).

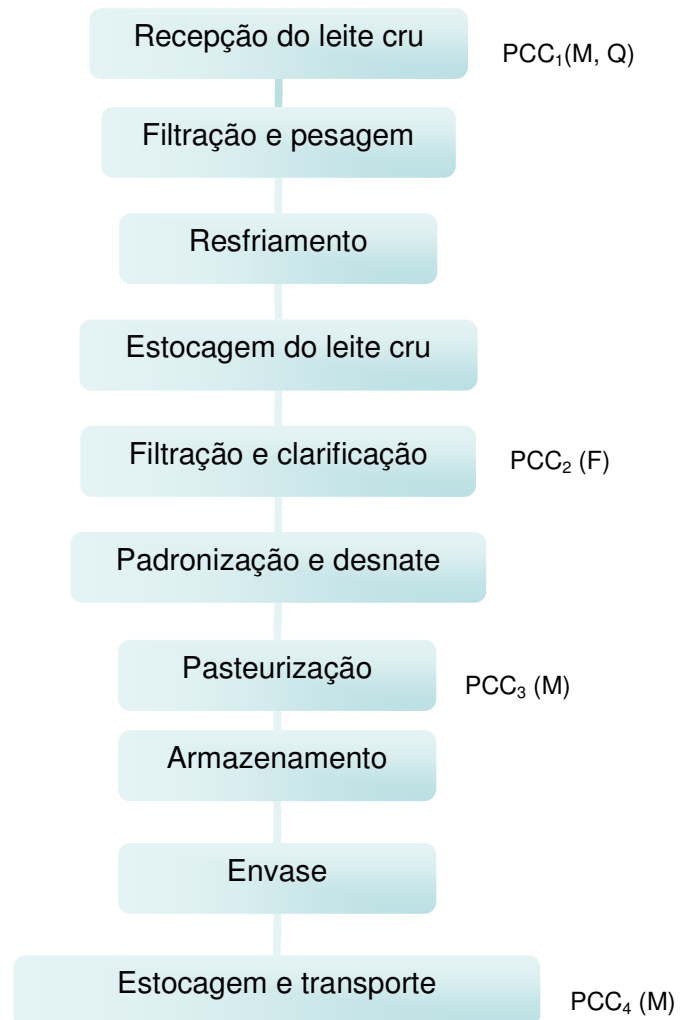


Figura 2: Fluxograma do beneficiamento de leite pasteurizado.

Legenda: PCC: Ponto crítico de controle;
M: Microbiológico;
Q: Químico;
F: Físico

O processo de pasteurização permitido pela legislação para o leite consiste no aquecimento do produto em camada laminar a 72-75°C por 15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se de resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2002).

Imediatamente após a pasteurização o produto assim processado deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase (BRASIL, 2002). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o leite pasteurizado possui qualidade microbiológica satisfatória quando está isento de bactérias do gênero *Salmonella*, ausência em 25 mL do produto, e quando o número de coliformes a 45°C não excede a 4 por mL (BRASIL, 2001). Quando esses microrganismos estão presentes no produto final, indicam contaminação após o processamento ou tratamento térmico insuficiente, pois estes são sensíveis às temperaturas de pasteurização do leite.

3.3 Qualidade Microbiológica do Leite

A qualidade do leite pasteurizado está intimamente relacionada com a qualidade do leite cru, a qual por sua vez é diretamente proporcional ao grau de contaminação inicial, e com o tempo e temperatura de armazenamento desde a ordenha até o momento do processamento, portanto, a qualidade microbiológica do

leite pasteurizado é dependente da qualidade da matéria-prima e das boas práticas de fabricação (BELOTI et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Em geral, quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta for a temperatura na qual o leite permanece, menor será o seu tempo de conservação, de uma forma geral, a qualidade do leite está associada com a carga microbiana presente neste produto (MUTUKUMIRA et al., 1996).

Segundo Fonseca e Santos (2000), a qualidade microbiológica pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho e das condições gerais de manejo e higiene adotadas na propriedade.

Gounot (1986) e Silva (1991) observaram que os microrganismos que normalmente contaminam o leite se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura. Essa microbiota inclui, além dos mesófilos, microrganismos termófilos e psicrotróficos.

Os mesófilos constituem um grupo importante por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes, e por se desenvolverem a temperaturas entre 20 e 45°C, com a temperatura ótima de multiplicação em torno de 30 a 40°C (JAY, 2000). Esses microrganismos também são importantes devido a termorresistência apresentada por vários gêneros.

As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de desenvolvimento situa-se entre 55 a 65°C, como máximo, para algumas espécies, podendo atingir 75 a 90°C e o mínimo em torno de 35°C (ICMSF, 1980). O leite cru normalmente contém poucas bactérias termófilas, embora em número suficiente para se desenvolverem no leite mantido a temperaturas elevadas, acarretando grande número desses microrganismos no produto. Essas bactérias

constituem problema no leite pasteurizado quando algumas porções são mantidas, por algum tempo, entre 50 a 70°C.

O termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo de século. Outros sinônimos são usados, tais como psicrofílicos facultativos, tolerantes ao frio e psicrotolerantes (GOUNOT, 1986). Segundo Collins (1981), de acordo com as normas da International Dairy Federation, os psicrotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem se desenvolver à 7°C ou menos, independentemente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos (1 a 4 semanas). O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração, desde a propriedade até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo. Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas restritamente mesófilas está sendo incluído também entre os psicrotróficos.

A elevada quantidade de bactérias mesófilas em alimentos pode indicar que os mesmos foram preparados com matérias-primas altamente contaminadas, que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário e ainda, que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura (LEITE JUNIOR et al., 2000).

A presença de leveduras em alimentos, como o leite, pode ser relacionada à manipulação inadequada, contato com equipamentos, superfícies e utensílios não corretamente sanificados, ou provenientes da atmosfera ambiental (FURTADO, 1998).

Bactérias, bolores e leveduras apresentam exigências nutricionais bastante variadas mas, usualmente, encontram nos alimentos condições favoráveis para a sua multiplicação. Em condições ideais, as bactérias são os microrganismos com maior velocidade de desenvolvimento, podendo apresentar um tempo de geração ao redor de 20 minutos. Assim, mesmo nos casos em que a contaminação inicial de um alimento é pequena, contagens elevadas poderão ser alcançadas em um curto espaço de tempo. No entanto, a velocidade de multiplicação de uma bactéria não é constante, havendo variações acentuadas, dependentes da fase de desenvolvimento em que se encontra e das condições ambientais.

As leveduras possuem um tempo de geração de 2 a 3 horas, portanto, maior do que o das bactérias. Os bolores, multiplicam-se mais lentamente que as leveduras. Desta forma, em um alimento que forneça condições para o desenvolvimento dos três grupos de microrganismos, as bactérias dominarão e, por conseguinte serão a causa da deterioração do alimento. Por outro lado, leveduras e bolores serão importantes na deterioração de alimentos que não ofereçam condições ao rápido desenvolvimento das bactérias.

3.3.1 Contaminação microbiana em leite e derivados

A contaminação do leite altera a sua qualidade e tal alimento pode agir como veículo de microrganismos patogênicos, o que leva ao desenvolvimento de doenças infecciosas ou intoxicações alimentares, conseqüentemente coloca em risco a saúde do consumidor e pode levar à condenação do leite (ADESIYUN;

WEBB; RAHAMAN, 1995; BELOTI, 1996). As enfermidades causadas pela ingestão de alimentos, como o leite e derivados, constituem um sério problema, principalmente em países em desenvolvimento (COSTA et al., 2003).

A pasteurização ineficiente, higiene deficiente na ordenha e no processo de fabricação são determinantes para a contaminação do produto e as más condições de transporte, armazenamento e manipulação deste no comércio varejista, favorecem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes pré-existentes (RABELO et al., 2001).

Valle (1995) ressalta que a matéria-prima, equipamentos, embalagens e manuseio são as principais fontes de contaminação na indústria de leite e produtos lácteos. Assim, sendo o leite um produto altamente perecível, torna-se um transmissor de microrganismos e infecções alimentares em potencial e pode comprometer os produtos obtidos com riscos inclusive à Saúde Pública.

A elevada proporção de casos de mastite no rebanho leiteiro, ao lado da deficiência na higiene da ordenha constitui uma das principais causas da produção de leite com elevados teores de patógenos (GERMANO; GERMANO, 1995).

Hoffmann, Garcia-Cruz e Vinturim (1994) e Garcia-Cruz, Hoffmann e Vinturim (1994) em pesquisas sobre a qualidade microbiológica do leite tipo C, verificaram que o mesmo por não apresentar qualidade higiênico-sanitária satisfatória poderá ser veículo de contaminação bacteriana, principalmente se não for adequadamente pasteurizado.

Na microbiota contaminante do leite cru refrigerado predominam bactérias Gram negativas incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e membros

da família Enterobacteriaceae (URAZ; CITAK, 1998; ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000). Alguns destes gêneros constituem os principais microrganismos psicrotróficos, cujas enzimas termoestáveis são importantes por resistirem à pasteurização e ultrapasteurização. Algumas toxinas também são termoestáveis e causam os sintomas sem a presença do agente, que é sensível aos tratamentos térmicos. Estas enzimas são pré-formadas pelo agente no alimento, como no caso do *S. aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo Windyga (1996), foram analisadas aproximadamente 250.000 amostras de alimentos por ano, produzidos na Polônia, para a verificação da qualidade microbiológica. Desde 1991, a proporção de produtos lácteos insatisfatórios variou de 22,6 para 28,0%, enquanto que os valores de coliformes variaram de 20,6 para 26,0%. Os principais contaminantes encontrados foram *Clostridium botulinum*, enterotoxinas bacterianas, *Salmonella* e fungos.

Em estudo realizado por Wessels, Jooste e Mostert (1998), 45% de 65 amostras de leite cru, 44% de 20 amostras de sorvete, 40% de 5 amostras de nata, 25% de 8 amostras de queijo e 19% de 32 amostras de iogurte foram positivas para coliformes, com contagem de 780/mL; 20,7/g; 161/mL; 71,4/g e 95,1/mL, respectivamente, quando estudadas num período de 6 meses na região de Witwatersrand, África do Sul.

Segundo Rajmani, Garg e Yadav (1989), dentre os principais microrganismos capazes de ocasionar toxinfecções alimentares, podem ser citados o *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina e a *Salmonella* spp. Os autores analisaram derivados de leite (20 amostras de cada produto) adquiridos do mercado de Udaipur-Índia. A contagem média de bactérias aeróbias foi de 53.460.000 UFC/mL, a contagem média de estafilococos foi de 63.500 UFC/mL, sendo 31.500

UFC/mL de estafilococos coagulase positivos que foram encontrados em 100% das amostras.

Catão e Ceballos (2001) investigaram a qualidade do leite recém pasteurizado e embalado de uma usina de beneficiamento em Campina Grande-PB. Foi pesquisada a presença de *Listeria* spp e sua diversidade de espécies, os níveis de coliformes totais e fecais e *Escherichia coli*. Os autores analisaram 75 amostras, sendo 45 de leite cru, 15 de recém-pasteurizado e 15 de leite embalado. Os resultados foram reunidos em dois grupos segundo o período de monitoramento: antes e após as mudanças no processo de higienização da usina. Foi evidenciada uma elevada contaminação nas amostras de leite cru nas duas épocas. Na primeira, março/abril de 1998, todas as amostras de leite beneficiado estiveram fora dos padrões da legislação vigente para coliformes fecais, na segunda, maio/agosto de 1998, houve acentuada redução dos níveis destas bactérias indicadoras, 33,3% das recém-pasteurizadas estavam fora dos padrões para coliformes fecais. Das amostras embaladas 44,4% apresentaram coliformes fecais fora do padrão, 33 (73,3%) das amostras de leite cru e 9 (30,0%) de pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* spp, sendo identificadas *L. monocytogenes* em 17 (51,5%) de leite cru e em 9 (100,0%) de beneficiado, sendo 4 recém-pasteurizados e 5 embalados.

