

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS  
PSICROTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
TERMORRESISTENTES EM LEITE CRU**

**Kleber Barros Nunes**

Médico Veterinário

RIO LARGO – ALAGOAS - BRASIL

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS  
PSICROTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
TERMORRESISTENTES EM LEITE CRU**

**Kleber Barros Nunes**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Tania Marta Carvalho dos Santos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**RIO LARGO – ALAGOAS - BRASIL**

**Outubro de 2017**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias**  
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

N972c Nunes, Kleber Barros  
Caracterização bioquímica de bactérias psicotróficas e produção de enzimas termorresistentes em leite cru / Kleber Barros Nunes. – 2017.  
64 p. ; il.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Marta Carvalho dos Santos

Inclui bibliografia

1. Gram-negativas 2. Proteases 3. Lipases I. Título

CDU: 57

## TERMO DE APROVAÇÃO

KLEBER BARROS NUNES

### CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS TERMORRESISTENTES EM LEITE CRU.

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 18/10/2017



Prof. Dr. Tania Marta Carvalho dos Santos  
Orientadora (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Cícero Cerqueira Cavalcanti Neto  
Membro Externo ( CECA/UFAL )



Prof. Dr. José Teodorico de Araújo FILHO  
Membro Interno (CECA/UFAL)

Rio Largo – AL

2017

Deus nosso Pai, que Sois todo Poder e Bondade, dai a força a aquele que passa pela provação, dai à luz a aquele que procura a verdade, pondo no coração do homem a compaixão e a caridade.

Deus, dai ao viajor a Estrela Guia, ao aflito a consolação, ao doente o repouso.

Pai, dai ao culpado o arrependimento, ao Espírito a Verdade, à criança o Guia ao órfão o pai.

Senhor, que a Vossa Bondade se estenda sobre tudo que criastes.

Piedade, Senhor, para aqueles que Vos não conhecem, esperança para aqueles que sofrem.

Que Vossa Bondade permita aos Espíritos Consoladores derramarem por toda a parte a Paz, a Esperança e a Fé.

Deus! Um raio, uma faísca do Vosso amor pode abrasar a terra; deixai-nos beber na fonte dessa bondade fecunda e infinita, e todas as lágrimas secarão, todas as dores se acalmarão.

Um só coração, um só pensamento subirá até Vós, como um grito de reconhecimento e de amor.

Como Moisés sobre a montanha nós vos esperamos com os braços abertos. Oh! Poder! Oh! Bondade! Oh beleza! Oh! Perfeição! E queremos de alguma sorte merecer a Vossa misericórdia.

Deus! Dai-nos a força de ajudar o nosso progresso a fim de subirmos até Vós. Dai-nos a caridade pura, a humildade, a fé e a razão. Dai-nos a simplicidade Pai, que fará das nossas almas o espelho onde se há de refletir a Vossa divina imagem.

Que assim seja.

Dedico este trabalho à minha esposa e meus filhos, meu alicerce e razão maior de minha busca pelo aprimoramento profissional e crescimento pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Ser de luz maior, que me guia, fortalece e protege em todos os momentos, por ter-me agraciado com a conclusão de mais esta caminhada em minha vida.

À minha esposa Annelise, pelo apoio e incentivo, companheirismo e cumplicidade e, acima de tudo, pelo amor que nos une, saiba que sem você não iria longe. Aos meus filhos, Matheus, Giovanna e João Pedro, responsáveis pelas grandes alegrias da minha vida, pelo carinho e compreensão no decorrer desta jornada. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus pais, José Geraldo e Maria de Lourdes, por terem ensinado a mim e minhas irmãs, a trilharmos o caminho do bem e da retidão. Não mediram esforços para o alcance de minha formação profissional e, sobretudo, no meu desenvolvimento pessoal.

Às minhas irmãs, Pollyanna, Rossana e Louisianna, por sempre torcerem e acreditarem em mim.

À Secretaria Municipal de Saúde e Centro de Controle de Zoonoses –CCZ, de Maceió, onde sou vinculado, nas pessoas de Thaís Barreto, Fernanda Rodrigues, Samy Ibrahim, Jéssica Carolina e Rael Lucas, pelo apoio e disponibilidade quanto à flexibilização de minha carga horária de trabalho, para o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas médicos veterinários, Vânia Teixeira, Sandra Souto, Lindomar Machado, Ísis Mesquita e Emanuel Wianês, pelo apoio e compreensão, absorvendo sempre que necessário, um pouco de minhas atribuições junto ao CCZ.

À minha orientadora, Dra. Tânia Marta Carvalho dos Santos, por seu comprometimento, compreensão, paciência e confiança, estando sempre à disposição com seu conhecimento e desprendimento, durante todo o percurso deste projeto.

À Yamina, amiga conquistada ao longo do caminho, contribuindo decisivamente para a condução das análises realizadas.

Aos amigos que transmitem jovialidade e alegria ao laboratório de microbiologia do CECA-UFAL – Beatriz, Kariane, Micheline, Rosana, Érica, João Manuel, Bruna, Matus, Carlos, Fernanda, Saul, Irwin e Marwin, que se disponibilizaram em algum momento com a realização das análises.

Ao amigo e médico veterinário Paulo Miranda, pelo apoio junto aos produtores de leite do Agreste e Sertão do Estado, fator primordial para a execução do projeto.

Aos produtores de leite, nas pessoas do Sr. Gilson e seu filho Wallisson, de Girau do Ponciano que, com o maior apreço e desprendimento, abriram as porteiras de suas propriedades para a coleta das amostras.

A todos, minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 REVISÃO</b>	14
2.1 Legislação	14
2.2 Leite	15
2.2.1 Importância	16
2.2.2 Composição	16
2.3 Principais microrganismos contaminantes do leite	18
2.3.1 Mesófilos	19
2.3.2 Termodúricos	20
2.3.3 Psicotróficos	22
2.4 Multiplicação de Psicotróficos	25
2.5 Fontes de Contaminação	26
2.6 Qualidade do Leite	28
2.7 Refrigeração	30
2.8 Atividade Enzimática	34
2.9 Proteólise	37
2.10 Microrganismos Proteolíticos	39
2.11 Lipólise	41
2.11.1 Lipase Natural	42
2.11.2 Lipases Bacterianas	43
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	45
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	46
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	55
5.1 Localização	55
5.2 Coleta das Amostras	55
5.3 Contagem, Isolamento e Identificação de Bactérias Psicotróficas	56
5.4 Caracterização dos Microrganismos	56
5.4.1 Testes para Análise das Características Morfo-tintoriais dos Isolados Bacterianos	56

5.4.1.1 Morfologia Celular	56
5.4.1.2 Coloração de Gram	56
5.4.1.3 Reação de Gram a partir da Reação de KOH 3%	56
5.4.1.4 Coloração de Esporos	56
5.4.2 Testes Bioquímicos	56
5.4.2.1 Metabolismo Oxidativo e/ou Fermentativo da Glicose em Meio OF	56
5.4.2.2 Teste de Oxidase	56
5.4.2.3 Teste da Catalase	56
5.4.2.4 Crescimento em Agar MacConkey (MC)	57
5.4.2.5 Produção de Amônia a partir da Arginina	57
5.4.2.6 Teste de Motilidade, Produção de H <sub>2</sub> S e Indol em Meio SIM	57
5.4.2.7 Teste de Agar de Ferro e Açúcar Tríplice em Meio de TSI	57
5.4.2.8 Teste de Vermelho de Metila (VM)	57
5.4.2.9 Teste de Vogues-Proscauer (VP)	57
5.4.2.10 Teste de Citrato de Simmons	57
5.4.2.11 Agar Lisina Ferro	57
5.4.2.12 Teste de Urease	57
5.4.2.13 Formação de Ácidos a partir de Carboidratos	57
5.4.2.14 Testes Enzimáticos	57
5.4.2.14.1 Proteólise	57
5.4.2.14.2 Lipólise	57
5.4.2.14.3 Lecitinólise	57
5.5 Descrição dos Testes de Caracterização dos Microrganismos	57
5.5.1 Reação de KOH 3%	57
5.5.2 Coloração de Gram	58
5.5.3 Motilidade no meio SIM, Teste de Produção de Indol e H <sub>2</sub> S	58
5.5.4 Teste de Catalase	58
5.5.5 Teste de OF	59
5.5.6 Produção de Amônia a partir da Arginina	59
5.5.7 Crescimento em Meio MacConckey (MC)	60
5.5.8 Teste de Oxidase	60
5.5.9 Teste de Agar de Ferro e Açúcar Tríplice em Meio de TSI	61

5.5.10 Teste de Vermelho de Metila (VM)	61
5.5.11 Teste de Vogues-Proscauer (VP)	62
5.5.12 Teste de Urease	62
5.5.13 Teste de de Citrato de Simmons	62
5.5.14 Agar Lisina Ferro (Lia)	63
5.5.15 Formação de Ácidos a partir de Carboidratos	63
5.5.16 Coloração de Esporos	64
5.5.17 Caracterização das Bactérias Isoladas quanto à Produção de Enzimas Hidrolíticas	65
5.6 Identificação dos Gêneros	66
5.7 Análise Estatística	66
<b>6 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>67</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS E PRODUÇÃO DE ENZIMAS TERMORRESISTENTES EM LEITE CRU</b>	
RESUMO	68
ABSTRACT	68
INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

## RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho isolar e caracterizar bioquimicamente a microbiota psicotrófica, bem como avaliar seu poder deteriorador no leite cru refrigerado, armazenado em tanques de expansão, individuais e coletivos, de propriedades das regiões Agreste e Sertão do Estado de Alagoas. Foram analisadas amostras de leite coletadas em 23 tanques individuais e 13 coletivos, onde se verificou a presença de bactérias psicotróficas nos dois tipos de tanques de refrigeração, sendo um total de 105 isolados bacterianos. Foi detectada a predominância de bactérias psicotróficas gram-negativas 78,09% (82/105), dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, enquanto que as bactérias gram-positivas foram da ordem de 21,90% (23/105) dos gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. *Pseudomonas* foi o gênero predominante com 43,81% (46/82). A grande maioria dos isolados bacterianos demonstrou alto poder de produção de enzimas extracelulares – protease, lipase e/ou lecitinase, evidenciando assim potencial deteriorador do leite e derivados. Estatisticamente, não foi significativa a diferença de produção enzimática pelos isolados entre tanques individuais e coletivos, não havendo dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de enzimas e o tipo de tanque.

**Palavras-chave:** Gram-negativas, Proteases, Lipases, *Pseudomonas*, Termodúricos.

## ABSTRACT

The goal of this study was the isolation and biochemical characterization of psychotrophic microbiota, evaluating its deteriorating potential on refrigerated raw milk stored in both individual and collective expansion tanks located in farms from Agreste and Sertão regions of Alagoas State. Milk samples from 23 (individual) and 13 (collective) tanks were analyzed, and the presence of psychotrophic bacteria was diagnosed in both types of refrigeration tanks, totalizing 105 bacterial isolates. There was a predominance of gram-negative psychotrophic bacteria 78,09% (82/105) from genus *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, whereas gram-positive bacteria represented 21,90% (23/105) of total isolates, from genus *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus*. In general, *Pseudomonas* was the most prevalent genus isolated 43,81% (46/82). The majority of bacterial isolates had high extracellular enzymes production – protease, lipase and/or lecithinase, which evidenced elevate deteriorating potential for milk and its derivatives. There was no significant difference on enzymatic production among isolates or between individual and collective tanks, as well as no dependency between total number of enzymatic producer bacterial isolates and tank type.

