

Artigo**MICROBIOTA MESÓFILA AERÓBIA CONTAMINANTE DO LEITE UHT****Microbiota mesophilic aerobic contaminant UHT milk***Juliana Ramos PEREIRA^{1*}**Ronaldo TAMANIN²**Edson Antônio RIOS³**Victor Henrique Silva de OLIVEIRA⁴**Aline Artioli Machado YAMAMURA⁵**Vanerli BELOTTI⁶***RESUMO**

A produção nacional de leite tratado por ultra-alta temperatura (UHT) em 2011 foi de 5,81 bilhões de litros, representando assim 78% do leite fluido consumido no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo estudar a contaminação por aeróbios mesófilos (AM) em leite UHT, verificando o atendimento a padrões microbiológicos legais, classificando os grupos encontrados segundo suas características morfo-tintoriais e discutindo a metodologia de enumeração determinada pela Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Das 60 amostras estudadas, 23 (38,3%) apresentaram resultados acima do padrão de 100 UFC/mL estabelecido pela IN 370 do MAPA para micro-organismos AM. Quando o *Bacillus sporothermodurans* foi considerado, as contagens máximas aumentaram 71,2% nas amostras integrais e 31,0% nas amostras desnatadas. Considerando-se as maiores diluições semeadas em que se obteve crescimento, foi possível o isolamento de 462 colônias de AM que, na coloração de Gram representaram 64,3% de bactérias Gram positivas e 9,5%, de bactérias Gram negativas. Fungos filamentosos e leveduras somaram 26,2%. Entre os Gram positivos predominaram cocos, *B. sporothermodurans* e, outros bacilos. Entre os Gram negativos predominaram os cocobacilos e os bacilos. Como as amostras representam lotes de leite UHT de importantes marcas do sul do país, os resultados demonstram que 11 das 15 marcas estudadas apresentaram excesso de AM, quando comparadas com o parâmetro legal. Os grupos de microrganismos presentes, sobretudo os Gram negativos que são sensíveis à temperatura, indicam possíveis falhas no processamento e/ou contaminação pós-processamento.

Palavras-chave: leite longa vida; aeróbios mesófilos; fungos filamentosos e leveduras.

1 Mestranda na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: julianapereira.mv@hotmail.com

2 Técnico do Laboratório de Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: lipoa.uel@gmail.com.

3 Mestrando na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: lipoa.uel@gmail.com

4 Mestrando na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: lipoa.uel@gmail.com

5 Doutora em Ciência Animal. Professora na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: alineartioli@uel.br.

6 Pós-doutorado em qualidade do leite. Professora na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: lipoa.uel@gmail.com

* Autor para correspondência: Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brasil. CEP 86.057-970. E-mail: julianapereira.mv@hotmail.com

ABSTRACT

In 2011 the national production of ultra-high temperature milk (UHT) was 5.81 billion liters, corresponding to 78% of fluid milk consumed in Brazil. The present work aimed to study UHT milk contamination by mesophilic aerobes (MA), verifying the accordance with microbiological standards, classifying the groups found according to its morpho-tintorial characteristics and discussing the methodology determined by Normative Instruction (NI) 62 from the Brazilian Ministry of Agriculture, Animal Husbandry and Supply. From 60 studied samples, 23 (38.3%) presented results above the 100 CFU/ mL standard established by NI 370 for (MA). When *B. sporothermodurans* was considered, maximum counts raised 71.2% in whole milk samples, and 31.0% in skimmed milk samples. Regarding the higher dilutions inoculated that have shown growth, it was possible to isolate 462 colonies of (MA) that, in Gram coloration corresponded to 64.3% Gram positive bacteria and 9.5% Gram negative. Molds and yeasts added up to 26.2%. Among Gram positive, there was a prevalence of cocci, *B. sporothermodurans*, and other Gram positive bacilli. Among Gram negative, the coccobacilli and bacilli prevailed. Considering that the samples represent UHT milk from important industries of southern Brazil, the results demonstrate that 11 out of the 15 studied brands showed high counts of (MA) when compared to the established standards. Furthermore, among the groups of microorganisms found in the samples, especially heat sensitive Gram negative bacteria, indicates possible failures in milk processing and/or post-processing contamination.

Keywords: UHT Milk; mesophilic aerobes; filamentous fungi and yeasts.