Foi avaliada a qualidade microbiológica e higiênico-sanitária do leite pasteurizado tipo A, comercializado na cidade de Descalvado-SP. Durante o período de agosto de 2000 a janeiro de 2001, 50 amostras foram coletadas e submetidas às análises de pesquisa de *Salmonella*, contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas e NMP de coliformes totais e fecais. Destas nenhuma apresentou

resultado fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Saúde (TESSARI; CARDOSO, 2002).

Foram analisadas, de 1995 a 1998, 390 amostras de leite, sendo 123 do tipo C, 86 do tipo B e 181 de Integral, provenientes de 16 mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto-SP. Do total de amostras estudadas, observou-se que estavam em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos, estabelecidos pela legislação em vigor; 15,5 e 32,5% do tipo C; 28,6 e 37,2% do leite tipo B e 30,9 e 31,0% do tipo Integral, respectivamente (GARRIDO et al., 2001).

3.4 Principais Microrganismos em Leite e Derivados

3.4.1 Coliformes totais

Coliformes são microrganismos que incluem todas as bactérias Gram negativas aeróbias e facultativamente anaeróbias, não formadoras de esporos, com capacidade de fermentar lactose com produção de ácido e gás a 32-37°C em 24-48 horas em meio sólido ou líquido. São microrganismos largamente distribuídos na natureza, encontrados em grande número no trato intestinal de diversos animais e insetos e no suprimento de água e alimentos oferecidos aos animais durante a ordenha. Desta forma, não é difícil entender as várias possibilidades para que o leite seja contaminado por coliformes. Os coliformes são capazes de se multiplicar rapidamente no leite e em grande número determinam sua rápida deterioração (SANTOS; BERGMANN, 2003).

Os coliformes, considerados microrganismos indicadores, são utilizados na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos, devido a maior praticidade na sua detecção em comparação aos microrganismos patogênicos. O grupo dos coliformes totais abrange um número de espécies de enterobactérias, incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Quando presentes em um alimento, os coliformes podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável

presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os testes para coliformes são geralmente bastante seletivos, permitindo detectá-los ainda quando constituem uma porcentagem muito pequena da biota do alimento. Frequentemente, os coliformes do leite têm origem em utensílios mal desinfetados, tais como baldes, tanques e máquinas de ordenha. Como estes microrganismos são facilmente destruídos no processo de pasteurização, a determinação de coliformes torna-se de grande importância para o controle do processo.

3.4.2 Coliformes fecais - *Escherichia coli*

Os coliformes fecais são reconhecidos como indicadores de contaminação fecal, ou seja, condições higiênico-sanitárias inadequadas. No entanto, o único gênero que realmente indica contaminação fecal é a *Escherichia coli*, que tem como seu habitat primário o trato intestinal do homem e de outros animais, sendo assim o mais importante indicador de contaminação fecal, ou melhor, aquele que quando presente garante o contato direto do alimento com as fezes (GUERREIRO, 1984). A *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo não esporulado, anaeróbio facultativo e pode causar alterações indesejáveis nos alimentos, além de várias linhagens serem patogênicas para o homem e para animais (HOBBS; ROBERTS, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O uso da bactéria *Escherichia coli* como um indicador de contaminação de origem fecal, foi proposto em 1892, uma vez que esse microrganismo é encontrado no conteúdo intestinal do homem e animais de sangue quente (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A presença dos coliformes fecais, com ênfase da *E. coli*, tem sido relatada em leite e derivados. Por serem bactérias termossensíveis, sua presença no produto pasteurizado indicará contaminação posterior à pasteurização ou então tratamento térmico deficiente (VESSONI PENNA; BARUFFALDI; COLOMBO, 1986).

A *Escherichia coli* enterotoxigênica é causa comum da “diarréia de viajante”. Algumas linhagens ao serem ingeridas com os alimentos, desenvolvem-se no intestino e produzem toxinas que originam hipersecreção no intestino delgado, a luz intestinal é distendida pelo líquido, provocando hipermotilidade e diarréia que duram alguns dias (1 a 3). O período de incubação é de 24 a 72 horas e podem ocorrer episódios de vômito e diarréia, embora não exista febre (JAWETZ; MELNICK; ADEBERGS, 2000).

Em conseqüência da freqüente precariedade das condições higiênico-sanitárias na produção de alimentos é comum a presença de coliformes, inclusive da *Escherichia coli* (FEITOSA, 1985). A presença destes microrganismos em índices condenatórios, além de mostrar as más condições higiênicas, evidencia, também, a possibilidade do leite e seus derivados veicular outros microrganismos patogênicos ao homem (PEREIRA et al., 1999).

3.4.3 *Salmonella* spp

A *Salmonella* é um bacilo não esporulado, Gram negativo e anaeróbio facultativo. Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente aves e suínos (FRANCO; LANDGRAF, 2003). As salmonelas se desenvolvem entre 5 e 47°C, pH 4,5 e 9,0 (EKPERIGIN; NACARAJA, 1998).

A salmonelose é uma doença que atinge o homem e praticamente todos os animais de sangue quente, e há uma certa especificidade de alguns sorotipos de salmonela para os animais. Foram descritos mais de 2.000 sorotipos de salmonelas, geralmente associados aos alimentos e transmissíveis ao homem (PINTO et al., 2003).

Nas estatísticas sanitárias da Organização Mundial de Saúde (OMS) a salmonelose está dividida em dois grupos: as febres tifóideas ou paratifóideas, septicemia sem enterite ou portador sadio e as infecções entéricas (HOBBS; ROBERTS, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2003; PINTO et al., 2003).

A *Salmonella*, como um importante agente causador de toxinfecções alimentares, produz um quadro clínico caracterizado por náuseas, vômitos, febre, cefaléia, diarreia, dores abdominais e mialgias (SOLARI, 1986; HOBBS; ROBERTS, 1999; FRANCO; LANDGRAF, 2003). Os sintomas da enfermidade surgem dentro de 6 a 36 horas após a ingestão do alimento contaminado e pode durar de 1 a 7 dias ou mais (HOBBS; ROBERTS, 1999).

A *Salmonella*, quando ingerida, se estabelece no trato gastrintestinal, principalmente no íleo. O animal se torna um portador sadio ou a infecção se instala. Quando localizada, a doença assume a forma crônica ou entérica e quando generalizada, a forma aguda, sistêmica ou septicêmica, a sintomatologia pode variar de acordo com os órgãos atingidos. Quando absorvida pela mucosa, promove injúrias com liberação de endotoxinas e outras substâncias tóxicas, responsáveis pelo aparecimento de diarreia pútrida acompanhada de febre, anorexia, depressão e choque. A entrada da bactéria no organismo por meio dos linfonodos mesentéricos e corrente sanguínea, causa lesões embólicas e a presença intracelular da salmonela em diversos órgãos, resulta em lesões respiratórias, meningite, aborto e morte súbita (PINTO et al., 2003).

As toxinfecções alimentares por salmonelas freqüentemente são veiculadas pelas carnes, aves, ovos, leite e derivados não tratados termicamente (ELEY, 1994).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* spp são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal. Nos casos onde estão envolvidos produtos de laticínios, comumente há ligação com o consumo de leite cru, pasteurizado de forma inadequada e queijos (JAY, 2000).

Jay (2000) cita também os dois maiores surtos de salmonelose registrados nos Estados Unidos, que ocorreram em circunstâncias incomuns. O primeiro e maior ocorreu em 1994 e envolveu mais de 224.000 pessoas, devido à *S. enteritidis*, atingindo 41 estados, o veículo de transmissão foi sorvete produzido com leite transportado num caminhão tanque, que previamente tinha sido carregado com

ovo líquido. O segundo ocorreu em 1995 e envolveu cerca de 200.000 pessoas, devido à *S. typhimurium*, proveniente de leite semi-desnatado.

3.4.4 Bolores e leveduras

Os bolores são formados por filamentos denominados hifas, que em conjunto formam o micélio, sendo este responsável pelo aspecto característico das suas colônias. Estas podem apresentar aspecto cotonoso, serem secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas e podem se apresentar com variadas colorações. Por serem aeróbios, na maioria das vezes, o desenvolvimento nos alimentos limita-se à superfície em contato com o ar (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os bolores podem se apresentar sob a forma patogênica ou não. A primeira provoca doenças em vegetais e animais, enquanto a segunda tem ação na transformação da matéria orgânica do solo, deterioração de alimentos e outros produtos, além de serem agentes de processamentos industriais (EVANGELISTA, 2001).

De acordo com Franco e Landgraf (2003) a produção de micotoxinas por bolores pode tornar-se um perigo à Saúde Pública.

Sob o ponto de vista econômico, as leveduras são microrganismos de grande importância e têm sido utilizadas por milhares de anos para a produção de uma grande variedade de alimentos como pães, vinhos, cervejas, kefir, além da produção de etanol e de substâncias para a indústria farmacêutica (WYDER, 2001).

Em 1680, foi descoberta a existência de leveduras por Antonie van Leeuwenhoek. Durante a segunda metade do século XIX, o bioquímico francês

Louis Pasteur mostrou que leveduras são responsáveis pela conversão de açúcar em etanol e dióxido de carbono. No momento, aproximadamente 700 espécies de leveduras são conhecidas, mas somente algumas são freqüentemente usadas (WYDER, 2001).

Somente com o desenvolvimento da técnica de isolamento de culturas puras em meio sólido por Robert Koch tornou-se possível selecionar espécies de leveduras com características fermentativas (WYDER, 2001). No entanto algumas leveduras possuem ação deteriorante, devido a sua habilidade de se desenvolver sob baixas temperaturas e valores baixos de pH e a sua resistência a estresse físico-químico e atividades metabólicas (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

Segundo Furtado (1998) leveduras são fungos que apresentam formas variadas, esféricas, ovóides, piriformes e cilíndricas. Algumas apresentam grânulos de gordura, albuminóides ou amiláceos. Sua reprodução, na maioria dos casos, é assexual, por brotamento. As formas sexuais são raras, porém, quando existem, formam ascósporos na maioria das espécies. Elas podem ser subdivididas em Eumycetos, que por sua vez congregam duas classes: Ascomycetos (leveduras verdadeiras) e Deuteromycetos (falsas leveduras).

Estes microrganismos são de alta importância na conservação dos alimentos, por serem agentes de deterioração dos mesmos, nos quais apresentam condições ótimas de desenvolvimento. É interessante observar que, dependendo do tipo de alimento e suas características básicas, uma mesma espécie de levedura pode ser considerada benéfica e essencial ao processo tecnológico, ao passo que, em outro produto, ela pode se constituir em agente de deterioração. O exemplo clássico deste comportamento variável é dado pelo *Sacharomyces cerevisiae*, levedura fundamental na fermentação alcoólica de mostos, visando a produção de

vinhos, ou na fermentação de caldo de cana ou melaço dissolvido para a produção de álcool etílico, por outro lado, esta mesma espécie pode ser um importante deteriorador de sucos de frutas ou, mesmo, de bebidas carbonatadas (FURTADO, 1998).