**Keywords:** Gram-negative, Proteases, Lipases, *Pseudomonas*, Thermotrophic.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o elevado grau de desenvolvimento dos microorganismos que se multiplicam no leite cru, caracteriza seu status como de qualidade inferior (LANGONI et al., 2011; CATANIO et al., 2012). Problemas no perfil microbiológico das águas, utensílios e equipamentos de ordenha com ineficiente higienização, além da sanidade animal e dos trabalhadores, patrocina efetivamente essa condição. É primordial que se reduza a carga microbiana – deterioradora e patogênica, do leite. Para tanto, a implantação de medidas higiênico-sanitárias, envolvendo toda a cadeia produtiva, desde instalações, utensílios e equipamentos de ordenha, passando pelos colaboradores e animais, se torna primordial para que se obtenha matéria-prima e produtos finais de qualidade satisfatória (YAMAZI et al., 2010).

A Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), estabelece o Regulamento que fixa a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve apresentar o Leite Cru Refrigerado nas propriedades rurais.

O leite, por si só, contém em sua constituição proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais, tornando-se um alimento bastante rico em nutrientes. Dessa forma, sua qualidade é foco de várias discussões dentro da produção leiteira em nosso país. Após ser secretado na glândula mamária, pode sofrer contaminação por microorganismos, de três formas principais: dentro do úbere, na superfície exterior deste e tetos e ainda, através dos equipamentos e utensílios de ordenha e/ou tanque de refrigeração (SANTOS; FONSECA, 2001; YAMAZI, et al., 2010). Portanto, a sanidade da glândula mamária, a implantação de medidas higiênicas durante a ordenha, bem como a limpeza adequada dos equipamentos e utensílios, além do ambiente em que o animal está instalado para tal, são fatores essenciais para que se reduza significativamente a proliferação microbiana no leite cru (GUERREIRO et al., 2003). Não podendo esquecer que, são de extrema importância a temperatura e o tempo de retenção do leite no tanque, visto que, estes dois aspectos, estão rigorosamente atrelados à proliferação microbiana e, tem como principal consequência, o aumento da carga bacteriana total (FONSECA, 1998; HORST 2006; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Lorenzetti (2006), afirma que a contaminação microbiana prejudica a qualidade do leite, interfere na industrialização, reduz o tempo de prateleira do leite fluido e derivados lácteos e pode colocar em risco a saúde do consumidor.

Apesar de representar menos de 10% da microbiota inicial em condições sanitárias adequadas, os microrganismos psicotróficos podem ter suas concentrações aumentadas significativamente quando em condições de higiene deficientes (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

Dessa forma, com esse trabalho objetivou-se Isolar e identificar, ao nível de gênero, bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado, bem como determinar a atividade enzimática – proteolítica, lipolítica e lecitinolítica das mesmas.

## 2 REVISÃO

### 2.1 Legislação

A Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 (IN 62), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado. Neste regulamento foram fixados os requisitos microbiológicos, físicos e químicos que o leite deve atender. Dentre estes, merece destaque a Contagem Bacteriana Total (CBT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS). Disciplina também, entre outros, as condições higiênico-sanitárias gerais para a sua Obtenção, bem como sua manutenção e transporte em tanques refrigerados (BRASIL, 2011).

Esta Instrução Normativa em seu artigo 1º determina:

Art. 1º Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002, que passam a vigorar com a seguinte redação:

Art. 1º Aprovar 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.

§ 1º Esta Instrução Normativa é aplicável somente ao leite de vaca.

§ 2º Os aspectos relacionados à remuneração ao produtor baseada na qualidade do leite devem ser estabelecidos mediante acordo setorial específico.

§ 3º O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA instituirá Comissão Técnica Consultiva permanente, com vistas à avaliação das ações voltadas para a melhoria da qualidade do leite no Brasil.

Esta IN 62 também estabelece o limite máximo para a contagem bacteriana total (CBT). A contaminação no leite passa a ser expressa em Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/ml), como também os limites para Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL. Assim, ficou determinado que, deverá haver

um decréscimo na CBT máxima ao longo dos anos. O quadro 1 demonstra estes valores.

Quadro 1 Requisitos microbiológicos, e de CCS, a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01.7.2008 Até 31.12.2011 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2010 até 31.12.2012 Regiões:N/NE	A partir de 01.01.2012 até 30.6.2014 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.01.2013 até 30.6.2015 Regiões:N/NE	A partir de 01.7.2014 até 30.6.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2015 a 30.6.2017 Regiões:N/NE	A partir de 01.7.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2017 Regiões: N / NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Fonte: Brasil (2011)

Ao introduzirmos mecanismos eficientes para a obtenção higiênica do leite, abrangendo todo o processo produtivo, desde a ordenha, passando pela estocagem até o seu transporte, certamente os riscos de contaminação serão reduzidos.

## 2.2 Leite

De acordo com a IN 62 – MAPA, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL 2011).

Entende-se por Leite Cru Refrigerado, o produto definido acima, refrigerado e mantido nas temperaturas constantes no Regulamento Técnico IN 62 - MAPA, transportado em carro-tanque isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado (BRASIL, 2011).

### 2.2.1 Importância

O leite é um fluido biológico complexo, um alimento rico em nutrientes considerado como importante fonte de proteína, energia, cálcio, fósforo e vitaminas e, em função de suas características bioquímicas e físicas, torna-se um substrato ideal para a proliferação de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; REIS et al., 2013).

Por possuir uma variada gama de nutrientes, tais como proteínas, vitaminas, minerais, principalmente o cálcio, gordura, carboidratos e água, é considerado um alimento perfeito para o consumo humano, indicado para todas as idades, além de sua grande importância em nossa economia (SOUZA, 2006).

### 2.2.2 Composição

Físico-quimicamente é constituído de uma mistura homogênea contendo um variado número de componentes (proteínas, gorduras, vitaminas, sais, enzimas, lactose, etc.), onde umas se encontram em emulsão (gorduras e substâncias associadas), outras em suspensão (caseínas ligadas a sais minerais), tendo ainda uma série de substâncias em dissolução (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.) O percentual de sua composição certifica a sua qualidade (PEREDA et al., 2005).

Percentualmente, o leite demonstra como principais constituintes: água, mais abundante, com 87,5%; gordura – 3,6%; proteína – 3,6%; lactose – 4,6%; sais minerais – 0,7%. Na água estão dissolvidos os demais constituintes (BEHMER, 1999). Pacheco (2011), afirma que as expressões Sólidos Totais (ST) ou Extrato Seco Total (EST), abrangem todos os constituintes do leite, com exceção da água.

De acordo com a IN 62, o leite cru refrigerado, deve se apresentar como um líquido branco opalescente homogêneo; com odor e sabor característicos, isentos de sabores e odores estranhos; ainda com ausência de neutralizantes da acidez e reconstituintes de densidade (BRASIL, 2011).

Deve ainda seguir os requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos relacionados nos Quadros 2 e 3.

A denominação qualidade engloba todo o procedimento de produção. Abrange desde a higiene da ordenha até o resfriamento do leite, sendo estes, conseqüentemente, aspectos primordiais para que seja alcançada (RANGEL et al., 2009; GALVÃO JÚNIOR et al., 2010).

Além do mais, as etapas de higiene condizentes aos procedimentos de ordenha manual e mecânica, das propriedades rurais carecem adotar os métodos descritos pelo Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade (RTIQ) (BRASIL, 2011).

Quadro 2 Requisitos Físicos e Químicos do Leite

REQUISITOS	LIMITES
Matéria Gorda, g /100 g	Teor Original, com o mínimo de 3,0 (1)
Densidade relativa à 15/15 C g/mL O (2)	1.028 a 1.034
Acidez titulável, g ácido láctico/100mL	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado, g/100 g	mínimo 8,4
Índice Crioscópico	- 0,530 <sup>o</sup> H a -0,550 <sup>o</sup> H (equivalentes a - 0,512 <sup>o</sup> C e a -0,531 <sup>o</sup> C)
Proteínas, g /100g	mínimo 2,9

Fonte: Brasil (2011)

Nota nº (1): é proibida a realização de padronização ou desnate na propriedade rural.

Nota nº (2): dispensada a realização quando o ESD for determinado eletronicamente.

Quadro 3 Requisitos microbiológicos, físicos, químicos, de CCS, de resíduos químicos a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01.7.2008 Até 31.12.2011 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2010 até 31.12.2012 Regiões:N/NE	A partir de 01.01.2012 até 30.6.2014 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.01.2013 até 30.6.2015 Regiões:N/NE	A partir de 01.7.2014 até 30.6.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2015 a 30.6.2017 Regiões:N/NE	A partir de 01.7.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2017 Regiões: N / NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de 7,5 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 6,0 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 3,0 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 1,0 x 10 <sup>5</sup>
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de 7,5 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 6,0 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 5,0 x 10 <sup>5</sup>	Máximo de 4,0 x 10 <sup>5</sup>
Pesquisa de Resíduos de Antibióticos/outros Inibidores do crescimento microbiano: Limites Máximos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos MAPA				
Temperatura máxima de conservação do leite: 7° C na propriedade rural/Tanque comunitário e 10° C no estabelecimento processador.				
Composição Centesimal: Índices estabelecidos na Tabela 1 do RTIQ.				

Fonte: Brasil (2011)

### 2.3 Principais microorganismos contaminantes do leite

As bactérias são os principais microrganismos contaminantes do leite. Contudo, vírus, fungos e leveduras participam desse processo minimamente, apesar de serem elementos consideráveis em certas circunstâncias (BRITO et al., 2003).

A microbiota que predomina no leite cru, é a mesma encontrada no úbere e pele dos animais, bem como nos objetos e equipamentos usados quando se

procede a ordenha, predominando em circunstâncias habituais os microorganismos gram-positivos (MELDAU, 2005). Dentre os gêneros que predominam, incluem-se *Lactococcus*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Propionibacterium*, além de leveduras, porém em menor proporção (LAFARGE et al., 2004; MELDAU, 2005).

As bactérias que contaminam o leite são classificadas em três grupos principais, de acordo com a temperatura em que se desenvolvem:

- I- Mesófilas;
- II- Termodúricas;
- III- Psicotróficas.

### 2.3.1 Mesófilas

Microorganismos que têm sua presença quantificada pela Contagem Bacteriana Total (CBT), e que se desenvolvem muito bem em temperaturas entre 20 e 40°C e metabolismo fermentativo (HARDING, 1995).

Os aeróbios mesófilos, junto com os coliformes, são considerados os principais grupos de bactérias indicadores da qualidade do leite, indicando qualitativamente, como este produto foi obtido. Dependendo de onde se origine a amostra, seu aparecimento em elevado número, indica falhas nos mecanismos de higiene na sua produção, beneficiamento ou conservação (FRANCO; LANDGRAF, 1996). É considerado por Jay (2005), o grupo de bactérias que engloba o maior número de agentes da contaminação do leite, sejam deterioradores ou patogênicos.