1 INTRODUÇÃO

Em 2011 o Brasil apresentou um crescimento de 4,5% na produção leite, com aproximadamente 32 bilhões de litros (EMBRAPA, 2012). Segundo dados da Associação Brasileira de Indústrias de Leite Longa Vida (ABLV) a produção nacional de leite tratado por (UAT) Ultra-Alta Temperatura, ou UHT (Ultra High Temperature), em 2011 foi de 5,81 bilhões de litros, representando 78% do total do leite fluido consumido no Brasil (GUERRA, 2012).

O leite UHT ou longa vida é submetido a tratamento térmico, por 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 e 150° C, em fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32° C e envasado em condições assépticas em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

Segundo Franco; Langraf (2008), o processo de Ultra Alta Temperatura, objetiva a destruição de todas as células viáveis presentes no alimento. No entanto, Martins et al. (1999), ressalta que tecnicamente o leite que passa pelo processo de ultrapasteurização não sofre esterilização absoluta, uma vez que, além de esporos, bactérias extremamente termorresistentes, como o *Bacillus sporothermodurans* podem permanecer no produto final.

A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos tem sido utilizada como indicador de qualidade sanitária dos alimentos, possibilitando estimar seu prazo de validade e avaliar sua qualidade (BARROS, 2004).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT, determina que em relação aos requisitos microbiológicos, o leite UAT não deve apresentar micro-organismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento, e que após incubação da embalagem fechada a 35-37°C durante sete

dias, o número de micro-organismos aeróbios mesófilos deve ser de no máximo, 100 UFC/mL (BRASIL, 1997).

Há várias técnicas, preconizadas por diversos órgãos nacionais e internacionais, para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite. A Portaria nº 370 (BRASIL, 1997) indica a metodologia FIL 100B: 1991 (ANVISA, 2001). No entanto, posteriormente, a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003) trouxe uma metodologia específica para contagem de aeróbios mesófilos em produtos UHT, denominada “Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis capazes de causar alteração em produtos lácteos líquidos UHT”, utilizada neste trabalho. Esta metodologia determina a identificação e exclusão do *Bacillus sporothermodurans* da contagem final.

Pesquisas relataram altas contagens de micro-organismos em leite UHT e atribuíram sua presença a falhas no sistema de envase e à má higienização dos equipamentos utilizados no tratamento térmico (WESTHOFF, 1981; WESTHOFF; DOUGHERTY, 1981). As características morfo-tintoriais auxiliam na classificação dos micro-organismos e na determinação da origem da contaminação, pela relação que existe entre os principais grupos bacterianos e seus mais frequentes habitats.

O objetivo deste trabalho foi estudar a contaminação por aeróbios mesófilos em leite UHT, para verificar o atendimento a padrões microbiológicos legais; classificar os grupos encontrados segundo suas características morfo-tintoriais, e discutir a metodologia determinada pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 60 amostras de leite UHT, sendo 30 de leite integral e 30 de leite desnatado,

comercializadas em supermercados da cidade de Londrina, Paraná (PR). As amostras pertenciam a 15 diferentes marcas, sendo 6 produzidas no Paraná, 6 no Rio Grande do Sul e 3 em Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre novembro de 2011 e julho de 2012, com média de 36 dias após a fabricação.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Universidade Estadual de Londrina, onde foram incubadas a 36°C (+ ou - 1°C), em sua embalagem original fechada, durante 7 dias, para verificação da ocorrência de alterações como estufamento, coagulação, floculação, dessoração e contagem de aeróbios mesófilos (BRASIL 1997; BRASIL 2003).

A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos foi realizada através de prova oficial do Ministério da Agricultura para produtos lácteos UHT, intitulada "Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis capazes de causar alteração em produtos lácteos líquidos UHT" (BRASIL, 2003), utilizando sementeira em superfície, simultaneamente em ágar BHI e ágar nutriente isento de extrato de levedura, e incubando-se a 30° por 72 horas.

As características morfo-tintórias dos micro-organismos isolados foram avaliadas utilizando-se a coloração de Gram (CARTER, 1988). Todas as colônias crescidas nas placas das maiores diluições de cada amostra foram submetidas à coloração pelo método de Gram. A identificação do *B. sporothermodurans*, foi baseada nas características morfo-tintórias, conforme descrito por Busatta et al. (2005), que é presuntiva para caracterização do mesmo.