De um modo geral, as leveduras exigem menor umidade que a maioria das bactérias e maior que a maioria dos bolores. A temperatura ideal para a sua multiplicação varia entre 25 e 30°C e o pH ácido favorece o desenvolvimento. Multiplicam-se melhor quando estão em aerobiose, mas os tipos fermentativos desenvolvem-se bem também em anaerobiose. Os açúcares são a melhor fonte de energia (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Em geral, colônias de leveduras têm consistência mole, são opacas e de cor creme, de 1-3 mm de tamanho. Como as colônias e a morfologia microscópica de muitas espécies de leveduras são semelhantes entre si, as espécies são identificadas com base em testes bioquímicos e em algumas diferenças morfológicas significativas. As produtoras de pigmentos, provocam o aparecimento das seguintes cores: branco, creme, rosa ou marrom (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As características bioquímicas e fisiológicas das leveduras estão intimamente relacionadas ao seu poder deteriorador e às principais transformações que acarretam nos alimentos. Conforme anteriormente mencionado, são os carboidratos e especialmente os açúcares, os substratos preferenciais da maioria das espécies, daí a razão de terem como principal habitat a superfície de frutos e vegetais em geral, a atividade das leveduras sobre proteínas e outras substâncias nitrogenadas, é desprezível em termos de deterioração, sendo também

relativamente poucos os gêneros contendo espécies lipolíticas, incluídas principalmente em *Candida* e *Torulopsis* (FURTADO, 1998).

A utilização dos carboidratos pode ocorrer por meio de um processo metabólico sob anaerobiose, também denominado fermentação ou, então, pela atividade em aerobiose, num processo respiratório ou oxidativo em que, em taxonomia, também é descrito como assimilativo. É evidente que esta atividade metabólica está estreitamente relacionada à capacidade de desenvolvimento das leveduras, na presença ou na ausência de oxigênio, sendo a fermentação restrita às espécies anaeróbias facultativas e a respiração ocorrendo tanto nestas como nas aeróbias estritas (FURTADO, 1998).

As espécies do gênero *Candida* são as mais comumente encontradas em carnes frescas de bovinos e aves, e podem estar envolvidas em processos de deterioração de vários tipos de alimentos, principalmente em laticínios. *Cryptococcus* tem como característica não realizar atividade fermentativa, é encontrada em solos, plantas e alimentos como morangos e outras frutas, pescados marinhos, camarões, carnes bovinas cruas, refrigerantes, vinhos e grãos de cereais; *Debaryomyces* tem pouca atividade fermentativa, elevada tolerância ao sal (18,0 a 20,0%) e pertence ao grupo das formadoras de películas nas superfícies de alimentos salgados ou mantidos em salmoura; *Saccharomyces* caracteriza-se por intensa capacidade de fermentação, a espécie mais freqüentemente encontrada é a *cerevisiae*, empregada para as mais variadas finalidades, como produção de pães e bebidas, álcool, glicerol, invertases e em processos tecnológicos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As leveduras são agentes potenciais de deterioração, sendo uma das conseqüências do seu desenvolvimento no alimento a elevação do pH, que propicia condições para a multiplicação de outros microrganismos, inclusive patogênicos,

desde que o pH atinja valores superiores a 4,5 (ICMSF, 1978), sendo que as fermentativas são capazes de se desenvolver em condições anaeróbias, com a utilização de carboidratos e formação de etanol e o CO₂. A deterioração dos alimentos por leveduras se exterioriza por modificações de seu aspecto, odor e sabor; em certos casos as transformações de origem fermentativa são denunciadas não só por mudanças de características sensoriais, como também pelo aparecimento de bolhas de gás carbônico. As leveduras também desenvolvem turbidez, floculação, película e/ou depósito (WYDER, 2001).

Os casos de toxinfecções ocasionadas por leveduras são pouco freqüentes, existem algumas espécies de leveduras conhecidamente patogênicas como a *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (HURLEY; LOVOUIS; MULHALL, 1987), mas são raramente transmitidas por alimentos. No entanto, estudos estatísticos realizados no Canadá notificaram casos nos quais as leveduras foram suspeitas de causar toxinfecções alimentares (TOOD, 1983). Alguns pesquisadores têm relatado a possibilidade das leveduras serem causadoras de reações alérgicas vinculadas a alimentação (TAYLOR, 1980).

Características como a habilidade de desenvolver em baixos pH, temperatura e atividade de água, concentrações altas de sal e suas atividades enzimáticas tornam as leveduras não somente desejáveis como no caso de produção de derivados lácteos, como indesejáveis no caso de deteriorações destes mesmos alimentos. Como conseqüência do desenvolvimento das leveduras pode ocorrer produção de odores desagradáveis, descolorações, mudanças de textura e produção de gás que pode causar estufamento de embalagens nas prateleiras refrigeradas durante sua comercialização (JAKOBSEN; NARVHUS, 1996).

A ocorrência e a importância de leveduras em produtos lácteos foram descritas por Fleet (1990), que salientou a sua relação na deterioração de alguns produtos e os efeitos benéficos na fermentação de outros. Os tópicos abordados incluíram a taxonomia de leveduras em produtos lácteos como: leite, creme, manteiga e outros produtos não fermentados, bem como iogurte, queijo e outros produtos lácteos fermentados. Em seu trabalho, as leveduras predominantemente encontradas nesses produtos foram *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida kefyr*.

No gênero *Debaryomyces*, as células vegetativas são esféricas e a reprodução ocorre por brotamento multilateral. Apresentam pouca atividade fermentativa. Suas espécies possuem elevada tolerância ao sal (18 a 20%) e pertencem ao grupo das formadoras de película na superfície de alimentos salgados ou mantidos em salmoura (EVANGELISTA, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Fleet e Mian (1987) relataram a espécie *Debaryomyces hansenii* como o contaminante mais comum de alimentos e apresenta os seguintes atributos: habilidade de desenvolver bem em baixas temperaturas; habilidade de fermentar sacarose e/ou lactose e resistência aos conservantes sorbato e benzoato.

Segundo Fleet (1990) algumas propriedades específicas são necessárias para o desenvolvimento e predominância de leveduras em leite e produtos lácteos, dentre elas a fermentação ou assimilação de lactose, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, assimilação de ácido láctico e ácido acético, multiplicação sob baixa temperatura e também elevada concentração de sal. Diversas discussões relacionadas as diferentes propriedades de leveduras isoladas de produtos lácteos, foram também feitas por Schmidt, Graffard e Lenoir (1979) e Baroiller e Schmidt (1984).

Alguns tópicos sobre a identificação de leveduras foram descritos por Deak e Beuchat (1987), entre eles as tendências atuais na taxonomia de leveduras; os grupos encontrados em alimentos; métodos simplificados e a chave de identificação.

Bolores e leveduras são considerados como os microrganismos mais freqüentemente encontrados em casos de deterioração de produtos lácteos. Não somente espécies fermentadoras de lactose como *Kluyveromyces marxianus* e *Debaryomyces hansenii* são encontradas, mas também *Hansenula* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida guilliermondii* e *Geotrichum candidum*, algumas destas são capazes de fermentar a galactose (WYDER, 2001). Em alguns casos, a contaminação por estes microrganismos tem origem na base de frutas adicionadas na produção de iogurtes, nesse caso podem ser isoladas as espécies: *Candida magnoliae*, *C. parapsilosis*, *C. silvicola*, *C. valida*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Issatchenkia orientalis* (MEIER; WYDER, 1999).

Embora as atividades fermentativas das leveduras sejam bem conhecidas, tem sido dada pouca importância a ocorrência de leveduras em produtos lácteos. De fato, estudos microbiológicos realizados em leite e seus derivados demonstram a maioria dos casos de contaminação por bactérias e apenas relatam alguns por leveduras (ROBINSON, 1981; COUSIN, 1982; LAW; MABBITT, 1983; BISHOP; WHITE, 1986).

As espécies de leveduras mais freqüentemente isoladas em produtos lácteos são identificadas como *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon beigeli*, *Candida versatilis*, *Cryptococcus albidus*, *Candida zeylanoides* e *Dekkera anomala* (VIJOEN et al., 2003)

O leite cru é a base da maioria dos produtos lácteos, alguns estudos realizados relataram a presença de leveduras tanto em leite cru como em pasteurizado. Embora exista a possibilidade de leveduras estarem envolvidas na recontaminação do leite, a ocorrência de leveduras em leite pasteurizado sugere que estes microrganismos tenham um certo nível de tolerância ao processo de pasteurização (FLEET; MIAN, 1987; VADILLO et al., 1957).

As leveduras raramente se desenvolvem em leite durante o armazenamento sob refrigeração, no entanto, a multiplicação de leveduras pode ocorrer quando o desenvolvimento de bactérias é inibido por resíduos de antibióticos (COUSIN, 1982; BISHOP; WHITE, 1986).

3.5 Conservantes

Embora a utilização de conservantes em leite não seja permitida pela legislação brasileira, ainda assim este trabalho teve como um dos objetivos verificar a resistência “in vitro” das leveduras isoladas e identificadas frente aos dois conservantes permitidos para o uso em derivados lácteos.

A conservação de alimentos sempre foi importante na vida do homem, desde que ele começou a viver em comunidade e armazenar a sua colheita. Os compostos como sal (NaCl), açúcar, ácidos e fumaças de madeira têm sido usados como conservantes de alimentos a muito tempo, ou ainda por meio de processos tecnológicos como o calor, frio, fermentação, radiação e principalmente com o uso de conservadores químicos, os quais atuam como agentes antimicrobianos,

protegendo os alimentos contra a contaminação por bolores, leveduras e bactérias (MARSH, 1966; KIMBLE, 1977; LÜCK, 1977; TFOUNI; TOLEDO, 2001).

Apesar das medidas higiênicas e normas sanitárias habitualmente aplicadas na produção de alimentos, perde-se anualmente, no mundo todo, toneladas e toneladas de alimentos de boa qualidade, devido ao ataque de bactérias, bolores e leveduras. Estas perdas e riscos podem ser evitados, em grande parte, quando se aplicam os métodos de conservação adequados, como os processos físicos envolvendo o frio, o calor, a desidratação, ou outros. Esses procedimentos não podem ser aplicados em todas as situações nem em todos os tipos de alimentos, porque podem alterar as propriedades sensoriais do produto e, muitas vezes, são extremamente onerosos. Torna-se então necessário o uso de um conservante e, dentro dos mais freqüentemente usados destacam-se: ácido benzóico e o sórbico e seus respectivos sais de sódio, cálcio e potássio (GAVA, 1984, ARAÚJO, 1990; TFOUNI; TOLEDO, 2001).

Conforme a legislação brasileira em vigor, os conservantes alimentícios são definidos como substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (BRASIL, 1988).

De acordo com Sofos (1995), a escolha de um conservante para aplicação específica é baseada nos seguintes fatores: propriedades físicas e químicas (solubilidade, pKa, reatividade e toxicidade), tipos de microrganismos de interesse e a propriedade que mais influencia na extensão da atividade antimicrobiana do conservador. Baixos pHs potencializam a ação de ácidos minerais fracos (nitrito e sulfito) e de lipofílicos fracos (sorbico, benzóico e propiônico).