Werncke (2012) relatou que esses microorganismos apresentaram contagens mais elevadas em propriedades com menor produção leiteira, quando comparadas com as de maior produção, como resultado da falta ou ineficiente incremento de boas práticas de manejo da produção como pré-dipping e secagem dos tetos. Vale salientar ser de extrema importância a qualidade da água que se utiliza, uma vez que é sabido da veiculação de bactérias através dos equipamentos de ordenha e refrigeradores para o leite (JOÃO et al., 2010; GUERRA et al., 2011).

Vallin et al. (2009), demonstraram que com o mínimo de ações de higiene durante a ordenha, tais como pré-dipping, limpeza e sanitização dos utensílios e tanques de refrigeração com detergente alcalino clorado a 2%, a população microbiana foi reduzida em média de 87,90% nas propriedades com ordenha manual e 86,99% nas que utilizam ordenha mecânica.

### 2.3.2 Termodúricas

São os microorganismos que se caracterizam por resistirem ao processo da pasteurização (30 minutos a 63°C ou 15 segundos a 72°C). Certamente são inativados a 120° C por 20 minutos (BRITO et al., 2003).

Essa microbiota resistente ao tratamento da pasteurização é composta por micro-organismos termorresistentes (termodúricos), e por aqueles formadores de esporos (esporulados). Os primeiros resistem a altas temperaturas, porém, não multiplicam-se à essas temperaturas (FRANCO; LANDGRAF; 2008). Já os esporulados têm a habilidade de alterar sua forma vegetativa para que assim possa sobreviver às condições extremas do meio (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008) somando-se ainda serem capazes de resistir aos processos de esterilização do leite, tais como: termização, secagem, concentração, pasteurização e esterilização (OLIVEIRA et al., 2000; WALSTRA et al., 2001). Destacam-se como termorresistentes os gêneros *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, enquanto que *Clostridium* e *Bacillus* são formadores de esporos (WALSTRA et al., 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Alguns destes microorganismos são capazes de se desenvolverem sob temperaturas de refrigeração do leite, produzindo muitas vezes proteases e/ou lípases, enzimas deteriorantes. Pertencem ao grupo dos microorganismos psicrotróficos (JAY, 2000).

Essas bactérias psicrotróficas, além de resistirem aos tratamentos esterilizantes, difundem e elaboram enzimas deteriorantes, dinamizando assim o processo. Em contra-ponto, os psicrotróficos não termodúricos são termo-lábeis, sendo eliminados pela pasteurização e ultra-alta temperatura (UHT). No entanto,

também são capazes de produzir enzimas termorresistentes e deteriorar o leite (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017).

Algumas bactérias termorresistentes não são esporuladas e suas células vegetativas são capazes de sobreviver à pasteurização, como o *Streptococcus thermophilus*, *Microbacterium lacticum* e algumas espécies de micrococos (WALSTRA et al. 2001). Segundo Silva et al.(2007), *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* podem apresentar essa característica frente à pasteurização do leite.

Estudos preliminares demonstram que alguns microrganismos termodúricos psicrotróficos também desempenham papel fundamental na deterioração do leite pasteurizado, uma vez que resistem à pasteurização e continuam a produzir enzimas proteolíticas, podendo estar diretamente relacionados à redução da vida útil desse leite. Ribeiro Júnior et al. (2014) avaliaram 20 amostras de leite cru refrigerado na região norte do estado do Paraná e encontraram média de  $3,5 \times 10^3$  UFC<sup>-1</sup>mL de termodúricos psicrotróficos. Esses mesmos autores isolaram 347 colônias puras e verificaram que 142 (40,1 %) apresentam halos de proteólise em ágar leite suplementado com solução de leite em pó desnatado.

Não só bactérias fazem parte desse grupo. Fungos também têm habilidade para se desenvolverem sob refrigeração e gerar enzimas proteolíticas. Alguns deles ainda são utilizados na indústria de alimentos, por apresentarem características desejáveis, transmitindo caracteres sensoriais peculiares para alguns produtos (POTTIER et al., 2008). Todavia, é necessário que novas pesquisas sejam realizadas, objetivando o estudo quanto a sua presença no leite cru, sua termorresistência, temperaturas de resfriamento que melhor se adaptam e poder deteriorante, para que assim se desenvolvam novas estratégias para o seu controle (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017).

Em estudo conduzido por Ribeiro Júnior et al. (2017), 20 amostras de leite foram analisadas, das quais 8(40%) demonstraram desenvolvimento, sendo obtidos 01 isolado bacteriano e 10 isolados psicrotróficos termodúricos fúngicos. A partir da avaliação dos halos produzidos pela proteólise ao redor das colônias cultivadas em placas de Agar de leite suplementadas, verificaram potencial proteolítico em todos os isolados, demonstrando que podem comprometer as características normais de

40% das amostras não considerando a contaminação pós-pasteurização. Os autores ainda afirmam que 90,9% da microbiota psicrófila termofílica do leite observada no estudo, era composta por leveduras e fungos filamentosos, os quais também apresentavam ação deteriorante, fato este que recomenda que as indústrias busquem medidas de controle para esse grupo de microrganismos, em vez de só fazê-lo com as bactérias do leite cru.

### 2.3.3 Psicrófilas

Os microrganismos que se desenvolvem sob baixas temperaturas recebem diversas denominações, dentre elas, as mais usadas são: psicrófilo, psicrófilo e criófilo. Etimologicamente, a palavra psicrófilo deriva do grego – psychro, que quer dizer frio, e philos que quer dizer gostar, afinidade. Assim sendo, o vocábulo psicrófilo resulta em microrganismos que se multiplicam em temperaturas baixas (COUSIN, 1982). Contudo, a utilização deste vocábulo tem sofrido restrições por alguns pesquisadores, pelo fato de resultar em microrganismos que preferem se desenvolver em temperaturas baixas, porém estes têm uma temperatura ótima de desenvolvimento variando em torno de 20°C ou mais (THOMAS; DRUCE, 1969, citado por COUSIN, 1982).

Já se sabe que existe um entendimento a respeito do fato de que alguns microrganismos possam conviver em dois grupos térmicos contíguos. Os termos psicró-tolerante e psicrófilo, certamente são os mais utilizados para aqueles mesófilos que têm a habilidade de desenvolvimento próximo de 0°C, sendo o último de utilização mais frequente na literatura (MORITA, 1975). Enfim, o termo psicrófilo foi recomendado em 1960 para qualquer microrganismo capaz de crescer sob temperaturas iguais ou menores que 7°C, independente de qual seja a melhor (THOMAS; THOMAS, 1973; MORITA, 1975; KRAFT; REY, 1979; COUSIN, 1982; PRATA, 2001).

As bactérias psicrófilas se caracterizam por terem a habilidade de se desenvolverem em baixas temperaturas – menor ou igual de 7°C, embora a temperatura ideal para seu crescimento, seja entre 20 e 30°C. São as principais responsáveis pelo deterioramento do leite cru refrigerado e de seus derivados. Ao

produzirem proteases, lipases e fosfolipases (lecitinases), as quais hidrolisam a proteína e a gordura do leite, estas bactérias desencadeiam a atividade deteriorante. Apesar de, a maior parte das bactérias psicotróficas não resistirem ao processo da pasteurização, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, persistindo mesmo ao tratamento UHT, continuando assim em atividade. A existência dessas enzimas termotolerantes, no leite cru, tem como consequência principal o prejuízo que trás à qualidade do leite UHT, uma vez que, seu armazenamento é por vastos períodos e em temperatura ambiente. Podemos elencar outros prejuízos trazidos pela ação dessas enzimas, tais como: variações no sabor e cheiro em diferentes produtos, como também a diminuição do rendimento dos queijos. (CHAMPAGNE et al., 1994; SØRHOUG; STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003; ARCURI et al., 2008).

No leite, os principais gêneros de bactérias psicotróficas são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (Gram-negativos); *Bacillus* e *Clostridium* (Gram-positivos). Destes, o Gênero *Pseudomonas* spp é o mais frequente. O processo de pasteurização elimina essas bactérias, porém, por resistirem a temperaturas altas, certas enzimas e esporos, produzidos respectivamente pelas gram-negativas e gram-positivas, são responsáveis por reações bioquímicas nos componentes do leite, ocasionando variações nas propriedades naturais do produto (HORST, 2006). Todavia, algumas bactérias psicotróficas estão relacionadas com intoxicações alimentares após a utilização do leite ou seus derivados, como é o caso da *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* (SHIRAY, 2010).

Os microorganismos do gênero *Pseudomonas* spp detêm uma melhor capacidade de desenvolvimento em meio resfriado, demonstrando um tempo de vida médio inferior que amostras de leite contendo outros gêneros bacterianos, ao serem armazenados sob temperaturas que variam em torno de 4 a 7°C (SMITHWELL; KAILASAPATHY, 1995).

Segundo Molineri et al. (2012), as bactérias psicotróficas são incorporadas ao leite originadas da contaminação dos utensílios e equipamentos de ordenha, como também da superfície externa do úbere e tetos, uma vez que, estas estão presentes normalmente nas águas não tratadas e ambiente em geral – solo e vegetação.

Murphy e Boor (2000) reforçam ainda que o leite e derivados podem se contaminar também através de mastites. São microorganismos que tendem a predominar na população do leite cru devido a capacidade de crescimento em ambientes refrigerados (ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007).

Quando o leite é obtido por meio de deficientes condições higiênico-sanitárias, a população psicotrófica pode ultrapassar o patamar de 75% de sua microbiota, contrariamente, quando este é obtido adequadamente, essas bactérias atingem até 10% da população do leite cru (SERRA, 2004).

Arcuri et al. 2008, relataram haver encontrado, após estudo na zona da mata mineira e sudeste carioca, pesquisando amostras de leite colhidas a partir de tanques de expansão refrigerados individuais e coletivos, números variando entre 100 e 10.000.000 de bactérias psicotróficas, predominando as gram-negativas, destacando-se as dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Sphingomonas* e *Yersinia*. Relatam ainda que o gênero *Pseudomonas* foi o mais isolado e *P. fluorescens* a espécie de maior predomínio. Ainda de acordo com o presente estudo, as bactérias psicotróficas gram-positivas mais evidenciadas, foram as dos Gêneros *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Kurthia* e *Staphylococcus*. Evidenciaram também, contagens de bactérias psicotróficas em tanques individuais, menores que 100.000 UFC/ml, contrastando com o número destas na maioria dos tanques coletivos, os quais ultrapassaram este montante. Sendo correto assim dizer, que a mescla de leite oriundo de vários produtores, como é o caso dos tanques coletivos, favorece demasiadamente os riscos de contaminação.

Garg (1990), Bramley e Mckinnon (1990) e Craven e Macauley (1993), verificaram em seus estudos com leite resfriado a existência de *Pseudomonas fluorescens*, sendo ainda a espécie que mais desenvolveu atividades proteolíticas e lipolíticas.

Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), verificaram em sua pesquisa não ter havido diferenças significativas quanto aos valores médios das contagens

bacterianas psicrotróficas cultivadas nos diferentes laticínios, sendo estas variando de 6,0 e 6,5 log UFCml<sup>-1</sup>.