As colônias suspeitas de serem fungos filamentosos ou leveduras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina para identificação. As colônias foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose, em temperatura ambiente por um período de 7 a 14 dias. Para identificação foram realizadas análises macro e microscópicas. Para as análises microscópicas foram

preparados microcultivos conforme a técnica de Riddel (1950), corados com azul de algodão lactofenol. A identificação foi realizada observando-se estruturas como micélio, conídios e esporos, comparadas com as descrições de Lacazet al. (2002).

Os resultados das contagens foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL da amostra.

A análise estatística foi realizada com o programa Microsoft Excel® 2010. Para a realização do Teste "T" os valores foram convertidos para log.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a incubação a 36°C por sete dias, nenhuma das embalagens de leite UHT apresentou alterações visíveis como estufamento ou coagulação.

Com relação à contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos, a técnica utilizada (BRASIL, 2003) determina que se exclua da contagem o *B. sporothermodurans*. Assim, foram encontradas 23 (38,3%) amostras com contagens acima de 100 UFC/mL. A metodologia determina a exclusão dos *B. sporothermodurans*, por serem considerados micro-organismos não patogênicos e não deteriorantes (BARROS; PANETTA, 2006), não deixando claro qual a natureza dos demais 100 UFC/mL de aeróbios mesófilos permitidos.

Como para leite UHT não há determinação legal para pesquisa de outros micro-organismos indicadores como coliformes 30°C ou 45°C, estafilococos, ou patógenos específicos, não é possível afirmar que entre os 100 UFC/ml permitidos pela Portaria nº 370 (BRASIL, 1997), não estejam presentes os deteriorantes ou patógenos. Além disso, essa metodologia aumenta a contagem de aeróbios mesófilos real do produto, para mais de 100 UFC/mL, quando se inclui o *B. sporothermodurans*.

A legislação da União Europeia (CONSELHO DA COMUNIDADE EUROPEIA-CCE, 1992), determina que, após incubação a 30°C durante 15 dias, o leite UHT apresente no máximo 100 UFC/

Tabela 1 – Distribuição dos resultados da contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos, com e sem exclusão dos *Bacillus sporothermodurans*, em 60 amostras de leite UHT coletadas no comércio de Londrina-PR, entre novembro de 2011 e julho de 2012.

UFC/mL	Aeróbios Mesófilos (Excluindo BS)			Aeróbios Mesófilos (Incluindo BS)		
	Integral n (%)	Desnatado n (%)	Total n (%)	Integral n (%)	Desnatado n (%)	Total n (%)
<10	9 (30,0)	6 (20,0)	15 (25,0)	8 (26,7)	6 (20,0)	14 (23,3)
10 - 101	9 (30,0)	13 (43,3)	22 (36,7)	10 (33,3)	11 (36,7)	21 (35,0)
101 - 201	6 (20,0)	6 (20,0)	12 (20,0)	5 (16,7)	5 (16,7)	10 (16,7)
201 - 301	4 (13,3)	1 (3,3)	5 (8,3)	3 (10,0)	3 (10,0)	6 (10,0)
≥ 301	2 (6,7)	4 (13,3)	6 (10,0)	4 (13,3)	5 (16,7)	9 (15,0)
Total	30 (100,0)	30 (100,0)	60 (100,0)	30 (100,0)	30 (100,0)	60 (100,0)

BS: *Bacillus sporothermodurans*, UFC: Unidade formadora de colônia.

mL de aeróbios mesófilos, não determinando qualquer exclusão. A Tabela 1 apresenta os intervalos de contagens obtidos com e sem exclusão do *B. sporothermodurans*.

Das 15 marcas analisadas, 11 (73,3%) apresentaram contagens acima do permitido pela legislação, correspondendo a 4 (66,6%) das 6 marcas provenientes do Paraná, 5 (83,3%) das 6 produzidas no Rio Grande do sul e 2 (66,6%) das 3 marcas de Santa Catarina.

Se avaliássemos os resultados considerando a legislação europeia, pelo menos 25 (41,6%) amostras de 12 (80,0%) diferentes marcas apresentariam resultados fora dos padrões para contagem de aeróbios mesófilos, elevando de 4 para 5 (83,3%) as marcas comprometidas no Paraná. No entanto, seria esperado um número ainda maior de amostras em desacordo, caso as amostras tivessem sido incubadas por 15 dias, como determina aquela legislação.

Estatisticamente, não foram encontradas diferenças nas médias das contagens entre as amostras integrais e desnatadas, excluindo ou não *B. sporothermodurans*. Quando este foi considerado, as contagens máximas aumentaram 71,2% nas amostras integrais e 31,0% nas amostras desnatadas (Tabela 2).