O conservante antimicrobiano ideal deve possuir atividade de largo espectro; não ser tóxico para o homem ou animais; ter baixo custo; não interferir no sabor ou aroma do alimento; não ser inativado por substâncias presentes no alimento; não deve favorecer o aparecimento de cepas ou linhagens resistentes e deveria eliminar e não inibir os microrganismos. A maioria dos conservantes tem ação inibitória nas concentrações utilizadas, somente óxido de etileno e propileno e pirocarbonato de etila são letais (TRÍBOLI, 1995).

Segundo Stratford e Anslow (1998) os conservantes são amplamente utilizados para manter a estabilidade microbiana em produtos alimentícios. A teoria clássica supõe que moléculas ácidas não dissociadas passam pela membrana plasmática, dissociam-se no pH neutro do citoplasma, liberam prótons e inibem o desenvolvimento por meio da acidificação do citoplasma. Concentrações inibitórias do ácido sórbico mostram uma inibição similar aos outros ácidos, alcoóis, aldeídos, sendo estes últimos incapazes de atuar como os ácidos fracos. Um estudo sobre 22 leveduras mostrou uma alta correlação entre a resistência ao sorbato e tolerância ao etanol. A inibição por ácidos de cadeia curta ou alcoóis demonstrou uma relação lipofílica forte.

Tfouni e Toledo (2001) consideraram que as substâncias químicas utilizadas como aditivos alimentares são, muitas vezes, estranhas ao organismo humano, portanto, podem ser tóxicas e seu emprego em alimentos só é permitido depois de se analisar diversos fatores. Dentre eles a real necessidade tecnológica e, principalmente, o estabelecimento de seu uso em pHs baixos, o que favorece a atividade antimicrobiana dos ácidos minerais fracos, que são o nitrito e o sulfito, e de ácidos lipofílicos fracos, que são o sórbico, o benzóico e o propiônico (SOFOS, 1995).

O ácido sórbico foi isolado pela primeira vez em 1859 pelo químico alemão A. W. Von Hofmann, a partir do fruto de *Sorbus aucuparia* (SOFOS; BUSTA, 1993). Entretanto, foi apenas por volta de 1939 que sua ação antimicrobiana foi descoberta por E. Muller, na Alemanha e por C. M. Gooding, nos Estados Unidos.

Dentre os conservadores, o ácido sórbico é o único ácido orgânico insaturado produzido sinteticamente e permitido em alimentos. Em face de sua característica neutra no sabor, é recomendável para uso em sucos e bebidas. É eficaz no controle de bolores e leveduras e pouco eficiente no de bactérias. Ele é ligeiramente solúvel em água e o seu sal de potássio é bastante solúvel. O pH ótimo de atuação estende-se até pH = 6,0 (ARAÚJO, 1988).

O uso do ácido sórbico (INS - 200) é bastante divulgado, podendo ser utilizado puro, ou ainda como sais de sódio (INS - 201), cálcio (INS - 203) ou potássio (INS - 202) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO-ABIA, 2001).

Seu emprego mundial é bastante amplo, devido ao fato de ele não interferir no sabor e ser fisiologicamente inócuo (LÜCK, 1977). A sua principal desvantagem é o custo relativamente maior que o dos benzoatos e propionatos. Portanto, em produtos de maior pH, eles são geralmente usados em quantidades menores que os outros dois conservadores, de modo a obter o efeito desejado (ROBACH, 1980).

Segundo Lück (1977), as faixas de mínima concentração de inibição para os sorbatos variam de 10 a 10000 ppm para bactérias, 25 a 400 ppm para leveduras e 10 a 1000 ppm para fungos.

Segundo Lück (1977), no século XIX, começou-se a utilizar o ácido benzóico e seus derivados, que são de grande aplicação na indústria de alimentos e, posteriormente, os sais de ácido propiônico e sórbico. A tendência desses sais se dissociarem é baixa, fazendo com que sejam mais ativos em alimentos de baixa acidez (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Pode ser empregado puro ou como sais de sódio (INS - 211), cálcio (INS - 213) ou potássio (INS - 212) (ABIA, 2001).

O ácido benzóico apresenta atividade contra bolores, leveduras e bactérias, mostrando maior eficiência sobre bactérias e leveduras do que sobre bolores (KIMBLE, 1977; SOFOS, 1995). Entretanto, quando é usado em alimentos ácidos, atua principalmente na inibição de bolores e leveduras, apesar de que valores de pH < 4,5 são geralmente suficientes para prevenir o desenvolvimento bacteriano nesses produtos (CHIPLEY, 1993; JAY, 2000; WAGNER; MOBERG, 1989).

Fleet e Mian (1987) enumeraram e identificaram as leveduras isoladas de 161 amostras de produtos lácteos como leite pasteurizado, creme, manteiga, iogurte, queijo e sorvete. Essas amostras foram submetidas a ação de conservantes como benzoato de sódio e sorbato de potássio nas concentrações 0,02 e 0,05%. A concentração mínima inibitória de ambos os conservantes para *Debaryomyces hansenii* e *Cryptococcus flavus* foi 0,02% e para *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* 0,05%. Nesta última concentração *Candida diffuses* apresentou resistência aos dois conservantes testados.

Sabe-se que atualmente há um aumento no consumo de leite e seus derivados, principalmente devido às novas tecnologias aplicadas e a valorização da saúde pelos consumidores. Por este motivo, a possível presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes nestes produtos demonstra a importância de sua

pesquisa em tais alimentos a fim de que se garanta sua boa qualidade até o momento do seu consumo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Amostras

Neste trabalho foram analisadas 23 (100,00%) amostras de leite pasteurizado, todas dentro do prazo de validade, sendo 1 (4,35%) de leite tipo A, 5 (21,74%) de leite B e 17 (73,91%) de tipo C. As amostras foram obtidas do comércio varejista da região de São José do Rio Preto - SP. Essas foram acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo e transportadas de imediato ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - IBILCE - Universidade Estadual Paulista - UNESP (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; ICMSF, 1978).

4.2 Preparo das Amostras

No Laboratório cada amostra recebeu um código de identificação. Foram colocados assepticamente 10 mL da mesma em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril sendo homogeneizados posteriormente (diluição 10^{-1}). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais seriadas, até 10^{-6} , utilizando-se o mesmo diluente. As diluições obtidas, assim como a 10^0 ,

foram usadas, conforme necessárias, nas análises subseqüentes (ICMSF, 1974; 1980).

4.3 Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas

Pipetou-se assepticamente 1 mL das diluições previamente preparadas e depositou-se em placas de Petri devidamente identificadas. Adicionou-se a seguir 15 mL de Ágar Padrão para Contagem. Depois da homogeneização, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e calculou-se as unidades formadoras de colônias-UFC (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION-APHA, 1972; 1984).

4.4 Enumeração de Bolores e Leveduras

Da mesma forma, para enumeração de bolores e leveduras 1 mL das diluições foi adicionado a 15 mL de Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico a 10% (pH=4,0) com homogeneização e, após solidificação. Incubou-se as placas a 25°C por 5 dias. As UFC foram calculadas de acordo com as diluições (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; ICMSF, 1978).

4.5 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Totais

Foram inoculadas três séries de três tubos de ensaio contendo cada um deles 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Tryptose, com 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Foram homogeneizados e incubados a 35°C durante 48 horas. O cálculo do NMP de coliformes totais foi realizado com o auxílio da tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

4.6 Determinação do NMP de Coliformes Fecais

Utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o Caldo EC. Depois da inoculação, os tubos foram incubados a 44,5°C durante 24 horas (BRASIL, 1991/1992). O cálculo do NMP de coliformes fecais foi efetuado, com a ajuda da tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

4.7 Pesquisa de *Escherichia coli*

Uma alíquota dos tubos com Caldo EC, que apresentavam turbidez, com ou sem gás no interior do tubo de Durham, foi semeada em placas de Petri com Ágar Eosina Azul de Metileno. As colônias suspeitas, que possuíam de 2 a 3 mm de diâmetro e se apresentavam azuis com centro negro e bordas claras à luz transmitida, além de brilho metálico-esverdeado à luz refletida, foram identificadas

utilizando-se testes bioquímicos, principalmente Indol/Vermelho de Metila/Voges-Proskauer/Citrato - IMVIC (MARTH, 1978).

4.8 Pesquisa de *Salmonella* spp

Em 225 mL de Caldo Lactosado e Água Peptonada a 1% foram homogeneizados, respectivamente, 25 mL de cada amostra. Os dois meios de cultura continham 0,5% de Na₂SO₃ (ICMSF, 1978). Após a incubação a 35°C por 24 horas, 1 mL de cada cultivo foi transferido para 10 mL de Caldo Selenito Cistina, que foi incubado a 35°C.

Depois de 24, 48 e 120 horas foram feitas inoculações, em placas de Petri com Ágar *Salmonella Shigella* e Ágar Verde Brilhante, sendo as colônias suspeitas submetidas a testes bioquímicos (semeadura em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro, Ágar Lisina e Ferro, prova de urease, degradação do malonato, desaminação da fenilalanina e descarboxilação da lisina) e sorológicos (MARTH, 1978; BRASIL, 1991/1992).

4.9 Isolamento das Culturas de Leveduras

Procurou-se selecionar todos os tipos morfológicos existentes, sendo que as colônias mais numerosas no Ágar Batata Dextrose acidificado foram isoladas em maior proporção, visando conhecer aquelas predominantes. Em seguida, cada cultura pura recebeu um código de identificação e foi estocada em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo meio "Gymp" (glicose, extrato de levedura, extrato de

malte, NaH_2PO_4 e ágar), para posterior identificação, sendo coberta então com óleo mineral e mantida a $8 \pm 2^\circ\text{C}$. Todas as culturas foram re-espalhadas em Ágar Sabouraud-Glicose, de onde foi feita a descrição da morfologia da colônia (cor, forma, elevação e brilho). Depois dessa descrição macroscópica, foi realizado um exame microscópico para a análise do tamanho, forma e outras características celulares, bem como para novamente constatar a pureza das culturas.

4.10 Provas Taxonômicas

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984) e Barnett; Payne e Yarrow (1983; 1990).

A identificação das culturas foi realizada segundo as chaves descritas por Barnett; Payne e Yarrow (1990) e Kurtzman e Fell (1998).

4.10.1 Provas morfológicas

Para a verificação da produção de esporos, foram utilizados: o meio de cultura de Gorodkova (glicose, peptona, NaCl e ágar) e o Ágar Acetato de McClary (glicose, KCl , extrato de levedura, acetato de sódio e ágar). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias.

4.10.2 Provas fisiológicas

4.10.2.1 Capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa das culturas foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura). O mesmo foi colocado em tubos de ensaio de 12 x 100 mm contendo tubos de Durham invertidos. Os açúcares foram esterilizados separadamente do meio de cultura.

Inicialmente foi testada a capacidade fermentativa frente à glicose. As culturas que apresentaram resultado positivo foram então submetidas a três dissacarídeos: sacarose, maltose e lactose.

Os tubos de ensaio foram mantidos a temperatura ambiente sendo as leituras feitas periodicamente entre 7 e 21 dias. Foi considerado resultado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estava preenchido com gás e negativo quando não houve produção de gás (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983; 1990).