Jayarao e Wang (1999) relatam já ter isolado microorganismos de grande importância na saúde pública, tais como: *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, *Yersinia* spp, além de cepas hemorrágicas de *Escherichia coli* associadas com eventos de enfermidades originadas a partir do consumo de leite, mesmo em reduzidas proporções, em tanques resfriadores de leite. Do mesmo modo, cepas de *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Clostridium perfringens*, responsáveis por vários casos de toxiinfecções alimentares através da ingestão de leite e derivados, já foram isolados. Todavia, merece especial atenção quando do consumo de produtos lácteos resfriados, as espécies *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*, as quais têm a capacidade de crescer em baixas temperaturas (COUSIN, 1982).

Zeni et al. (2013) citaram não haver padrão descrito na legislação para as contagens de microorganismos psicrotróficos. Porém, vários estudos têm demonstrado contagens bacterianas com grande potencial de interferir na qualidade dos produtos lácteos. Furtado (2005) revela que, se a contagem da microbiota psicrotrófica variar de  $5,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^6$  /ml, no leite refrigerado e, esse leite seja imediatamente pasteurizado, não há necessidade para apreensão. No entanto, a partir do momento que essa contagem bacteriana exceda  $5 \times 10^6$  / ml, promove um potencial risco de modificações das proteínas e gordura do leite. Ainda de acordo com o autor, a resistência térmica das enzimas elaboradas pelos psicrotróficos é o maior entrave dentro do processo.

#### 2.4 Multiplicação de Psicrotróficos

Furtado (2005) relata que a maioria dos microorganismos psicrotróficos se desenvolvem melhor à uma temperatura que varia de 20 a 30°C, demonstrando serem microorganismos mesófilos com capacidade de adaptação a temperaturas baixas devido a mudanças em seu metabolismo, sendo este crescimento alcançado de forma lenta. De modo geral, se submetidos a uma temperatura de 10°C,

alcançam um crescimento em 14 horas, contagem que pode se multiplicar por 10 quando mantidos a 4°C, e por 4 a 1°C.

O desenvolvimento de microorganismos psicotróficos em baixas temperaturas se caracteriza por uma etapa de latência ou adaptativa, denominada lag, que apresenta uma insignificante taxa de desenvolvimento. Sua continuidade transcorre de acordo com a temperatura de manutenção do leite, sendo mais duradoura quando essa é mais baixa (FOSTER, 1965).

Dentre os microorganismos psicotróficos, os do gênero *Pseudomonas* envolve espécies que apresentam um crescimento em menor espaço de tempo com temperaturas que variam de 0 a 7°C. Estas bactérias, isoladas do leite cru, apresentaram crescimento acelerado, com um tempo de multiplicação variando entre 08 e 12 horas quando submetidos a 3°C. Quando essa temperatura variou de 3 a 5°C, o crescimento ocorreu em um espaço de 5,5 a 10,5 horas, que é um tempo hábil para que um leite que contenha somente uma UFCml<sup>-1</sup> se deteriore num prazo de cinco dias (ARCURI, 2003).

Kumaresan, Annalvilli e Sivakumar (2007) em um de seus estudos, relataram que o menor desenvolvimento bacteriano significativo, foi sob a temperatura de 2°C, apresentando também uma reduzida atividade enzimática.

## 2.5 Fontes de Contaminação

Os microorganismos psicotróficos são considerados ubíquos por serem encontrados nos mais distintos ambientes, à qualquer época do ano (DRUCE; THOMAS, 1970; COUSIN, 1982). Seus isolamentos já foram relatados nos mais diversos substratos, tais como: águas doces e salgadas, águas paradas e correntes, cloradas ou não, na superfície e interior de diversos peixes, nos solos, plantas, gramas, fenos, cevadas, aveias, vegetações, hortaliças, resíduos, lixos, esterco, dejetos, animais, carnes, leites, sorvetes, farinhas, ar e poeira (THOMAS; THOMAS, 1973; COUSIN, 1982; JAYARAO; WANG, 1999).

A água, solo e vegetação, figuram como as mais importantes fontes de contaminação do leite (DRUCE; THOMAS, 1970; COUSIN, 1982).

O leite produzido na glândula mamária em situações normais é estéril. Durante sua obtenção, manipulação, e armazenagem na propriedade, pode sofrer contaminação por microorganismos existentes no ambiente, úbere, acessórios e equipamentos de ordenha e estocagem. A higiene adequada das salas e equipamentos de ordenha, como também de utensílios que têm contato com o leite, tais como, baldes, latões e tanque de refrigeração, irão determinar o nível de contaminação e a constituição da microbiota bacteriana. Dessa forma, um adequado padrão de limpeza e um eficiente processo de desinfecção das instalações, equipamentos e utensílios, favorecem ao baixo desenvolvimento bacteriano no leite cru (BRITO et al., 2003).

Após pesquisarem a ocorrência de psicotróficos no leite e em salas de ordenha, Prabha e Shankar (1994) constataram um percentual destes microorganismos da ordem de 81,26%.

O quadro 4 relaciona os microorganismos que mais contaminam o leite cru refrigerado com a origem e onde se deve atuar para que se minimize o processo.

Boas práticas de higiene resultam em contagem bacteriana total (CBT) abaixo de 20.000 UFC/ml, enquanto que elevadas taxas de CBT, denotam erros nos processos de sanitização e higiene de equipamentos e da ordenha, bem como irregularidades na armazenagem refrigerada do leite (RIBEIRO NETO et al., 2012).

Ações de controle da população bacteriana são definidas através da identificação dos microrganismos contaminantes do leite, quando observamos falhas no processo de higiene na produção primária (BRITO et al., 2003).

Quadro 4 Interpretação das análises microbiológicas do leite total do rebanho para identificar as possíveis fontes de contaminação do leite cru na fazenda

Grupos de bactérias	Fonte	Controle
Psicrotróficos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deficiências na higiene da ordenha;</li> <li>-Refrigeração inadequada do leite;</li> <li>- Água contaminada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ordenhar tetos limpos e secos; - Fazer a desinfecção dos tetos antes da ordenha;</li> <li>- Manter o leite refrigerado a 4°C ou ligeiramente menos. O leite deve alcançar esta temperatura em até três horas após a ordenha.</li> <li>- Fazer análise microbiológica da água e realizar o tratamento, se necessário;</li> <li>- Fazer regularmente a limpeza das caixas d'água.</li> </ul>
Termodúricos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deficiências crônicas ou persistentes na limpeza dos equipamentos de ordenha; - Tetos com sujeiras do solo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ordenhar tetos limpos e secos; - Fazer a desinfecção dos tetos antes da ordenha;</li> <li>- Rever a prática de limpeza dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração e utensílios.</li> <li>- Trocar regularmente os componentes de borracha dos equipamentos de ordenha.</li> </ul>
Coliformes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contaminação da cama e tetos com fezes; - Água contaminada.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ordenhar tetos limpos e secos; - Fazer a desinfecção dos tetos antes da ordenha;</li> <li>- Fazer análise microbiológica da água e realizar o tratamento, se necessário;</li> <li>- Fazer regularmente a limpeza das caixas d'água.</li> </ul>

Fonte: Brito et al., (2003)

## 2.6 Qualidade do Leite

Em se tratando do termo qualidade, Ishikawa (1993) assim o definiu: “Qualidade é desenvolver, projetar, produzir e comercializar um produto que é mais econômico, mais útil e sempre satisfatório para o consumidor”. A Organização Internacional de Normatização (ISO) define qualidade dos alimentos como “a totalidade de atributos e características de um produto ou serviço”.

O perfil microbiológico do leite é um poderoso critério para que se determine a sua qualidade, servindo, sobretudo, como indicador das circunstâncias higiênicas de sua obtenção e armazenagem, passando pela ordenha até o seu aproveitamento. Já é um parâmetro bastante utilizado em vários países, servindo em programas de remuneração, bonificando o produtor pela qualidade do produto (BRITO et al., 2003).

Em boas condições de higiene, o leite cru pode ter um nível de contaminação baixo. No entanto se o seu processo de obtenção como um todo, não observar padrões de higiene e limpeza eficientes, esta contaminação poderá atingir altas proporções (BRITO et al., 2003).

No Brasil, várias razões corroboram para que o nosso leite tenha uma qualidade questionável, dentre eles, destacamos problemas de cunho social, cultural, econômico e adversidades climáticas, que são agravados pela falta de apoio do setor público, principalmente pela magnitude da representatividade do leite na alimentação humana. Sendo apontado como um alimento perfeito devido a sua constituição dispor de nutrientes de fácil assimilação, o transforma em especial ambiente para o crescimento bacteriano, trazendo dificuldades para o alcance da qualidade (ZENI et al., 2013).

Somente com a refrigeração, o leite não atinge a qualidade necessária. É imprescindível a implantação rotineiramente de medidas que visem promovê-la em todos os elos do setor produtivo. Requer então a implementação de um planejamento de ações, que envolvam capacitação de produtores, manejo animal e da ordenha, além de boas práticas agropecuárias, sempre na busca da redução da carga bacteriana do leite cru. Este recurso é primordial para a qualidade final dos derivados do leite (ZENI et al., 2013).

Reche (2013), citando Santos e Cortinhas (2010), afirma que a qualidade microbiológica do leite assume um importante papel na busca de matéria-prima de qualidade, a qual, se deficiente, impõe limitações ao processamento, rendimento e aceitação dos derivados do leite, principalmente com a elevada competição que esses produtos enfrentam no mercado externo, além da aceitabilidade pelo mercado de consumo.

Brito et al. (2003) afirmam que diversos fatores interferem na qualidade do leite e seus derivados. Por exemplo, leite de vacas portadoras de mastites, apresenta teores menores de caseína, lactose, gordura, cálcio e fósforo, além de reduzir a produção animal. A ação lipolítica e proteolítica traz aos produtos lácteos alterações na textura, rancificação, odores e sabores estranhos, afora a gelificação do leite UHT, favorecida pelo longo período de refrigeração sob temperaturas mais altas.

Em propriedades que utilizam boas práticas de obtenção do leite, foi realizada uma pesquisa com duração de dois anos e verificação mensal da qualidade microbiológica. Os resultados demonstraram que *Pseudomonas* foi o mais frequente, porém com concentrações diversas nas amostras em que foram verificadas. *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, agentes patogênicos, ocorreram de modo ocasional. *Listeria monocytogenes* foi isolada somente em uma propriedade e o microorganismo *Yersinia enterocolitica* não foi detectado (DESMASURES; GUEGUEN, 1997).

A baixa qualidade microbiológica do leite vem sendo seriamente agravada por sua intensa contaminação por microrganismos psicotróficos, já que, alguns gêneros são patogênicos. Apesar disso, o MAPA não estabelece um padrão de identidade e qualidade para o mesmo, baseando-se no número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) destas bactérias. No entanto, o uso do leite se torna impraticável quando esta contagem ultrapasse o limite de  $5 \times 10^6$  UFC/ml (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SHIRAI, 2010).

Devido à exigência, cada vez maior, do mercado consumidor por produtos de excelência, faz-se necessário que os fornecedores invistam em medidas que preservem as características normais dos produtos, garantindo sua qualidade (MONARDES, 2004).