Diferentes autores estudando leite UHT em várias regiões do Brasil relataram contagens fora do padrão estabelecido pela Portaria nº 370 (BRASIL, 1997) para contagem de aeróbios mesófilos (COELHO et al. 2001, VIDAL-MARTINS et al. 2005; BERSOT et al. 2010, TAMANINI et al. 2011). No entanto Rezer (2010) e Rossi Junior et al. (2006) não encontraram amostras fora do padrão para estes micro-organismos.

A presença de aeróbios mesófilos pode estar relacionada a problemas no tratamento térmico, contaminação pós-processamento, ou a problemas na integridade das embalagens utilizadas no armazenamento destes leites (BOOR; MURPHY, 2002).

Quanto aos resultados observados na coloração de Gram, (Tabela 3), foram isoladas 462 colônias de aeróbios mesófilos, sendo 64,3% Gram positivos, 9,5% Gram negativos e 26,2% de fungos filamentosos

e leveduras. Dentre os Gram positivos, o predomínio foi de cocos 57,2%, seguidos de 29,3% de *B. sporothermodurans*, 9,1% de outros bacilos e 4,4% de cocobacilos. Entre os Gram negativos, os cocobacilos foram predominantes com 79,5%, seguidos dos bacilos com 20,5%. Dentre os 26,2% fungos, houve predomínio de fungos filamentosos com 67,8% e leveduras corresponderam a 32,2%.

Bersot et al. (2010) analisaram 150 amostras de leites UHT integrais de 3 diferentes marcas e encontraram a predominância de cocos Gram positivos. Coelho et al. (2001) selecionaram 174 colônias para identificação morfológica e todas foram identificadas como Gram-positivas, sendo 98,3% de bastonetes e 1,7% cocos. A maior resistência das bactérias Gram positivas ao calor, em relação às Gram negativas, é bastante conhecida. Entre as Gram positivas, Jay (2005) aponta os cocos como sendo geralmente mais resistentes ao calor do que bastonetes não formadores de esporos.

Integrantes do gênero *Bacillus* representaram 38,4% dos Gram positivos encontrados. Esses micro-organismos são de origem ambiental e apresentam capacidade de formação de esporos. São de grande importância em alimentos, pois em várias espécies, tanto a forma vegetativa como os esporos são altamente resistentes ao calor. Os esporos são ainda bastante resistentes a radiações ionizantes, compostos químicos, desidratação e congelamento (FRANCO; LANGRAF, 2008). Alguns representantes deste grupo são *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, o *B. sporothermodurans* e a espécie *B. cereus* que tem potencial patogênico (JAY, 2005). A contaminação do leite por esporos pode ocorrer na propriedade produtora ou na indústria processadora. De acordo com Barros; Panetta (2006), o *B. sporothermodurans*, não é patogênico e não causa alteração físico-química ou sensorial no leite. Porém, segundo Vaerewijck et al. (2001) a presença de células germinadas pode tornar o leite inaceitável para consumo.

A presença de *B. sporothermodurans* foi verificada no presente trabalho em 14 (23,3%) amostras

Tabela 2 – Distribuição das médias e contagens mínimas e máximas, de micro-organismos aeróbios mesófilos, com e sem exclusão do *Bacillus sporothermodurans* em 60 amostras de leite UHT produzidas do sul do país e comercializadas em Londrina-PR entre novembro de 2011 e julho de 2012.

Análises	Contagens médias (UFC/mL)			Contagens mínimas(UFC/mL)		Contagens máximas (UFC/mL)		
	I	D	T	I	D	I	D	T
Aeróbios Mesófilos (Excluindo BS)	102 ^a	139 ^a	120	<10	<10	375	850	612
Aeróbios Mesófilos (Incluindo BS)	168 ^a	190 ^a	179	<10	<10	1300	1350	1325

Médias seguidas pela mesma letra na linha, para cada um dos parâmetros analisados não diferem entre si pelo teste T ao nível de 5% de probabilidade.

BS: *Bacillus sporothermodurans*, UFC: Unidade formadora de colônia, I: integral; D: desnatado; T: total.

Tabela 3 – Distribuição dos resultados da coloração de Gram de 462 colônias isoladas de amostras de leite UHT, coletadas no comércio de Londrina-PR, entre novembro de 2011 e julho de 2012.