4.10.2.2 Desenvolvimento em diversas temperaturas

Analisou-se a capacidade de desenvolvimento a 35, 40 e 42°C, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura) acrescido de 2,0% de glicose. Para a temperatura de 35°C, os tubos de ensaio

foram mantidos em estufa de incubação e para as demais foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas através do Cartão de Whickerham (KREEGER VAN RIJ, 1984), após 48-72 horas de incubação. Foi considerado desenvolvimento positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando estas foram visualizadas.

4.10.2.3 Desenvolvimento em meio de cultura contendo nitrato

Foi utilizado o “Yeast Carbon Base” (YCB-Difco) contendo 0,078% de KNO_3 como fonte de nitrogênio e 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983; 1990).

4.10.2.4 Resistência à pressão osmótica

Neste teste, foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico para ambas foi o Ágar Sabouraud Glicose. Para um dos testes, foi acrescentado 50% de glicose e para o outro 10% de NaCl (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983; 1990).

4.10.2.5 Desenvolvimento em meio de cultura contendo cicloheximida

Para esta prova foi utilizado o “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) acrescido de 1,0% de glicose, 2,0% de ágar e alíquotas de cicloheximida que variaram de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão-ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

4.10.2.6 Síntese de amido

Para a verificação da produção de compostos amilóides foi utilizado o Ágar Sabouraud Glicose. Após o desenvolvimento das culturas, gotejou-se sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento de coloração azul escura indicará resultado positivo (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983; 1990).

4.10.3 Provas de assimilação de fontes de carbono

Foram utilizadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, m-inositol e glicosamina. Todas as substâncias

foram utilizadas na concentração de 0,5%, exceto a rafinose que foi a 1,0%, acrescidas ao “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) mais 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983; 1990).

4.11 Ensaio de Resistência aos Principais Conservantes Alimentícios Encontrados na Legislação Brasileira para Derivados Lácteos

Para esta prova foi utilizado o Ágar Sabouraud Glicose, onde foram acrescentados os conservantes alimentícios benzoato de sódio (código INS - 211) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4% e sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%. Para verificar o desenvolvimento microbiano, foi utilizado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservante. Foram esterilizados separadamente, por autoclavagem, o meio básico sem o ágar, o ágar e os conservantes, para prevenir eventuais perdas por hidrólise ou evaporação.

4.12 Prova de Sensibilidade ao Tratamento Térmico de 63°C por 30 min.

Neste teste as respectivas culturas puras isoladas foram previamente inoculadas em tubos de ensaio contendo Caldo Nutriente e incubadas a 25°C por 24 horas. Depois desse período tais tubos foram submetidos a temperatura de 63°C por 30 minutos em banho-maria, simulando um processo de pasteurização. Após o tratamento térmico as leveduras foram então semeadas em placas de Petri com

Ágar Nutriente com posterior incubação a 25°C. As leituras foram feitas após 5 dias de incubação.

4.13 Técnica de “Replica-Plate”

A técnica de “replica-plate” foi utilizada para as provas descritas nos itens 4.10.1, 4.10.2.3, 4.10.2.4, 4.10.2.5, 4.10.2.6, 4.10.3, 4.11 e 4.12.

Para o inóculo, culturas de 24-48 horas em meio “Gymp”, exceto para os itens 4.11 e 4.12, foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias à temperatura ambiente em “Yeast Nitrogen Base” (YNB-Difco) líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema “replica-plate multitiped”, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias por placa de Petri (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952; SHEREE LIN; FUNG; COX, 1987). Todas as placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Microbiológicas

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas variou de $4,5 \times 10^0$ a $7,3 \times 10^6$ UFC/mL, a de bolores e leveduras de < 1 a $8,0 \times 10^3$ UFC/mL e a determinação de coliformes totais de < 3 a > 1100 NMP/mL, conforme a Tabela 2.

Com relação a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e a determinação de coliformes totais, considerando os parâmetros contidos na Instrução Normativa nº. 51, pode-se verificar que, respectivamente, 5 amostras (21,74%) e 6 amostras (26,10%) estão acima dos limites para leite pasteurizado.

Com respeito aos microrganismos pesquisados, cumpre ressaltar que elevadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas podem geralmente indicar matérias-primas excessivamente contaminadas, inadequadas limpeza e desinfecção de superfícies e higiene não adequada na produção ou a combinação destas circunstâncias.

Dos agentes bacterianos, os coliformes são internacionalmente considerados microrganismos indicadores da segurança microbiológica de alimentos (APHA, 1976).

Segundo a ANVISA, o leite pasteurizado possui qualidade microbiológica satisfatória quando está isento de bactérias do gênero *Salmonella*,

ausência em 25 mL do produto, e quando o número de coliformes a 45°C não excede a 4 por mL (BRASIL, 2001).

Do total de amostras analisadas apenas 2 (8,70%) apresentaram coliformes fecais acima do limite da legislação, sendo do tipo C, conforme a Tabela 2. Considerando o padrão vigente para coliformes fecais neste tipo de produto, de no máximo 4 por mL, estas amostras foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”, portanto “produtos impróprios para o consumo humano”.

Das amostras de leite tipo A e tipo B, todas (100,00%) foram consideradas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias”, portanto “produtos de acordo com os padrões legais vigentes”, de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2001).

A presença de *Salmonella* spp não foi constatada e/ou confirmada em nenhuma das amostras analisadas, o que está de acordo com o padrão de ausência em 25 mL estabelecido na legislação (BRASIL, 2001). Por tal motivo, as amostras foram classificadas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias” e, portanto “produtos de acordo com o padrão legal vigente” (Tabela 2), o que está de acordo com os resultados encontrados em algumas pesquisas de *Salmonella* spp realizadas em leite por Leitão e Quast (1987), Franco et al. (2000), Tessari e Cardoso (2002), Oliveira, Nunes e Abreu (2003).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal (JAY, 2000). Casos onde estão envolvidos produtos de laticínios, comumente há

ligação com o consumo de leite cru ou pasteurizado de forma inadequada (BARROS; PAIVA; PANETTA, 2002).

Leitão e Quast (1987) esclarecem que sob circunstâncias normais os produtos alimentícios não contêm bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella*. A presença deste microrganismo é utilizada para verificar a qualidade do produto para o consumo humano (TESSARI; CARDOSO, 2002).

A presença de coliformes fecais com ênfase da *Escherichia coli*, tem sido relatada no leite que é utilizado para a produção de derivados. Por serem bactérias termossensíveis, sua presença no leite pasteurizado indicará contaminação posterior ao processo ou então pasteurização deficiente (VESSONI PENNA; BARUFFALDI; COLOMBO, 1986). A verificação de *Escherichia coli* nos alimentos, segundo Franco e Landgraf (2003), fornece informações seguras sobre as condições higiênicas a que o produto foi submetido e indica a possível presença de patógenos.

A presença de *Escherichia coli* foi constatada e/ou confirmada em 3 (13,04%) das 23 amostras analisadas, sendo as 3 amostras de leite tipo C. Os resultados do IMVIC, para os microrganismos desses produtos, foram os seguintes: indol (+), vermelho de metila (+), Voges-Proskauer (-) e citrato (-).

A porcentagem de *Escherichia coli* encontrada neste trabalho foi inferior a encontrada por Ballod e Bramorski (1990), que verificaram a presença de *Escherichia coli* em 50% das amostras de leite tipo C, comercializadas em Blumenau.

De acordo com os padrões da ANVISA, 8,70% das amostras apresentaram resultados fora dos padrões, porcentagem esta inferior aquela

encontrada nos diversos trabalhos em leite pasteurizado, realizados em diferentes regiões do Brasil, desenvolvidos por Silva et al. (1992); Freitas e Glória (1993); Cerqueira et al. (1994); Garrido et al. (1996); Nader Filho et al. (1997); Silveira, Carvalho e Teixeira (1998); Moreno et al. (1999); Santos et al. (1999); Timm et al. (2001); Cordeiro, Carlos e Martins (2002); Timm et al. (2003); Oliveira, Nunes e Abreu (2003); Polegato e Rudge (2003); Vieira e Carvalho (2003). Se considerarmos apenas as amostras de leite tipo C, 2 amostras (11,76%) obtiveram resultados fora do previsto pela legislação, que também se encontra abaixo dos obtidos pelos autores citados anteriormente.

Em Minas Gerais, Silva et al. (1992) e Freitas e Glória (1993) encontraram, respectivamente, 23 e 22% das amostras estudadas em desacordo com as exigências legais para leite tipo C. Moreno et al. (1999); Santos et al. (1999) e Oliveira, Nunes e Abreu (2003), analisando amostras de mesmo tipo no estado de São Paulo, verificaram que 20,4; 21 e 47%, respectivamente, estavam fora dos padrões. No Rio Grande do Sul, os estudos de Timm et al. (2001) demonstraram que 17,57% das amostras analisadas apresentavam valores microbiológicos acima dos limites legais. Trabalhando com mini e micro-usinas no estado de São Paulo, Silveira, Carvalho e Teixeira (1998), Cerqueira et al. (1994), Garrido et al. (1996), Nader Filho et al. (1997) e Polegato e Rudge (2003) encontraram, respectivamente: 26,38; 20; 25,55; 20 e 12,4% das amostras estudadas acima dos padrões oficiais. Timm et al. (2003) encontraram 13,64% das amostras fora dos padrões legais, em trabalhos realizados em micro-usinas da região Sul do Brasil. Cordeiro, Carlos e Martins (2002) relataram que 30,23% das amostras provenientes de diferentes micro-usinas do município de Campos de Goytacazes apresentaram-se fora dos padrões legais. Em pesquisa realizada por Vieira e Carvalho (2003), em micro-

usinas da cidade de Patos-PB, 70% das amostras apresentaram resultados fora dos padrões.

Considerando os diversos fatores analisados e comparando-se esses dados com a literatura encontrada, pode-se verificar que a qualidade do leite pasteurizado avaliado neste trabalho é satisfatória, uma vez que foi constatado que apenas 8,70% das amostras estavam em desacordo com as especificações legais em vigor.

Tabela 2: Apresentação dos resultados obtidos após as diferentes análises microbiológicas.

Amostras	Leite pasteurizado tipo	Bactérias aeróbias mesófilas (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes fecais (NMP/mL)	Escherichia coli (confirmativo)	Salmonella spp (-/+)
1	C	$4,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
2	B	$4,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^0$	< 3	< 3	-	-
3	C	$1,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^0$	< 3	< 3	-	-
4	A	$4,5 \times 10^0$	< 1	< 3	< 3	-	-
5	C	$2,9 \times 10^4$	$5,1 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
6	C	$8,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^2$	4	< 3	-	-
7	C	$2,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	23	4	+	-
8	C	$2,1 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	>1100	1100	+	-
9	C	$9,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	3	< 3	-	-
10	C	$8,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^0$	< 3	< 3	-	-
11	C	$1,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$	43	43	+	-
12	B	$1,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
13	C	$1,9 \times 10^4$	$3,1 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
14	C	$7,4 \times 10^3$	$9,0 \times 10^0$	< 3	< 3	-	-
15	C	$2,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^0$	4	< 3	-	-
16	C	$4,5 \times 10^4$	$8,8 \times 10^1$	240	< 3	-	-
17	C	$3,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
18	B	$7,7 \times 10^4$	$1,6 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
19	B	$7,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^2$	< 3	< 3	-	-
20	B	$1,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^1$	4	< 3	-	-
21	C	$1,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
22	C	$6,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
23	C	$2,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^1$	< 3	< 3	-	-
Varição		$4,5 \times 10^0$ a $7,3 \times 10^6$	< 1 a $8,0 \times 10^3$	< 3 a > 1100	< 3 a 1100	- a +	-
Padrão Federal (Brasil, 2001)				≤ 4		ausência em 25 mL	

5.2 Isolamento das Culturas de Leveduras

Das 23 amostras de leite pasteurizado analisadas foram isoladas 31 (100,00%) culturas de leveduras, as quais foram submetidas aos testes taxonômicos. Estas foram divididas em 8 grupos de acordo com a discordância em alguns dos resultados em relação à descrição padrão, todos eles contendo leveduras *Debaryomyces hansenii*, com duas variedades distintas: *hansenii* e *fabryii*, de acordo com a Tabela 3.