## 2.7 Refrigeração

O advento da utilização da tecnologia da refrigeração para manter em níveis aceitáveis a microbiota do leite, visando preservar as características microbiológicas e organolépticas do mesmo, não estando atrelada às medidas primárias de higiene em sua produção, resulta fortemente no surgimento dos microrganismos psicotróficos dentro da indústria láctea. Isto se torna relevante face ao alto poder deteriorador desses microrganismos (MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006), assumindo assim um importante papel limitador no que concerne a qualidade e a vida útil do leite e seus derivados (DOGAN; BOOR, 2003).

A IN 62 regulamenta o resfriamento do leite pós-ordenha, o qual foi adotado em nosso país em meados dos anos 90, objetivando diminuir as alterações em suas características normais por mesófilos (PINTO et al 2015). Porém, segundo Jay (2005), a proliferação bacteriana no leite, não é inibida dentro de um intervalo de temperatura compreendido entre 4 a 10°C, uma vez que os microorganismos psicrotróficos se desenvolvem em temperaturas menores ou iguais a 7°C.

De modo geral, quando o leite permanece em temperaturas mais elevadas, próximas aos 30°C, e quanto maior seja sua carga bacteriana, menor será seu tempo de durabilidade, demonstrando que, via de regra, a sua qualidade está diretamente ligada à carga microbiana presente (MUTUKUMIRA et al., 1996).

Reche et al. (2015), relataram que aqui no Brasil estão disponíveis para comercialização dois modelos de refrigeradores, chamados tanques de duas e de quatro ordenhas, sendo capazes de refrigerar 50 e 25% de seu volume à 4°C em até 3h depois da ordenha. É sabido que variações quanto ao custo do equipamento, consumo de sanitizantes e de energia bem como reposição de peças e manutenção em geral, é afetado pela diferença entre os tipos de tanques (VINHOLIS; BRANDÃO, 2009). Contudo são necessárias maiores informações a respeito da capacidade de se manter a qualidade microbiológica do leite durante o período de estocagem, levando-se em conta a particularidade de que ao volume de leite refrigerado é adicionado uma outra parte com temperatura superior a cada período de ordenha, promovendo alternância de temperatura do leite durante o intervalo de estocagem.

A relação Tempo x Temperatura a que se submete o leite durante o seu armazenamento é crucial para a sua adequada conservação. Para tanto, a IN 62 estabelece que o produto seja mantido a uma temperatura de até 4°C, quando se tratar de tanque de refrigeração direta, sendo resfriado em até 3h após o término da ordenha, independentemente a sua capacidade, tendo um tempo máximo para transporte, transcorrido o período entre a ordenha inicial e o estabelecimento beneficiador de no máximo 48h, sendo recomendado como ideal um período de tempo não superior a 24h. Em se tratando de tanques de refrigeração por imersão, admite-se uma temperatura de resfriamento igual ou inferior a 7°C, também em até 3h após o final da ordenha (BRASIL, 2011).

O desenvolvimento de bactérias psicotróficas é favorecido quando o leite é submetido a condições de temperatura indevida e armazenamento prolongado, tanto na propriedade produtora como no estabelecimento beneficiador. A pasteurização destrói estes microorganismos, no entanto, suas enzimas resistem ao tratamento UHT, fator que vai acarretar alterações sensoriais relevantes para o término da validade do produto e seus derivados. Alterações no sabor e na consistência dos produtos são promovidas pela atividade enzimática desencadeada pelos psicotróficos quando estes alcançam números iguais ou superiores a  $10^6$  UFC/ml (ANTUNES, 2013).

A situação assume uma maior gravidade pelo fato dos produtores não seguirem o que determina a legislação vigente. Em estudo realizado por Santos et al. (2009), verificaram que somente 38,24% das amostras de leite haviam sido coletadas dentro do prazo previsto de até 48h, onde também, 61,76% tiveram seu tempo de coleta com até 216 horas de armazenamento. Relataram também que em 11,76% das amostras, foi verificado que as mesmas estavam com temperatura acima do estabelecido, constatando ainda distinção entre a temperatura mensurada do produto e a observada no relógio do tanque de expansão no momento da coleta.

Santos e Laranja (2001), revelam que a temperatura de resfriamento na maior parte das propriedades leiteiras, varia num intervalo de 5 a 10°C, denotando uma refrigeração periférica do leite, provendo um meio bastante propício ao desenvolvimento da microbiota psicotrófica.

Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) propõem não ser suficiente a temperatura de resfriamento do leite preconizada na legislação de até 7°C, dependendo de quanto tempo esse leite permaneça nessa condição, para que se mantenha sua qualidade microbiológica.

Izidoro et al.(2010) demonstraram em pesquisa relacionanda ao período de tempo em que o leite era refrigerado, que houve acréscimo na contagem de microorganismos psicotróficos, sendo o leite cru estocado a 4, 8 e 12°C por 12, 24 e 48h. Os autores relataram ter havido aumento na população psicotrófica quando do armazenamento a temperaturas mais altas. Afirmaram ainda que quando o leite cru apresentava uma contagem bacteriana primária até 4 log UFCml<sup>-1</sup> armazenado a 4 e 8°C por 48h, demonstraram um incremento de até dois ciclos logarítmicos.

Contrariamente, a partir do momento em que microbiota inicial foi mais elevada que  $4 \log \text{UFCml}^{-1}$ , as populações finais foram mais elevadas que  $6 \log \text{UFCml}^{-1}$ , sem levar em conta a temperatura de armazenamento.

Contrariamente, a partir do momento em que microbiota inicial foi mais elevada que  $4 \log \text{UFCml}^{-1}$ , as populações finais foram mais elevadas que  $6 \log \text{UFCml}^{-1}$ , sem levar em conta a temperatura de armazenamento.

Lorenzetti (2006) pesquisou a relação do período de tempo de armazenagem resfriada do leite cru com o crescimento da microbiota psicotrófica. Observou que o leite que foi estocado no entreposto antes de ser levado ao estabelecimento beneficiador por mais de 72h de armazenagem resfriado, demonstrou contagem bacteriana bastante elevada, atingindo  $9,8 \times 10^6$  num período compreendido entre 24 e 48h depois da ordenha, apresentou números da ordem de  $1,5 \times 10^6 \text{UFCml}^{-1}$ . Esse fato reforça ser indispensável que o leite passe o menor tempo possível estocado para ser entregue à indústria. Santos et al. (2009) demonstraram também que o leite cru resfriado a  $5^\circ\text{C}$ , sofreu aumento em sua contagem bacteriana psicotrófica, passando de  $3,0 \log \text{UFCml}^{-1}$  depois de 24h de estocagem, para  $4,9 \log \text{UFCml}^{-1}$  após 96h, chegando ao patamar de  $6,5 \log \text{UFCml}^{-1}$  depois de 216h de estocagem, mantendo-se a mesma temperatura.

Em outro estudo, realizado por Haryani et al. (2003), revelou que a população psicotrófica levou 9 dias para chegar a uma contagem de  $10^7 \text{UFCml}^{-1}$ , com o leite cru armazenado a  $2^\circ\text{C}$ , no entanto a microbiota chegou ao mesmo número quando armazenado por 7 e 4 dias, a  $4$  e  $7^\circ\text{C}$ , respectivamente. Observaram também que quando o leite foi armazenado a  $2$ ,  $4$  e  $7^\circ\text{C}$  por 6, 4 e 2 dias, respectivamente, houve uma variação quanto o menor tempo de verificação de atividade proteolítica. Viana (2010) verificou que o leite alcançou uma contagem bacteriana psicotrófica de  $10^6 \text{UFCml}^{-1}$  quando armazenado por 5 dias a  $4^\circ\text{C}$ , e observou a mesma contagem em 3-4 dias a uma temperatura de  $7^\circ\text{C}$ . Também foi observada, uma elevação significativa na contagem bacteriana total e na atividade proteolítica por Sanvido (2007), onde após um período de estocagem resfriada de 4 e 7 dias, a uma temperatura de  $5^\circ\text{C}$ , o número de microorganismos passou de  $7,4 \times 10^3$  para  $6,1 \times 10^6$  e  $1,83 \times 10^8 \text{UFCml}^{-1}$ , respectivamente. Relataram ainda que o número de

psicrotróficos que inicialmente era de  $10^3$ , atingiu  $10^6$  e  $10^7$  no mesmo espaço de tempo.

A qualidade dos produtos fabricados a partir de leite cru refrigerado pode ser comprometida caso a sua refrigeração não seja adequada. Lisita (2010) observou que leite UHT processado com leite cru que foi estocado inicialmente a  $10^{\circ}\text{C}$ , demonstrou uma maior atividade proteolítica e lipolítica, com conseqüente decréscimo da relação caseína/proteína e elevação da quantidade de ácidos graxos livres ao longo do tempo de armazenamento quando contrastado ao leite UHT produzido com leite cru estocado a 3 e  $7^{\circ}\text{C}$  durante 3 dias.

Diante do exposto é correto afirmar que o resfriamento do leite até 3h após a ordenha a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e seu transporte à unidade beneficiadora em até 48h, associado à implementação de medidas higiênico-sanitárias adequadas para sua produção, corrobora para a obtenção de um produto final de qualidade, uma vez que essa relação está intrinsecamente ligada à carga bacteriana presente no mesmo ao chegar à indústria.

## 2.8 Atividade Enzimática

Muitos microrganismos necessitam de açúcares, proteína ou gordura para crescerem ou multiplicarem, a maioria possui vias metabólicas alternativas ou secundárias. Os nutrientes frequentemente são moléculas grandes, que não penetram facilmente na célula microbiana, a maioria das reações de degradação ocorre fora da célula. Desta forma, os microrganismos precisam lançar suas enzimas para fora da célula, para que o substrato seja degradado até uma molécula que tenha tamanho e carga elétrica que tornem possível sua interiorização (BELOTI, 2015).

Enzimas sintetizadas por bactérias não são estritas no leite cru, existindo também enzimas nativas do produto. O fato do leite de vaca ser ativo biologicamente favorece o desencadeamento de diversas atividades enzimáticas imediatamente após a ordenha, como já discutido por vários pesquisadores. Para Muir (1996), em se tratando dessas enzimas naturais, somente uma pequena parcela tem

importância no sentido de promover alterações para o leite e seus derivados (PEREIRA, 2016).

Arcuri (2003) relatou que a atividade enzimática produzida pelos psicrotróficos traz os maiores prejuízos à qualidade do leite e produtos lácteos. Esses prejuízos decorrem do crescimento desses microorganismos no leite cru, ou mesmo após tratamento térmico, pela ação de enzimas termorresistentes, pelo desenvolvimento de agentes termodúricos e, ainda, por contaminação pós-pasteurização.

Os microorganismos psicrotróficos produzem as enzimas proteolíticas, onde a maior parte destas é termorresistente, desenvolvendo ação mesmo após tratamento térmico do leite (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; NIELSEN, 2002; BAGLINIÈRE et al., 2013).

Ordoñez et al. (2005) defendem que o resultado dessa grande resistência térmica das proteases e lipases geradas pelos microorganismos psicrotróficos, é a sua atuação nos derivados lácteos ocasionando desnaturação das proteínas e lipídeos, especialmente no leite UHT, manteiga e queijos que são estocados por longo tempo. A redução do rendimento na fabricação de queijo e aparecimento de sabor amargo resulta da degradação das proteínas pelas proteases, comprometendo assim a coagulação.