Classificação morfológica de colônias de aeróbios mesófilos								
UFC/mL	C(+)	BS	Fungos filamentosos	Leveduras	CB(-)	B(+)	CB(+)	B(-)
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<10	0 (0,0)	3 (3,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
10 - 101	74 (43,5)	10 (11,5)	24 (29,3)	6 (15,4)	2 (5,7)	4 (14,8)	6 (46,2)	1 (11,1)
101 - 201	46 (27,1,0)	8 (9,2)	16 (19,5)	19 (48,7)	6 (17,1)	3 (11,1)	2 (15,4)	1 (11,1)
201 - 301	23 (13,5)	35 (40,2)	16 (19,5)	3 (7,7)	2 (5,7)	7 (25,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
≥ 301	27 (15,9)	31 (35,6)	26 (31,7)	11 (28,2)	25 (71,4)	13 (48,1)	5 (38,5)	7 (77,8)
Total	170(36,8%)	87(18,8%)	82(17,7%)	39(8,4%)	35(7,6%)	27(5,8%)	13(2,8%)	9(1,9%)

C: Cocos; BS: Bacillusporo thermodurans; CB: Cocobacilo; B: Bacilo; (-): Gram positivo; (+): Gram Negativo.

provenientes de 9 (60%) das marcas analisadas. Diferente dos outros micro-organismos, sua presença foi observada mesmo nas amostras com menores contagens, reforçando sua resistência térmica. Busatta et al. (2005) pesquisaram 11 marcas de leite UHT, verificaram que 6 marcas (54,5%) apresentavam-se contaminadas por *B. sporothermodurans*, Rezer (2010) não detectou a presença deste micro-organismo em nenhuma amostra estudada.

No presente trabalho, micro-organismos Gram-negativos representaram 9,5% das colônias isoladas das 60 amostras. Bersot et al. (2010) também encontraram micro-organismos Gram negativos em parte das 150 amostras analisadas, variando de 5,5 a 27,8% entre as 3 marcas estudadas. Considerando a integridade observada nas embalagens no presente trabalho e a presença de bactérias Gram negativas, pode-se atribuir as contagens acima do padrão à contaminação pós-processamento. Micro-organismos Gram negativos são bastante sensíveis à temperatura, devido à composição da sua parede o que significa que sua presença está relacionada à contaminação pós-processamento. Ainda, nestes casos a origem da contaminação deve estar relacionada ao ambiente de processamento ou à água contaminada, por serem estes os habitats da maioria destas bactérias.

Os fungos filamentosos foram encontrados em 19 (31,7%) das amostras de leite avaliadas de 13 (86,7%) marcas diferentes, as leveduras foram encontradas em 19 (31,7%) amostras (Tabela 4). Segundo a literatura, o gênero *Candida sp.* é o mais comum presente em leite e não provoca alterações significativas no produto (TRONCO, 2008). A presença de fungos filamentosos e leveduras é um indicativo de práticas sanitárias insatisfatórias e também pode estar relacionada a falhas no tratamento térmico, contaminação pós-processamento ou problemas na contaminação da embalagem (BOOR; MURPHY, 2002). Também há relatos de resistência de leveduras e mofo a tratamentos térmicos. Ruz-Peres et al. (2010) estudando 275 estirpes de leveduras isoladas de amostras de leite cru bovino encontraram

76,0% resistente à pasteurização rápida, 1,09% à pasteurização lenta, e 17,45% foram resistentes à fervura. Neste contexto, há grande possibilidade de que as leveduras sejam também resistentes ao processo UHT, o que carece de outros estudos.

Tabela 4 – Distribuição das espécies de fungos filamentosos encontrados em 19 das 60 amostras de leite UHT comercializadas em Londrina-PR entre novembro de 2011 e julho de 2012.

Fungo	%
<i>Ulocladium sp.</i>	21,95
<i>Acremonium sp.</i>	14,63
<i>Stysanus sp.</i>	9,76
<i>Oospora spp.</i>	9,76
<i>Mucor spp.</i>	8,54
<i>Moniliella sp.</i>	8,54
<i>Fusarium spp.</i>	8,54
<i>Aspergillus spp.</i>	4,88
<i>Myceliasterilia</i>	3,66
<i>Moniliasitophila</i>	3,66
<i>Cladosporium spp.</i>	3,66
<i>Alternaria spp.</i>	2,44
Total	100,00

Como o tratamento térmico UHT é bastante agressivo, e apenas o *B. sporothermodurans* é considerado resistente a este processo, podemos inferir que os demais grupos encontrados são resultantes de contaminação pós-processamento. Exceção pode ser feita as leveduras que carecem de mais estudos sobre sua resistência ao tratamento UHT.