Do total de leveduras isoladas (100,00%), verificou-se que 30 (96,77%) representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* estavam contidas nos grupos I, II, III, IV, V, VI, VIII, e 1 (3,23%) por *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* contida no grupo VII, como apresentado na Tabela 3.

Pode-se verificar que as mesmas apresentaram variações em seus resultados, em relação à descrição padrão, conforme demonstram as Tabelas de 4 a 8. As leveduras do grupo I diferiram da descrição padrão, por assimilar nitrato e se desenvolver a 40°C (L1,4; L11,4; L11,6; L12,1; L13,1; L18,1; L19,1; L19,3; L21,2; L22,2 e L22,5). O grupo II diferiu por assimilar nitrato, se desenvolver a 40°C e fermentar a lactose (L9,7; L9,8; L11,1; L12,2; L19,2; L21,1 e L22,1). O III por assimilar M-inositol, nitrato e desenvolver a 40°C (L8,5; L11,2; L11,5, L12,4 e L17,1). O IV por ser ascospórigenos e assimilar a inulina, nitrato, M-inositol e se desenvolver a 40°C (L6,1; L9,2; L9,4 e L9,6). O V diferiu do padrão por assimilar D-manitol, nitrato e se desenvolver a 40°C (L22,3). O VI diferiu do padrão por assimilar M-inositol, nitrato, produzir pigmento e se desenvolver a 40°C (L7,3) e o grupo VII

diferiu por ser ascospóroenos, assimilar a inulina, M-inositol, nitrato, produzir pigmento e se desenvolver a 40°C (L1,7).

Apenas uma levedura foi classificada como *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (L20,1), contida no grupo VIII e diferiu do padrão por assimilar M-inositol e nitrato, crescer em meio contendo 50% de glicose e ser ascospóroenos, de acordo com a Tabela 8.

De acordo com Wyder (2001), *Debaryomyces hansenii* é uma das de leveduras mais prevalentes em produtos lácteos.

Cosentino et al. (2001) em estudo das propriedades bioquímicas das *Debaryomyces hansenii*, relataram boa tolerância ao NaCl, apresentando habilidade para crescer em baixas temperaturas e assimilar lactose, lactato e citrato.

Com relação à classificação, verificou-se que o percentual das linhagens isoladas, neste trabalho, representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foi 96,77% sendo inferior ao 97,56% encontrado por Carnicel (2004), e superior aos 84,17% obtido por Coelho (2001), 54,84% por Silva (2003) e 8,70% por Mansor (2001).

Fleet e Mian (1987) em pesquisa realizada com 26 amostras de leite pasteurizado descreveram, em ordem decrescente de freqüência, leveduras dos gêneros *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus flavus* e *Candida difflues*.

Segundo pesquisas em produtos lácteos realizadas por Fleet (1990), foi constatada a presença de algumas espécies de leveduras como: *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida kefir*.

As espécies de leveduras mais freqüentemente isoladas em produtos lácteos são identificadas como *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Trichosporon beigeli*, *Candida versatilis*, *Cryptococcus albidus*, *Candida zeylanoides* e *Dekkera anomala* (VIJOEN et al., 2003)

Tabela 3: Frequência relativa das variedades de leveduras isoladas.

Grupos	Leveduras	Códigos das culturas	Número de culturas	Porcentagem (n=31)
I	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L1,4; L11,4; L11,6; L12,1; L13,1; L18,1; L19,1; L19,3; L21,2; L22,2 e L22,5	11	35,48%
II	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L9,7; L9,8; L11,1; L12,2; L19,2; L21,1 e L22,1	7	22,58%
III	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L8,5; L11,2; L11,5; L12,4 e L17,1	5	16,13%
IV	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L6,1; L9,2; L9,4 e L9,6	4	12,90%
V	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L22,3	1	3,23%
VI	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L7,3	1	3,23%
VII	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	L1,7	1	3,23%
VIII	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	L20,1	1	3,23%

Legenda:

LN,n onde: L = Leite; N = Número da amostra e n = Número da levedura isolada.

Tabela 4: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo I.

Provas/Leveduras	L1.4	L11.4	L11.6	L12.1	L13.1	L18.1
Pigmento	Creme	Branca	Amarela	Branca	Branca	Creme
Esporos	+	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	-	+	-	-	+	-
L-ramnose	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	-	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	+	+
Lactose	+	-	+	-	-	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	-	-
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-	+	+
M-inositol	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+
T= 35°C	+	+	+	+	+	+
T= 40°C	+	+	+	+	+	+
T= 42°C	+	+	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	-	+	-	+	-	-
Ciclo 1000 ppm	-	-	-	-	-	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

(continua)

Tabela 4: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo I.

Provas/Leveduras	L19.1	L19.3	L21.2	L22.2	L22.5
Pigmento	Creme	Creme	Creme	Branca	Branca
Esporos	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	-	+	+	+
D-ribose	+	+	-	+	-
D-xilose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	-	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	-	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+
Inulina	-	+	-	-	-
Amido solúvel	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+
Galactitol	+	-	+	+	+
M-inositol	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+
T= 35°C	+	+	+	+	+
T= 40°C	+	+	+	+	+
T= 42°C	+	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	+	-	-	-	-
Ciclo 1000 ppm	-	-	-	-	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

Tabela 5: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo II.

Provas/Leveduras	L9.7	L9.8	L11.1	L12.2	L19.2	L21.1	L22.1
Pigmento	Creme	Branca	Branca	Creme	Creme	Branca	Branca
Esporos	+	+	+	+	+	+	+
F. glicose	+	+	+	+	+	+	+
F. maltose	+	+	+	+	+	-	+
F. sacarose	+	+	+	+	+	-	+
F. lactose	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	-
D-xilose	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	-	-	-	-
Amido solúvel	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	+	+	+	+
M-inositol	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+
T= 35°C	+	+	+	+	+	+	+
T= 40°C	+	+	+	+	+	+	+
T= 42°C	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	-	+	+	-	+	+	-
Ciclo 1000 ppm	-	-	-	-	-	-	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

Tabela 6: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo III.

Provas/Leveduras	L8.5	L11.2	L11.5	L12.4	L17.1
Pigmento	Creme	Amarela	Creme	Branca	Creme
Esporos	+	+	+	+	+
F. glicose	-	-	+	-	-
F. maltose	-	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	+	-	-
F. lactose	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	+
Lactose	+	-	-	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	-
Amido solúvel	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+
Galactitol	+	-	-	+	+
M-inositol	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+
T= 35°C	+	+	+	+	+
T= 40°C	+	+	+	+	+
T= 42°C	+	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	+	+	+	+	-
Ciclo 1000 ppm	+	+	+	+	-
Glicose 50%	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

Tabela 7: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras do grupo IV.

Provas/Leveduras	L6.1	L9.2	L9.4	L9.6
Pigmento	Branca	Creme	Branca	Creme
Esporos	+	+	+	+
F. glicose	+	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+
L-arabinose	+	-	+	+
D-arabinose	+	+	-	+
L-ramnose	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+
Amido solúvel	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+
Galactitol	+	-	+	-
M-inositol	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+
T= 35 °C	+	+	+	+
T= 40 °C	+	+	+	+
T= 42 °C	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	+	+	+	+
Ciclo 1000 ppm	+	-	+	+
Glicose 50%	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

Tabela 8: Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras dos grupos V, VI, VII e VIII.

Provas/Grupos	V	VI	VII	VIII
Pigmento	Branca	Amarela	Creme	Branca
Esporos	+	+	+	+
F. glicose	-	-	-	-
F. maltose	-	-	-	-
F. sacarose	-	-	-	-
F. lactose	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
L-sorbose	+	+	+	+
Glicosamina	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+
L-ramnose	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
Melibiose	+	-	-	+
Lactose	+	-	+	+
Rafinose	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+
Inulina	-	+	+	-
Amido solúvel	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+
Ribitol	+	+	+	+
D-glucitol	+	+	+	+
D-manitol	-	+	+	+
Galactitol	+	-	+	+
M-inositol	-	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Etanol	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+
T= 35°C	+	+	+	-
T= 40°C	+	+	+	-
T= 42°C	+	+	+	+
Ciclo. 100 ppm	-	+	+	-
Ciclo 1000 ppm	-	+	+	-
Glicose 50%	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+
Sínt. amido	-	-	-	-

Legenda: F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.

5.3 Ensaio de Resistência aos Principais Conservantes Alimentícios Encontrados na Legislação Brasileira para Derivados Lácteos

As 30 leveduras isoladas, todas da espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, foram testadas frente a dois conservantes em diferentes concentrações, sendo eles: benzoato de sódio nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4% e sorbato de potássio nas concentrações 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%. O comportamento das leveduras isoladas frente aos conservantes está apresentado nas Tabelas 9 e 10.

5.3.1 Benzoato de sódio (INS - 211)

De acordo com a Tabela 9, que apresenta as leveduras sensíveis a este aditivo nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, e considerando-se os percentuais de leveduras sensíveis, isto é, 10,00; 13,33 e 40,00%, pode então ser verificada respectivamente a porcentagem de leveduras resistentes, frente às concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, de 90,00; 86,67 e 60,00%. De acordo com os resultados pode-se observar que a concentração de 0,4% apresentou uma inibição maior comparando-se as demais concentrações.

O ácido benzóico é um dos conservadores mais empregados nas indústrias tanto farmacêuticas como alimentícias, apresentando atividade contra bolores, leveduras e bactérias, sendo mais eficiente contra bactérias e leveduras, e pode ser utilizado puro ou como sais de sódio, cálcio ou potássio (SOFOS, 1995).

A sensibilidade a este conservante, nas concentrações empregadas, apresentou resultados inferiores àqueles obtidos por Carnicel et al. (2003) na concentração de 0,1% (14,58%), na de 0,2% (22,92%) e na de 0,4% (60,42%) e Carnicel (2004) que obteve na concentração de 0,1% (25,61%), na de 0,2% (34,14%) e na de 0,4% (67,07%).

Coelho (2001) observou que nas concentrações 0,1 e 0,2%, respectivamente, 99,16 e 100% das leveduras foram sensíveis. Mansor (2001) e Silva (2003) verificaram que, nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, todas foram sensíveis, resultados estes superiores ao encontrado neste estudo.

Segundo Fleet e Mian (1987), *Debaryomyces hansenii* possui alta resistência aos conservantes sorbato e benzoato, o que pode explicar as altas porcentagens de resistência observadas neste estudo.

Tabela 9: Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.