Os microorganismos psicrotróficos presentes no leite cru refrigerado, demonstra grande poder de deterioração devido à sua produção de proteases, lipases e lecitinases, especialmente a microbiota gram-negativa, e capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável à temperatura de refrigeração como 6,5 °C (PINTO et al., 2015).

A deterioração do leite e derivados lácteos é marcada pela ação das enzimas extracelulares produzidas pelos psicrotróficos, tendo como mais importantes as proteases e as lipases, e em menor expressão, as fosfolipases (lecitinases) e outras enzimas metabólicas (LAW, 1976; ARCURI, 2003). Essa produção enzimática está ligada com a temperatura, etapa de desenvolvimento da bactéria, oferta de oxigênio, constituição do meio, dependendo para sua atividade, temperatura, PH e concentração do meio (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983).

ZENI et al 2013, citando Furtado (2005), afirmam que a resistência às elevadas temperaturas que as enzimas oriundas dos microrganismos psicrotróficos

possuem, é o principal problema no processo, uma vez que as proteases e as lipases resistem à pasteurização, ou até mesmo, no caso de algumas, quando submetidas à temperatura de até 100°C por alguns minutos, ou ainda, diante de tratamentos UHT, enquanto que as bactérias são exterminadas. Essa contaminação se dá facilmente por serem bactérias regularmente encontradas em utensílios não higienizados adequadamente, como também livres na água (HORST, 2006).

Para que haja alteração no leite e seus derivados, a produção de proteases e lipases, necessita apenas um pequeno número de bactérias psicotróficas, com contagens variando de  $10^6$  a  $10^7$  UFCml<sup>-1</sup> (MAHIEU, 1991; MUIR, 1996). Shirai (2010) revela que, uma vez que a contagem bacteriana no leite extrapole  $5 \times 10^6$  UFCml<sup>-1</sup>, inviabiliza sua utilização devido a, quase certa, existência de enzimas proteolíticas e lipolíticas na fase log. Wiking et al. (2002) verificaram ação de proteases aumentada, em leite refrigerado em 3 diferentes temperaturas, 2, 4 e 8°C, com contagem psicotrófica reduzida.

Kraft e Rey (1979) e Silveira et al. (1998), sugerem que as ações das proteases e lipases tendem a crescer quando se reduz a temperatura do leite no armazenamento, porém são inibidas à altas temperaturas (31 a 37°C).

Arcuri et al (2008) afirmam que a uma temperatura de 20 a 30°C, estirpes de *Pseudomonas* têm uma menor produção de enzimas que em temperaturas mais baixas, e estes microorganismos em refrigeração, as produzem ao final da fase log de desenvolvimento celular e na fase de latência (MAHIEU, 1991).

De acordo com Sorhaung e Stepaniak (1997), a ativação das proteases produzidas por *Pseudomonas* se dá em pH e temperaturas baixas, e estas, produzem proteases em número seis vezes maior a 3°C que a 29°C. Já de acordo com Arcuri et al. (2008), após isolamento de 94 cepas de *P. fluorescens*, em leite cru refrigerado, todas foram lipolíticas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C, sendo que a atividade proteolítica a estas temperaturas foi verificada, respectivamente, em 66%, 74,5%, 88,3% e 95,7% das estirpes. Segundo Mahieu (1991), o pH ótimo para proteases é 7,8, ocorrendo a atividade máxima entre 40°C e 45°C, mantendo-se ativas mesmo em temperatura e pH inferiores.

Shah (1994) relata que os problemas causados pela ação lipolítica não têm a mesma gravidade da ação das proteases, e que os gêneros *Pseudomonas*,

*Achromobacter* e *Serratia* são produtores de lipases resistentes à temperatura, sendo as espécies *P. fragi* e *P. fluorescens* as principais produtoras. No entanto, Walstra, Wouters e Geurts (2006) sustentam que, comumente, o principal problema que sucede no leite cru é a lipólise, não podendo desconsiderar a ação das proteases e lecitinasas, que também ocasionam importantes modificações físico-químicas no leite. Nutrição inadequada, etapa da lactação, mastite, ciclo hormonal, agitação mecânica, são fatores que também podem favorecer a lipólise do leite (MUIR, 1996).

## 2.9 Proteólise

A proteólise láctea pode ter duas origens, através da ação de uma enzima natural, a plasmina, ou através das enzimas produzidas pelos psicotróficos, quando este leite está armazenado sob refrigeração. Tais enzimas apresentam distinção entre si devido a ligação com as proteínas do leite. A plasmina tem a serina, um aminoácido, como ponto ativo, enquanto que as de origem psicotrófica, geralmente são metaloproteinases, necessitando de um íon como o cálcio para alcançar seu melhor desempenho (NIELSEN, 2002).

As proteínas do soro  $\alpha$  lactoalbumina e  $\beta$  lactoglobulina, são mais resistentes à ação das proteases, enquanto que estas destroem preferencialmente a k-caseína, seguindo-se a  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína (LAW, 1979; COUSIN, 1982; ARCURI, 2003). Adams, Barach e Speck (1975) afirmam que a destruição da k-caseína leva à coagulação do leite, uma vez que ela tem grande importância na estabilização da micela de caseína. De acordo com Silva (2005) citando Bengtsson et al. (1973), essa degradação é superior à das proteínas do soro, levando a suposição inicial de que a caseína sofre a ação das enzimas.

A plasmina é a protease natural mais comum do leite. Sua concentração aumenta quando o leite tem origem de vacas com mastites. O plasminogênio é o seu precursor, sendo quatro vezes mais abundante, estando ambos relacionados com a micela da caseína. Esse fato é de grande importância, pois uma vez que o plasminogênio seja convertido em plasmina agirá sobre a proteína do leite, hidrolisando as caseínas (FOX; MCSWEENEY, 1998).

A relação plasmina-plasminogênio pode ser afetada pelo desenvolvimento dos microorganismos psicrotróficos e suas proteases (ISMAIL; NIELSEN, 2010), e a ação destas, pode ativar o plasminogênio, convertendo-o em plasmina (KOHLMANN; NIELSEN; LADISCH, 1991). No entanto, o resfriamento do leite a 5°C favorece a destruição da plasmina, atribuída a uma reduzida ativação do plasminogênio à temperaturas baixas, se comparado a temperaturas de 20 e 37°C (CRUDDEN; FOX; KELLY., 2005).

Aproximadamente 80% do nitrogênio total do leite bovino é constituído de caseína. A caseína bovina pode ser classificada em quatro tipos de proteínas com diferentes propriedades:  $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$  e k-caseína, respectivamente, 38%, 10%, 34% e 15% do total da caseína (FOX et al., 2000). A proteólise das caseínas provocada por diversos fatores ocorre de acordo com diferentes predominâncias (GRIEVE; KITCHEN, 1985).

Hachana, Kraiem e Paape (2010) revelam que a  $\beta$ -caseína é a mais sensível à degeneração pela plasmina, degradando também  $\alpha$ s1 e  $\alpha$ s2 caseínas a um pH ótimo de 7,4 - 7,5. Essa degradação da  $\beta$ -caseína origina uma concentração de peptídeos hidrofóbicos responsáveis pelo sabor amargo dos lácteos (CHAVAN; KHEDKAR; JANA, 2011).

A ação da plasmina é reduzida em 10-17% quando submetida a pasteurização por 15s a 72°C, embora possa resistir ao tratamento térmico em ultra-alta temperatura (140°C/3s), e ter sua concentração no leite pasteurizado aumentada, devido ao tratamento causar um aumento nos precursores do plaminogênio (PRADO et al., 2007).

A plasmina é a principal responsável pela proteólise quando o leite é de boa qualidade – contagem  $< 10^3$  UFCml<sup>-1</sup> (WIKING et al., 2002), porém quando este leite apresenta contagens de microorganismos acima de  $10^6$  UFCml<sup>-1</sup>, a atividade das proteases bacterianas é predominante nesta ação, sendo o leite refrigerado a 4°C por 4 dias (GUINOT-THOMAS et al., 1995).

## 2.10 Microrganismos proteolíticos

São aqueles em que predominam vias metabólicas para degradação de proteínas, onde atuam enzimas proteolíticas chamadas proteases (BELOTI, 2015).

A maioria das enzimas de vias proteolíticas apresenta melhor atividade em temperaturas mais baixas, causando proteólise no leite refrigerado, e são termoestáveis, não sendo inativadas pela temperatura, continuando sua atividade no produto após o seu beneficiamento (BELOTI, 2015).

Blagnière et al., (2012) afirmam que todos os tipos de caseína são hidrolisadas pelas proteases termoestáveis, causando os mais diversos problemas nos produtos de vida longa, destacando a gelatinização e a sedimentação do leite UHT, alterações sensoriais dos derivados lácteos e diminuição do rendimento na fabricação de queijos (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; VESCONSI; VALDUGA; CICHOSKI, 2012). Esta atividade sobre a caseína é responsável pela perda de rendimento na fabricação dos queijos, levando conseqüentemente às perdas de qualidade e econômicas (NIELSEN, 2002; CARDOSO, 2006).

Pinto et al. (2015) relataram que em seu estudo, a maioria das bactérias gram-negativas não fermentadoras de glicose, a 6,5°C e 21°C, desencadeou ação proteolítica associada à lipolítica e de lecitinase, enquanto que as que fermentam a glicose, 46,2% dos isolados, promoveram a 6,5, 21 e 35°C, apenas proteólise. Já os microorganismos gram-positivos foram predominantes em realizar proteólise, com um reduzido número de isolados produzindo lipólise e atividade de lecitinase simultaneamente. Os autores verificaram ainda a produção de proteases resistentes à temperatura por algumas estirpes, com ação residual em até 100%. Observaram também que, apesar das alterações estruturais causadas pela intervenção da temperatura nas moléculas dessas enzimas ainda não estejam esclarecidas, é aceitável crer que essa modificação molecular expanda sua atividade. O mesmo ocorreu em estudos conduzidos por Marchand et al. (2008) que constataram ter havido 73% de atividade residual das proteases em amostras de leite cru resfriado tratados termicamente a 95°C/8,45 minutos.

Baglinière et al. (2013) afirmam que a AprX, enzima resistente à temperatura produzida por *P. fluorescens*, pode ocasionar a desnaturação do lácteo tratado a

ultra-alta temperatura (UHT), a 140°C/4s, em apenas oito dias de armazenamento a 20°C, se apenas 0,2mg/ml for inserida no leite cru.

Nicodème et al. (2005) demonstraram que a temperatura para produzir proteases pode ser ideal para uma espécie de microorganismo e limitante para outra, contudo o desenvolvimento na produção de enzima extracelular não é afetado pela temperatura, independente do gênero dos microorganismos.

Machado, Bazzolli e Vanetti (2013) verificaram que bactérias proteolíticas em leite cru com contagem psicotrófica variando de  $10^3$  e  $10^4$  UFCml<sup>-1</sup>, atingem o final de desenvolvimento em 48h, produzindo proteases com consequente deterioração do leite, causada pela degradação da k-caseína após 48h de estocagem.