Segundo Jay (2005), a maior resistência ao calor apresentada por grandes populações celulares pode ser devida à maior chance de haver organismos com diferentes graus naturais de resistência ao calor. Considerando que a carga bacteriana do leite cru utilizado como matéria prima para o leite UHT, tem como limite legal 600 mil UFC de aeróbios mesófilos/mL (Brasil, 2011), pode-se supor que há chances

de haver, entre estes, micro-organismos que sejam resistentes ao tratamento térmico, a exemplo do *B. sporothermodurans*.

4 CONCLUSÕES

Considerando que as amostras representam lotes de leite UHT de importantes marcas produzidas no sul do país, e que 11 das 15 marcas estudadas apresentaram excesso de aeróbios mesófilos, quando comparadas com o parâmetro legal, pode-se inferir que há dificuldades em produzir leite UHT atendendo a legislação.

Os grupos de micro-organismos encontrados foram predominantemente Gram positivos e, sendo a maioria cocos. Como consequência da natureza do processamento UHT, é provável que a presença de cocos, tenha origem pós-processamento térmico, indicando, uma contaminação no final da produção. Essa hipótese é reforçada pela presença de micro-organismos Gram negativos, que são bastante sensíveis ao tratamento térmico.

A legislação é dúbia sobre a metodologia de contagem de aeróbios mesófilos a ser utilizada para leite UHT, necessitando atualização, de forma a indicar claramente que metodologia deve ser utilizada e, de preferência, coincidir com as determinações internacionais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, em anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://sisistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 27 set. 2012.

BARROS, V.R.M. **Estudo de fatores de patogenicidade de Bacillus spp isolados em leite UHT**. 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2004.

BARROS, V.R.M., PANETTA, J.C. Esporulados mesófilos e a qualidade do leite UHT. In: MESQUITA, A.J., DÜRR, J.W., COELHO, K.O. (Org.). **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. v. 1, p. 261-272.

BERSOT, L. S. et al. Avaliação microbiológica e físico-química dos leite UHT produzidos no Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.645-652, 2010.

BOOR, K. J.; MURPHY, S. C. Microbiology of market milks. In: ROBINSON; R. K. **Dairy microbiology handbook**. 3 ed. New York: John Wiley, 2002. p. 91-122.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19700.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CASIAN, R. L. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UHT integral e desnatado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.3, p.408-411, 2005.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1988. 249p.

CONSELHO DA COMUNIDADE EUROPEIA (CCE). Directiva nº 92/46 de 16 de julho de 1992. **Normas sanitárias relativas à produção de leite cru, de leite tratado termicamente e de produtos à base de leite e à sua colocação no mercado**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/mr03_pt.pdf>. Acesso em: 27 set. 2012.

COELHO, P. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.2, p.1-7, 2001.

EMPRAPA. **Conjuntura do mercado lácteo**. Juiz de Fora, v.5, n.41, p.1-41, 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/948946>>. Acesso em: 28 out. 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GUERRA, J. **O boom do leite UHT no Brasil**. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/24736/o%3C%3Eboom%3C%3E-do-leite-ugt-no-brasil.htm>>. Acesso em: 27 set. 2012.

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

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1120 p.

MARTINS, R. S.; SANTOS, C. V.; TEIXEIRA, S. R. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. **Organizações rurais e agroindustriais**, Lavras, v. 1, n. 2, p. 55-69, 1999.

REZER, A. P. S. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, New York, v.42, n. 2, p.265-270, 1950.

ROSSI JÚNIOR, O. D. et al. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.27-32, 2006.

RUZ-PEREZ, M et al. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de Leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.17, n.1, p.62- 70, 2010.

TAMANINI, Ret al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.66, n.382, p.27-33, 2011.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C.M. Micro-organismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.396-400, 2005.

VAEREWIJK, M.J.M. et al. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.91, n.6, p 1074-1084, 2001.

WESTHOFF, D.C. Microbiology of ultra-high temperature milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, n.1, p. 167-173, 1981.

WESTHOFF, D.C.; DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, n.4, p. 572-578, 1981.