Concentrações	Códigos das culturas	Número de culturas	Porcentagem (n=30)
0,1%	L11,2; L21,2 e L22,2	3	10,00%
0,2%	L8,5; L11,2; L21,2 e L22,2	4	13,33%
0,4%	L1,4; L8,5; L9,2; L11,2; L12,1; L18,1; L19,1; L19,2; L19,3; L20,2; L21,2 e L22,2	12	40,00%

Legenda:

LN,n onde: L = Leite; N = Número da amostra e n = Número da levedura isolada.

5.3.2 Sorbato de potássio (INS - 202)

A Tabela 10 mostra que na concentração de 0,05% a porcentagem de leveduras sensíveis foi 3,33%. Nas de 0,1; 0,2 e 0,4% o percentual foi de 6,67%. Considerando-se os percentuais de leveduras sensíveis pode então ser verificada respectivamente, a porcentagem de leveduras resistentes: 96,67 e 93,33%, o que demonstra que, mesmo quando utilizado na concentração de 0,4%, não houve inibição de um grande número de leveduras.

Neste estudo, o sorbato de potássio na concentração de 0,05% inibiu o crescimento de apenas 1 levedura, representando 3,33% das testadas. Este resultado foi inferior ao de Carnicel (2004) e Coelho (2001), que relataram respectivamente, a inibição de 7 (8,54%) e 16 (6,67%) leveduras isoladas, nessa mesma concentração. Estes resultados foram inferiores ao de Mansor (2001) e Silva (2003), que relataram que todas as leveduras isoladas foram sensíveis nestas concentrações.

O ácido sórbico como conservador de alimentos é bastante usado em todo o mundo, e pode ser empregado puro ou como sais de sódio, cálcio e potássio. Os sorbatos são mais eficazes principalmente contra bolores e leveduras, embora atuem também sobre uma variedade ampla de bactérias (JAY, 1996).

De acordo com os resultados obtidos pode-se comprovar que a *Debaryomyces hansenii* apresenta alta resistência a este conservante.

Ao comparar os dois conservantes alimentares empregados neste estudo, pode-se verificar que o conservante benzoato de sódio demonstrou uma maior eficiência do que o sorbato de potássio, ainda que os dois conservantes não tenham inibido uma grande porcentagem de leveduras. Fato este, que pode ser

explicado por ter sido usado o pH 7,0 próximo ao do leite, o qual não representa o de maior ação dos conservantes, pois o sorbato de potássio atua melhor em pH de no máximo 6,0 e o benzoato por volta de 5,0 (ARAÚJO, 1988).

Tabela 10: Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas.

Concentrações	Códigos das culturas	Número de culturas	Porcentagem (n=30)
0,05%	L6,1	1	3,33%
0,1%	L6,1 e L18,1	2	6,67%
0,2%	L6,1 e L18,1	2	6,67%
0,4%	L6,1 e L18,1	2	6,67%

Legenda:

LN,n onde: L = Leite; N = Número da amostra e n = Número da levedura isolada.

Segundo a bibliografia consultada, espécies como a *Debaryomyces hansenii* possuem alta resistência aos conservantes sorbato e benzoato, o que justifica a baixa atuação dos conservantes testados e ainda demonstra coerência dos resultados encontrados com os obtidos por diversos autores.

5.4 Prova de Sensibilidade ao Tratamento Térmico de 63°C por 30 minutos

A pasteurização tem por objetivo a redução da microbiota natural e a eliminação total dos microrganismos patogênicos. A utilização deste processo geralmente é preferida quando outros tratamentos térmicos com temperaturas mais altas prejudicam a qualidade do produto.

Segundo Souza et al. (1995), a pasteurização é especialmente indicada para o leite, creme de leite, manteiga, frutas, sorvetes, embutidos, compotas, cerveja e ovos líquidos.

Das 30 leveduras isoladas, 21 (70,00%) delas foram resistentes ao tratamento térmico aplicado, sendo todas da espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, conforme a Tabela 11.

Ao se comparar a resistência das leveduras *Debaryomyces hansenii* variedade *fabryii*, após o tratamento térmico, pode-se observar um valor inferior ao resultado obtido por Carnicel (2004) e Coelho (2001) que relataram, respectivamente, o percentual de 91,46 e 78,46%, de resistência, e resultado superior ao comparar com Silva (2003), que relatou um percentual de 47,61%.

A resistência das leveduras ao calor também pode estar relacionada à formação de ascósporos. Para Put et al. (1989) aquelas que formam ascósporos são mais resistentes ao calor do que as que não formam.

Tabela 11: Freqüência relativa de leveduras resistentes ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos.

Leveduras	Códigos das culturas	Número de culturas	Porcentagem (n=30)
<i>Debaryomyces hansenii</i> variedade <i>fabryii</i>	L1,4; L1,7; L6,1; L9,6; L9,7; L9,8; L11,2; L11,4; L11,5; L11,6; L12,1; L12,2; L12,4; L13,1; L17,1; L19,1; L19,2; L19,3; L21,1; L21,2 e L22,1	21	70,00%

Legenda:

LN,n onde: L = Leite; N = Número da amostra e n = Número da levedura isolada.

6 CONCLUSÕES

A maioria das amostras (91,30%) analisadas se apresenta dentro do padrão estabelecido pela legislação vigente para coliformes a 45°C, portanto em condições higiênico-sanitárias satisfatórias, ou seja, apropriadas para o consumo humano.

Em relação às bactérias do gênero *Salmonella* todas as amostras (100,00%) apresentam-se em conformidade com a legislação em vigor, pois houve ausência das mesmas nas análises realizadas.

Considerando os diversos fatores analisados e comparando-os aos observados na bibliografia, conclui-se que a qualidade do leite pasteurizado avaliado neste trabalho é satisfatória, uma vez que foi constatado que apenas 8,70% das amostras estão em desacordo com as especificações legais em vigor.

A *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* representa 96,77% das leveduras encontradas e a *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* apenas 3,23%.

Nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, o conservante benzoato de sódio apresenta maior eficácia que o sorbato de potássio.

Sob condições experimentais, o tratamento térmico inibe maior número de leveduras testadas do que os conservantes, com exceção do benzoato de sódio a 0,4% que mostra 40,00% de eficiência contra 30,00% do tratamento térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L.; RAHAMAN, S. Microbiological quality of raw cow's milk at collection centers in Trinidad. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 4, p. 139-146, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos**. São Paulo: Polígono, p. 173-211, 1972.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D. C., 1976. 325 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D. C. 1984. 914 p.

ANUÁRIO MILKBIZZ. **Anuário Milkbizz 1999/2000**. São Paulo, Ed: Milkbizz, 1999.

ARAÚJO, J. M. A. **Conservadores químicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1988. 16 p.

ARAÚJO, J. M. A. Conservadores químicos em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3-4, n. 24, p. 190-210, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO (ABIA). **Compêndio da legislação de alimentos - Consolidação das mesmas e padrões de alimentos - Atos do Ministério da Saúde**. Revisão 8, v. 1, p. 3.76-3.81, 2001.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 549-552, 1996.

BALINT, V. Qualidade do leite tem data marcada: Mercado se prepara para as mudanças que serão implantadas com a Portaria 56, prevista para entrar em vigor a partir de 2005. **Leite & Derivados**, São Paulo, n. 67, 2002. Disponível em: <<http://www.dipemar.com.br/leite/67/index.htm>> Acesso em: 20 de Abril de 2004.

BALLOD, L. B.; BRAMORSKI, A. Influência da fervura doméstica na qualidade microbiológica de leites pasteurizados tipo C, comercializados em Blumenau. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 89-98, 1990.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 881 p.

- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2 ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1002 p.
- BAROILLER, C.; SCHMIDT, J. L. Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures presentes dans les fromages. **Le Latí**, [S.l.], v. 64, p. 16-28, 1984.
- BARROS, V. R. M.; PAIVA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 91, p.15-19, 2002.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise**. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1999. 322 p.
- BELOTI, V. Aspectos microbiológicos do leite pasteurizado tipo C consumido na cidade de Londrina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. **Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 1996. p. 206.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIAKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Revista Cultural e Científica da Universidade Estadual de Londrina - SEMINA**, Londrina, v. 20, n. 1, p. 12-15, 1999.
- BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Assessment of dairy product quality and potential shelf life: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 9, p. 739-753, 1986.
- BRASIL. Resolução nº. 04, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III, IV e VII, todos do Decreto nº. 55871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 de dezembro de 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Brasília, 1991/1992, 136 p.
- BRASIL. Resolução nº. 12 de 2 de Janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 10 de Janeiro de 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado**. Instrução Normativa nº. 51, de 18 de setembro de 2002.

- CARNICEL, F. A. **Qualidade microbiológica de ricota e estudos de resistência de leveduras do gênero *Debaryomyces* isoladas deste produto lácteo**. 2004. 131 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2004.
- CARNICEL, F. A.; SILVA, J. V.; PERESI, J. T. M.; PENNA, A. L. B.; HOFFMANN, F. L. Determinação da atividade antimicrobiana "IN VITRO" de benzoato de sódio sobre leveduras isoladas de ricotas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 35, 2003.
- CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios do estado da Paraíba. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.
- CELESTINO, E. L. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Higheti, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.
- CERQUEIRA, M. M. D. P.; SOUZA, M. R.; RODRIGUES, R.; FONSECA, C. M.; RUBINICK, J.; QUINTAES, I. A. S. Características microbiológicas de leite beneficiado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l.], v. 46, p. 713-722, 1994.
- CHIAPPINI, C. C. J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto a *Staphylococcus aureus*. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais XIII do Congresso Nacional de Laticínios**, 1995. p. 259-263.
- CHIPLEY, J. R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker, 1993, Cap. 2, p. 11-48, 1993.
- COELHO, A. R. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de sorvetes**. 2001. 106 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.
- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.
- CORDEIRO, C. A. M.; CARLOS, L. A.; MARTINS, M. L. L. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 92-93, p. 41-44, 2002.
- COSENTINO, S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MULARGIA, A. F.; PALMAS, F. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1/2, p. 53-58, 2001.

COSTA, E. D.; PINTO, C. L. O.; FERREIRO, I. C. M.; GONÇALVES, M. M.; MONTEIRO, R. M.; VANETTI, M. C. D. Avaliação microbiológica de alimentos e de superfícies de equipamentos e utensílios em indústrias familiares de laticínios. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 20., 2003, Juiz de Fora. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**, 2003. p. 181-184.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 11, p. 172-207, 1982.

DEAK, T.; BEUCHAT, L. R. Identification of foodborne yeasts. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 3, p. 243-264, 1987.

EKPERIGIN, H. E.; NACARAJA, K. V. Microbial food borne pathogens: *Salmonella*. **The Veterinary Clinics of North American**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 17-29, 1998.

ELEY, A. R. **Microbial food poisoning**. London: Chapman & Hall, 1994. 191 p.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 57, n. 1-2, p. 99-106, 2000.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 652 p.

FEITOSA, E. Aspecto higiênico e sanitário do queijo tipo "coalho" do estado do Ceará. **Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 16, n. 2, p. 27-32, 1985.

FLEET, G. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, England, v. 68, n. 3, p. 199-211, 1990.

FLEET, G. H.; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeast in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 11, p. 145-155, 1987.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 36.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p. 70-77, 2000.

FREITAS, M. T.; GLÓRIA, M. B. A. Qualidade higiênico-sanitária do leite pasteurizado tipo C comercializado em Belo Horizonte MG - no período de 1987 a

1989. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 48, n. 287, p. 82-87, 1993.