A inoculação de proteases ao leite tratado termicamente (UHT), ocasionou grande coagulação após cinco dias em temperatura ambiente, efeito observado para o teste com as cepas de *Burkholderia cepacia* 1A4, *Klebsiella oxytoca* 8B3, *Burkholderia cepacia* 2A7, *Aeromonas* sp 10B7, *Klebsiella oxytoca* 1A5, demonstrando o efetivo poder deteriorador desses microorganismos no leite e seus derivados (NÖRNBERG et al., 2010).

A gelatinização ou geleificação do leite é a perda de sua fluidez, havendo uma formação gelatinosa. Esse processo pode ter origem de duas formas: através da plasmina, quando o leite é de boa qualidade; ou pelas enzimas produzidas pelos microorganismos psicotróficos, quando este é de qualidade inferior (FOX; MCSWEENEY, 1998). Dependendo da temperatura de armazenamento e da qualidade microbiológica do leite, o processo pode ser rápido, em torno de 4 semanas após fabricação, ou passar até de 12 meses para iniciar (ZADON, 1980).

Datta e Deeth (2003) afirmam que um pequeno número de estudos mostrou a alteração do leite por incremento direto de proteases, mesmo sabendo que as proteases geradas pelos psicotróficos têm grande relação com essas alterações de proteínas do leite.

De acordo com Nörnberg et al. (2010), o produto UHT produzido com leite de baixa qualidade (4,7 log UFCml<sup>-1</sup>, atividade proteolítica 0,71 U/ml), mostrou um aumento de 74,7% nos valores de N solúvel após 180 dias, contrastando com o leite de alta qualidade (3,2 log UFCml<sup>-1</sup>, 0,42 U/ml) que apresentou um percentual de

33,8%. Além disso, o número e a concentração de peptídeos foram menores no leite de melhor qualidade.

Algumas das alterações causadas pelas proteases relacionadas com a contagem de bactérias psicotróficas no leite cru estão relacionadas no quadro 5.

Quadro 5. Efeito da multiplicação de psicotróficos em leite cru antes do tratamento térmico, sobre a qualidade dos produtos lácteos e leites processados

Produto	População de psicotróficos no leite cru (Log UFCml <sup>-1</sup> )	Efeito sobre a qualidade do produto
Leite UHT	5,9 6,9- 7,2	Geleificação após 20 semanas. Geleificação após 2-10 semanas: desenvolvimento gradual de sabor amargo, sujo e envelhecido.
Leite em pó	6,3- 7,0	Redução da capacidade térmica e aumento da capacidade de formar espuma em leite reconstituído.
Leite pasteurizado	5,5	Sabor de qualidade inferior quando comparado a leite pasteurizado produzido com outro leite sem psicotróficos.
Queijos duros	6,5- 7,5 7,5- 8,3	Rancidez Alteração de sabor, principalmente rancidez e sabor de sabão. Redução de rendimento na fabricação
Queijo Cottage	5,0-7,8	Sabor amargo
Manteiga	Não determinado	Desenvolvimento mais rápido de rancidez em manteiga feita a partir de leite refrigerado do que de leite fresco, lipase de <i>Pseudomonas</i> estava ativa na manteiga congelada.
logurte	7,6- 7,8	Gosto amargo, sabor sujo ou de fruta, dependendo da microbiota

Fonte: Sorhaug e Stepaniak (1997).

## 2.11 Lipólise

Segundo Ordoñez et al.(2005), a lipase é uma glicoproteína com peso molecular que varia de 62.000 a 66.000, tendo sua atividade máxima em um pH variando entre 7 e 8, tem um raio de ação bem extenso, podendo degradar triglicerídeos de cadeia curta e longa, fosfolipídeos, monoglicerídeos e ésteres sintéticos.

Acredita-se que em torno de 96 a 98% da matéria gorda do leite é composta por triglicerídeos, sendo os outros constituintes diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e algumas vitaminas lipossolúveis (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Normalmente o leite já dispõe de ácidos graxos livres sintetizados a partir de uma produção deficiente na glândula mamária, todavia a maior parte desses se origina da quebra dos triglicerídeos pelas lipases. Essa quebra causa o aumento da parcela de ácidos graxos de cadeia curta – C4 e C8, atribuindo aos derivados do leite sabores e odores rançosos, enquanto que ácidos graxos de peso molecular maior – C10 e C12, conferem sabor e odor de sabão. O sabor oxidativo ou metálico observado em alguns produtos está relacionado com a liberação de ácidos graxo insaturados durante a lipólise, os quais podem ser oxidados à cetonas ou aldeídos produzindo esse sabor (ARCURI, 2003; ORDOÑEZ et al., 2005).

#### 2.11.1 Lipase Natural

No leite existe uma lipase natural, a lipoprotéica, agindo a uma temperatura ideal de 37°C e pH 8. Sua presença estimula a degradação de triglicerídeo do leite, promovendo a produção de ácidos graxos livres que conferem alterações de sabor e odor (MUIR, 1996). Por serem consideradas termolábeis, não ocasionam danos à gordura do leite, se este for manipulado e processado de forma adequada (GOMES, 1988).

Essa enzima natural é responsável por duas diferentes formas de lipólise, uma natural, motivada por uma gama de condições, incluindo: sazonalidade, fase lactacional e nutrição indevida; que vai transmitir ao leite recém ordenhado o ranço. O outro tipo é a chamada lipólise induzida, com ocorrência quando produtos não processados sob temperatura adequada são deteriorados após falhas na membrana do glóbulo de gordura. Essas falhas decorrem geralmente por meios físicos, dos quais se incluem: agitação, formação de espuma ou homogeneização (MUIR, 1996).

Contudo, em circunstâncias normais, uma lipase natural não tem capacidade de degradar a gordura do leite, como já referido, porém, se uma fosfolipase bacteriana, agride a membrana do glóbulo de gordura ou se esta é destruída por

meio de uma extensa agitação, tal processo favorecerá a ação dessa enzima natural na degradação da gordura láctea (DEETH; FITZ-GERALD, 2006).

Dessa forma é possível que as lipases naturais deterioreem os lácteos. Todavia as de origem bacteriana psicrotrofica os prejudicam mais, uma vez que podem apresentar termorresistência aos processos de esterilização do leite (ARCURI, 2003).

Na indústria de laticínios, nem todas as lipólises indesejáveis são causadas pela Lipase Lipoproteica (LPL). Durante o armazenamento frio de leite, bactérias psicrotóficas, como *Pseudomonas*, cultivam e produzem enzimas como lipases e proteases, que apresentam grandes efeitos sobre a qualidade do leite e dos produtos lácteos (Sørhaug & Stepaniak, 1997). As lipases produzidas por essas bactérias possuem características diferentes de LPL e é importante reconhecer essas diferenças para poder determinar a causa da lipólise em situações particulares (quadro 6) (DEETH, 2006).

Quadro 6 Comparação das características da lipoproteína lipase do leite (LPL) e lipases de bactérias psicrotóficas

LIPASE DO LEITE	LIPASES DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS
Destruído por pasteurização de alta temperatura e tempo curto (HTST)	Estável para o tratamento HTST e até ultra-alta temperatura (UHT)
A membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM) atua como uma barreira para o substrato lipídico	MFGM não apresenta barreira
Ativada por lipoproteínas séricas	A maioria não é ativada por lipoproteínas de soro
Efeito principalmente associado com leite fresco e creme	Efeito principalmente associado a produtos armazenados: leite UHT, queijo, manteiga, leite em pó
Efeito no queijo / manteiga óbvio no fabrico e não muda durante o armazenamento	Efeito no queijo / manteiga óbvio apenas após o armazenamento
Níveis elevados em leite cru	Apenas níveis de rastreamento

Fonte: Deeth (2006)

### 2.11.2 Lipases Bacterianas

São produzidas por microorganismos lipolíticos. Esses microorganismos conseguem sintetizar os nutrientes que precisam a partir dos lipídeos, utilizando vias metabólicas de degradação de gorduras, através das lípases. Apesar de não serem predominantemente lipolíticas, muitas produzem lípases e proteases, que degradam

a temperatura de refrigeração gorduras e proteínas, respectivamente. A degradação da gordura produz aroma e sabor de ranço, mais perceptíveis nos derivados que contêm maior concentração de gorduras (BELOTI, 2015).

Além da lipase endógena, existem as lipases produzidas pelas bactérias, são termorresistentes, inclusive ao tratamento UHT, agindo entre 40 e 50°C e em pH alcalino (ORDOÑEZ et al., 2005). Diferentes das enzimas naturais, estas alteram a gordura do leite depois de tratado térmicamente, visto que permanecem ativas mesmo em temperaturas baixas (GOMES, 1988).

A lecitinase é capaz de quebrar a membrana dos glóbulos de gordura, e assim conferir alterações de sabor e textura conhecidas como “leite/creme gorduroso”, sendo considerada como uma das mais importantes lipases produzidas pelas bactérias psicotróficas. No leite cru, são produzidas pelas bactérias Gram-negativas dos gêneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (SHAH, 1994), já no leite pasteurizado, são elaboradas pelas Gram-positivas, como *Bacillus mycoides* e *Bacillus cereus*, estando relacionadas à formação do “leite gorduroso” (SHAH, 1994; STONE; ROWLANDS, 2009).

Outra enzima de grande importância na deterioração do leite é a fosfolipase C, gerada por alguns psicotróficos como *Bacillus cereus* e algumas espécies fluorescentes de *Pseudomonas* (COUSIN, 1982; MUIR, 1990). Ela destrói a membrana dos glóbulos de gordura, auxiliando o trabalho das lipases sobre os triglicerídeos do leite (COUSIN, 1982; GARG, 1990; SHAH, 1994;).

Arcuri (2003) relata que as lipases têm uma melhor atuação em um extenso intervalo de temperatura, 22 – 70°C, enquanto que essa ação é bastante reduzida quando submetidas à temperaturas que variam de 60 a 80°C. Mahieu (1991) afirma que elas são produzidas em maior quantidade em temperatura entre 20 e 21°C, podendo manter sua atividade em 50% a 0°C.

As lipases atuam principalmente sobre cremes, queijos e manteigas, sendo responsáveis pelo ranço destes lácteos em até dois dias (LAW, 1979; COUSIN, 1982).

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

No Brasil tem-se praticado coletar o leite de forma granelizada, onde o leite cru é estocado em tanques de expansão a uma temperatura de 4°C por um período de até 48h, sendo conduzido em veículo com compartimento isotérmico até a unidade beneficiadora.