FURTADO, M. M. Leite de cabra: características especiais, seu uso na alimentação, intolerância. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 36, n. 214, p. 31-37, 1981.

FURTADO, S. C. Leveduras: Uma fonte potencial de deterioração em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12 n. 54, p. 7-9, 1998.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L.; VINTURIM, T. M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas - Frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 78-82, 1994.

GARRIDO, N. S.; MARTINS, A. M. B.; RIBEIRO, E. G. A.; FARIA, R. D.; YOKOSAWA, C. E.; OLIVEIRA, M. A.; FÁVARO, R. M. D. Condições físico-químicas e higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipos "C", "B" e "integral" comercializados na região de Ribeirão Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 65-70, 1996.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V.; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.

GAVA, A. J. Emprego de conservadores em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 3, n. 18, p. 183-194, 1984.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 82 p.

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

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; JORDÃO, C. P.; QUEIROZ, J. H. Determinação de pesticida em leite pasteurizado. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 20., 2003, Juiz de Fora. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**, 2003. p. 39-44.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Nederlands Melk en Zuiveltijds**, Chicago, n. 42, p. 1192-1197, 1986.

GUERREIRO, M. G. **Bacteriologia especial com interesse à saúde pública**. Porto Alegre: Sulina, 1984.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 102-103, p. 25-34, 2002.

HARDING, F. **Milk quality**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995. 166 p.

HARRIGAN, W. F.; MC CANCE, M. E. **Laboratory methods in food dairy microbiology**. New York : Academic Press, 1976. 353 p.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico - sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 425 p.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA - CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" vendido na região de São José do Rio Preto - SP. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 17-24, 1994.

HURLEY, R.; LOUVOIS, J.; MULHALL, A. **Yeast as human and animal pathogens**. London: Academic Press, 1987. p. 207-282.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods: 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific application**. Toronto: University of Toronto Press, 1974. 213 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. v. 1, 434 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microbial ecology of foods**. New York: Academic Press, v. 2, 1980. 997 p.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, England, v. 6, p. 755-768, 1996.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADEBERGS, E. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 612 p.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen, 2000. 679 p.

KIMBLE, C. H. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.) **Desinfection, Sterilization and Preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 41, p. 834-858, 1977.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publication, 1984. 1082 p.

- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4 ed. [S.l.]: Elsevier, 1998. 1055 p.
- LAW, B. A.; MABBITT, L. A. New methods for controlling the spoilage of milk and milk products. **Food Microbiology**, London, p. 131-150, 1983.
- LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 63, p. 399-406, 1952.
- LEITÃO, M. F. F.; QUAST, D. **Microbiologia do açúcar**. São Paulo: CIA dos Refinadores de Açúcar e Café, 1987. 22 p.
- LEITE JUNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B.; SÁ, S. N.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 53-59, 2000.
- LÜCK, E. **Conservacion Quimica de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1977.
- MACIEL, J. F.; BONOMO, P.; DAMASCENO, M. M.; SAMPAIO, K. A.; SANTOS, L. S.; CARVALHO, E. A.; BONOMO, R. C. F. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado comercializado em Itapetinga-BA. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 20., 2003, Juiz de Fora. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**, 2003. p. 131-134.
- MANSOR, A. P. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de manteiga**. 2001. 120 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.
- MARSH, E. H. Antibiotics in foods - naturally occurring, developed and added. **Residue Review**, [S.l.], v. 12, p. 65, 1966.
- MARTH, E. E. **Standard methods for the examination of dairy products**. 14. ed. Washington: APHA, 1978. 416 p.
- MEIER, C.; WYDER, M. T. Klassifizierung von Hefeisolaten aus Joghurt mittels Sequenzierung der D2 Domäne auf der 28S rDNA. In: MIESCHER, S. **Antimicrobial and Autolytic Systems of Dairy Propionibacteria**. Zürich: Swiss Federal Institute of Technology, 1999.
- MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G.; VAN DENDER, A. G. F.; WOLF, B.; MACHADO, R. C. Qualidade microbiológica de leites pasteurizados produzidos no Estado de São Paulo. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 20, n. 20, p. 56-61, 1999.
- MURATA, L. T. F.; ALCÂNTARA, M. R. S.; NUNES, M. C. D.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Avaliação das sobremesas lácteas, características que podem comprometer a garantia de qualidade. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR

E SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1998, São Paulo. **Anais do I Simpósio de Segurança Alimentar e Saúde do Estado de São Paulo**. 1998. Disponível em: <<http://www.cip.saude.sp.gov.br/trabalho.htm>> Acesso em: 22 de Janeiro de 2004.

MURPHY, S. C.; SAEMAN, A. I.; GALTON, D. M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 3, p. 620-626, 1989.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NAVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farms in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 9, p. 984-987, 1996.

NADER FILHO, A. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos B e C processado por algumas usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 43, p. 30-32, 1996.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P. Características microbiológicas do leite pasteurizado por algumas mini e micro-usinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997. Gramado. **Anais do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. 1997. p. 299-308.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, I. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 10-21, 1999.

OLIVEIRA, E. R. O mercado do leite no Brasil pelo lado da compra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ADMINISTRAÇÃO RURAL, 1999. **Anais do Congresso Brasileiro de Administração Rural**. 2001, p. 218-227.

OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. S.; ABREU, M. C. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo C comercializado em Teresina, PI. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 92-94, 2003.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66-67, p. 48-55, 1999.

PINTO, C. L. O.; LOPES, M. M.; MORAES, C. A.; VANETTI, M. C. D. Potencial deteriorador de bactérias psicrófilas gram-negativas isoladas de amostras de leite cru refrigerado. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 20., 2003. Juiz de Fora. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**. 2003. p. 181-184.

POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília-São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.

PUT, H. M. C.; JONG, J.; SAND, F. E. M. J.; VAN GRINSVEN, A. M. Heat resistance studies on yeasts spp. Causing spoilage in softdrinks. **Journal of Applied Bacteriology**, England, v. 50, p. 547-550, 1976.

RABELO, J. A.; MOULIN, M. R. I.; SQUILASSI, K. M. B. S.; SOUZA, W. M.; VIEIRA, M. C. M.; SOUZA, C. M. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no Estado de Goiás no período de junho a dezembro de 1999. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p. 119, 2001.

RAJMANI, L.; GARG, S. K.; YADAV, R. K. Incidence of staphylococci in milk and milk products. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 42, n. 1, p. 136-138, 1989.
RENEAU, J. K.; PACKARD, V. S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v. 22, n. 11, p. 4-22, 1991.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

ROBACH, M. C. Use of preservatives to control microorganisms in food. **Food Technology**, Chicago, v. 34, n.10, p. 81-84, 1980.

ROBINSON, R. K. Dairy Microbiology. **Applied Science Publishers**, v. 2, 1981.

SANTOS, C. C. M.; PERESI, J. T. M.; LOPES, M. R. V.; LIMA, S. I.; CARVALHO, I. S.; ZENEON, O. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado comercializado na região de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 85-89, 1999.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru. Parte II - Coliformes totais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 80-84, 2003.

SCHMIDT, J. L.; GRAFFARD, C.; LENOIR, J. Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert. **Le Laté**, [S.l.], v. 59, p. 142-163, 1979.

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL/DEPARTAMENTO NACIONAL (SENAI/ DN). **Guia para Elaboração do Plano APPCC - Geral**. Brasília, SENAI/DN, 1999. 317 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC. Convênio CNI/SENA/SEBRAE.

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeast identification. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.

SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa: UFV, 1991. 104 p.

SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijos tipo "Minas Frescal"**. 2003. 112 p. Dissertação (Mestre em

Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, M. C. C.; VIEIRA, M. B. C. M.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M. Condições microbiológicas do leite tipo C comercializado em Belo Horizonte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 47, n. 282-284, p.11-12, 1992.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. **Food Additive Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 501-529.

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.) **Antimicrobials in Foods**, New York: Marcel Dekker, 1993. Cap. 3, p. 49-94.

SOLARI, C. A. **Agentes Microbianos de Doenças Transmitidas por Alimentos. Enterobactérias Patogênicas e Enterotoxinas**. Curitiba: SESB/FSCMR, 1986. 191p.

SOUZA, M. R.; RODRIGUES, R.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. **Pasteurização do leite**. Caderno Técnico da Escola Veterinária da UFMG, n. 13, p. 85-93, 1995.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic weak acid preservative. **Letters in Applied Microbiology**, England, v. 27, p. 203-206, 1998.

TAYLOR, S. L. Food allergy - the enigma and some potential solutions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 43, n. 11, p. 300-306, 1980.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Qualidade microbiológica do leite tipo A pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 65-68, 2002.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 35, n. 1/2, p. 41-53, 2001.

TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; BERMUDEZ, R. F.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; SARAIVA, M. N. M.; COELHO, F. J. O.; KNORR, R. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado consumido na região sul do Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001. Piracicaba. **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. 2001. p. 15-42.

TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

TODD, E. C. Foodborne disease in Canada. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, p. 650-657, 1983.

TRÍBOLI, E. Conservação de alimentos através de aditivos químicos. **Microbiologia de alimentos**. São Caetano do Sul, Setembro 1995. p. 1-4. Disponível em: < http://www.mauajr.com/alunos/listas/Controle_MOs_Aditivos.doc > Acesso em: 26 de Outubro de 2004.

URAZ, G.; CITAK, S. The isolation of *Pseudomonas* and other Gram negative psychrotrophic bacteria in raw milks. **Journal of Basic Microbiology**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 129-134, 1998.

VADILLO, S.; PAYA, J.; CUTULI, M. T.; SUAREZ, G. Mycoflora of milk after several types of pasteurization. **Le Latí**, [S. l.], v. 67, p. 1028-1029, 1957.

VALLE, J. L. E. Riscos na produção de queijos e princípios da lavagem e desinfecção de equipamentos. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 4, n. 21, p. 67-68, 1995.

VESSONI PENNA, T. C.; BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A. J. Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 57-74, 1986.

VIEIRA, M. C. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RABELO, J. A.; LIMA, S. V.; SILVA, E. V. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido no estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p. 113, 2001.

VIEIRA, R. T. L.; CARVALHO, M. G. X. Características microbiológicas, físico-químicas e condições higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Patos-PB. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 20., 2003, Juiz de Fora. **Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios**. 2003. p. 201-203.

VIJOEN, B. C.; KNOX, A. M.; JAGER, P. H.; HATTINGH, A. L. Development of Yeast Populations during Processing and Ripening of Blue Veined Cheese. **Food Technology and Biotechnology**, [S.l.], n. 41, p. 291-297, 2003.

WAGNER, M. K.; MOBERG, L. J. Present and future use of traditional antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 143-147, 1989.

WESSELS, D.; JOOSTE, P. J.; MOSTERT, J. F. The prevalence and significance of Enterobacteriaceae from milk and dairy products. **Suid Afrikaanse Tydskrif vir Suiwelkunde**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 23-28, 1998.

WINDYGA, B. Microbiological quality of Polish foods. **Przemysl Spozywczy**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 7, 1996.

WYDER, M. T. Yeasts in Dairy Products. **Federal Dairy Research Station Liebefeld**, n. 425, p. 1- 21, 2001. Disponível em: < <http://www.admin.ch/sar/fam> >
Acesso em: 26 de Outubro de 2004.