Visto que, a temperatura de refrigeração adotada no armazenamento do leite não inibe totalmente a multiplicação de microrganismos psicotróficos, e conseqüentemente a produção e atividade de enzimas deterioradoras, a adoção de práticas higiênicas durante a obtenção dessa matéria-prima é fundamental para minimizar a contaminação microbiológica. Um recurso seria, implementar as boas práticas de produção leiteira junto aos produtores e colaboradores, aliadas ao controle do tempo de estocagem do leite cru, associado à temperatura adequada, considerando que o processo de resfriamento e armazenamento do leite por longos períodos de tempo, favorece a multiplicação de microrganismos psicotróficos.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.58, n.6, p.828-834, Jun. 1975.
- ANTUNES, V. C. **Efeito do armazenamento refrigerado e da microfiltração na qualidade e vida útil do leite pasteurizado**. 2013. 86 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 2013.
- ARCURI, E. F. **Influência de bactérias psicrótróficas na qualidade do leite e produtos lácteos**. In: Brito, J.R.F. ; Portugal, J.A.B. (ed). Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. 1ªed., Juiz de Fora, Templo Gráfica e Editora Ltda, 2003, p.105-115.
- ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrótróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- BAGLINIÈRE, F. et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 55-61, 2013.
- BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**: queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização e análise. 13 ed. São Paulo: Nobel, 1999, 322p.
- BELOTI, V. **Leite**: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Planta, 2015, p.115-122
- BRAMLEY, A . J.; MCKINNON,C. H. **Dairy Microbiology**: The Microbiology of Milk. 2.ed. London\Nem York: Elsevier Science Ltda, 1990. Cap.5: The microbiology of raw milk, p.163-207.
- BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011**. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 251, p. 6-11, 29 dez. 2011. Seção I.
- BRITO, M.A.V.P. et al. **Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários**. In: Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis. Juiz de Fora. Embrapa Gado de Leite, 2003, Cap. 2.
- CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrótrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006.

57fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CATANIO, S. F. et al. Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 2 , p. 3171-3180, 2012.

CHAVAN, S.R.; KHEDKAR, C.D.; JANA, A.H. **UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A Review 2011**. Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety, v. 10, n. 5, p. 251-268, 2011.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology**, Austratian, v.47, n.1, p.50-55, Jan.1993.

CRUDDEN, A.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 305–313, 2005.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT-Food Science and Technology**. v. 36, p.173–182. 2003.

DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v.16, p.555-562, 2006

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C.H. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: lipids**. 3. rd. New York: Springer, 2006. p. 481-556.

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, v.64, p.271-280, 1997.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. Isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p.130–138. 2003.

DRUCE, R. G. ; THOMAS, S. B. **An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay**. Journal of Applied bacteriology. v. 33, p. 420-435, 1970.

ENEROTH, Á.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**. v.10, n. 5-6, p. 325-331, 2000.

FONSECA, L. F. L. Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 1998. p. 54-56.

- FOSTER, E. M. et al. **Microbiologia de la leche**. México: Herrero, 1965, 500p.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**., 1998, 478p.
- FOX, P.F. et al. **Fundamentals of cheese science**. New York: Aspen; 2000, 588p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.
- FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causa e prevenção**. 2. ed. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200 p
- GALVÃO JÚNIOR, J. G. B. et al. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.1, p.25-30, 2010.
- GARG, S.K. **Psychrotrophs in milk** – review. Indian Journal Dairy Science, n.43, v.3, p.433-440, 1990.
- GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. 1988. 85 fls Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - ESALQ, Piracicaba, 1988.
- GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leukocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. **Journal of Dairy Research**. v. 52, p.101-12, 1985
- GUERRA, M.G. et al. Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, p.230-235, 2011.
- GUERREIRO, P.K. Qualidade Microbiológica De Leite Em Função De Técnicas Profiláticas No Manejo De Produção. **Ciência e Agrotecnologia. Lavras**, v. 29, n.1, p. 216-222, jan./fev. 2005.
- GUINOT-THOMAS, P. et al. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, v.5, p. 685-697, 1995.
- HACHANA, Y.; KRAIEM, K.; PAAPE, M.J. Effect of plasmin, milk somatic cells and psychrotrophic bacteria on casein fractions of ultra high temperature treated milk. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n.1, p. 79-86, 2010.
- HANTSIS-ZACHAROV E.; HALPERN M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.
- HARDING, F. **Milk Quality**. New York: Blackie Academic e Professional, 1995. 165p.

HARYANI, S. et al. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, p. 15-20, 2003.

HORST, J.A. **Impacto da Refrigeração na Contagem Bacteriana do Leite**. In: MESQUITA, A.J.; DURR, J.W.; COELHO, K.O. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia. Talento. v. 1, p. 163-174. 2006.

ISHIKAWA, K. **Controle de Qualidade Total: à maneira japonesa**. Rio de Janeiro: Campus, 1993.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S.S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 11, p. 4999-5009, 2010.

IZIDORO, T.B. et al. Resfriamento marginal: multiplicação da microbiota psicrotrofica e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 4., 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBQL, 2010. 1 CD-ROM

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. New York: Chapman and Hall, 2000. 701 p.

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

JOÃO, J.H. et al. Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n.1, p.9-15, 2010.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 4125-4136, 1991.

KRAFT, A. A.; REY, C. R. Psychrotrophic bacteria in foods: an update. **Food Technology**, Chicago, v. 33, n. 1, p. 66-71, 1979.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3. n.11. p. 1383-1387, 2007.

LAFARGE, V. et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LISITA, M.O. **Influência da variação da temperatura de armazenamento de leite cru na vida de prateleira de leite UHT em embalagem flexível e estocagem sob**

Iuz. 2010. 129fls. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MACHADO, S. G.; BAZZOLLI, D. M. S.; VANETTI, M. C. D. Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 1, p. 8-14, 2013.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos**. la leche de la mama a la lechería. Zaragoza: Acribia. V. 1. p. 181-227, 1991.

MARCHAND, S. et al. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514-519, 2008.

MELDAU, D.C. A microbiota do leite de vaca. In: JAY, James M. (Org.). **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MOLINERI, A. I. et al. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, p. 187-194, 2012.

MONARDES, H. **Reflexões sobre a qualidade do leite**. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Org.) O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 11-37

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington D.C., v. 39, n. 2, p. 145-167, 1975.

MUIR, D.D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MURPHY S.C.; BOOR K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**. v. 20, p. 606-611. 2000.

MUTUKUMIRA, A. N. et al. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 9, p. 984-987, sept. 1996.

NICODÈME, M. et al. Extracellular protease activity of different Pseudomonas strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 641-648, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6624-6628, 2002.

NÖRNBERG, M.F.B.L. **Atividade Proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microorganismospsicrotróficos em leite bovino.** 2009. 89 fls. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, RS, 2009.

NÖRNBERG, M.F.B.L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw Milk. **International Journal of Dairy Technology.** v.63, n. 1., February, 2010

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos. Efectos sobre la leche y los productos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, n.130, p.251-260, dezembro, 1983.

PACHECO, M. S. **Leite cru refrigerado do agreste pernambucano: caracterização da qualidade e do sistema de produção.** 2011. 87 fls. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005.v. 2.

PEREIRA, F. A. B. **Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas de leite cru refrigerado.** 2016. 59 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - UNOPAR, Unidade Piza, Londrina, 2016.

PINTO, C. L. O. et al. Identification of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw Milk and characterization of its spoilage potential. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, mar/abr, 2015.

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

POTTIER, I. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 126, n. 3, p. 327-332, 2008.

PRABHA, R.; SHANKAR, P. A. Proteinases and lipase producing psychrotrophs in milk and dairy environment. **Indian Journal of Animal Science**, n. 47, p. 880-884, 1994.

PRADO, B.M. et al. Thermal stability of plasminogen activators and plasminogen activation in heated milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1028–1033, 2007.

RANGEL. A.H.N. et al. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.4, n. 3, p. 57–60. 2009.

RECHE, N.L.M.. **Influência do armazenamento do leite em resfriador por expansão direta sobre a contagem de micro-organismos e estabilidade da caseína**. 2013. 91fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

RECHE, N.L.M. et al.. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, v.45, n.5, mai, 2015.

REIS, K.T.M.G. et al. Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Pasteurizado Produzido no Brasil: Revisão. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, p. 411-421, 2013.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Micro-organismos termodúricospsicrotróficos com atividade proteolítica em leite cru refrigerado. In: SUL LEITE – SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 6., 2014, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2014. CD-ROM.

RIBEIRO JÚNIOR, J.C. et al. Microbiota Termodúrica Psicrotrófica Proteolítica Do Leite Cru Refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 267-272, jan-fev, 2017

RIBEIRO NETO, A. C. et al. . Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, p. 1343-1351, 2012.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANTOS, P. A.; et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, 2009.

SANVIDO, G.B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. Campinas, 2007. 94fls. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.2007

SERRA, M. J. B. **Qualidade microbiana e físico-químico do leite cru produzido na região de Pardinho, SP**. 2004. 37 fls Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.2004

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

SHIRAI, M. A. **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono.** 2010 90fls Dissertação -(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

SILVA, N.V. et al. . **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela; 2007.

SILVA, P.D.L. **Avaliação, Identificação e Atividade Enzimática de Bactérias Psicotróficas Presentes no Leite Cru Refrigerado.** 2005 119 fls Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração: Engenharia de Processos. Natal – RN, Brasil. 2005

SILVEIRA, I. A. et al. Influência de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

STONE, M. J.; ROWLANDS, A. Broken or bitty cream in raw and pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 51-62, June 2009.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk – Part 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973.

VESCONSI, C. N.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J. Sedimentação do leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 730-736, 2012

VIANA, P.C.B. **Adição de dióxido de carbono ao leite cru: Efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT.** 2010. 94fls. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

VINHOLIS, M.D.M.B.; BRANDÃO, H.D.M. Economia de escala no processo de resfriamento do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.245-251, 2009.

WALSTRA, P. et al. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos.** Zaragoza: Acribia; 2001.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology.** 2nd. Boca Raton: CRC Press, 2006.

WERNCKE, D. Perfil das propriedades e ocorrência de leite instável não ácido na Região do Vale do Braço do Norte, Sul do Estado de Santa Catarina. **Produção Animal** UDESC, Lages, 2012. 61 p.

WIKING, L. et al. Effects of storage condition on lipolysis, proteolysis and sensory attribute in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 4, p. 190 – 194, 2002.

YAMAZI, A.K. et al. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, July/Aug. 2010.

ZADON, J. G. UHT Milk – Standards and Quality Assurance. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 35. p. 140-144.1980.

ZENI, M.P. et al. Influência dos microrganismos psicrófilos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência** - ACET, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61-70, jan./jun. 2013.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Localização

O estudo foi realizado a partir da coleta de amostras de leite cru refrigerado de tanques de expansão, individuais e coletivos, de propriedades localizadas nos municípios de Palmeira dos Índios, Girau do Ponciano, Traipu e Campo Grande, no Agreste; Major Izidoro, Jaramataia, Maravilha, Canapi e Inhapi, no sertão do Estado de Alagoas Fig. 1.

Figura 1. Municípios das regiões, Agreste e Sertão do Estado de Alagoas onde foram realizadas as coletas de leite cru refrigerado



### 5.2 Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas após homogeneização do leite por meio de agitação mecânica programada no próprio tanque, em recipientes estéreis de 50 ml,

devidamente fechados e identificados. Sendo transportadas até o laboratório de Microbiologia do CECA/UFAL em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Foram coletadas 72 amostras – duas por tanque, sendo 23 tanques individuais e 13 coletivos, no período de outubro a novembro de 2016.

### 5.3 Contagem, Isolamento e Identificação de Bactérias Psicrófilas

No laboratório, foram realizadas as diluições apropriadas das amostras, e estas foram plaqueadas em Ágar “PCA” (Difco). Após incubação a 7 °C durante 10 dias fizemos a contagem das unidades formadoras de colônias e isolamos cinco colônias por placa selecionada, em Ágar Nutriente-NA (Difco), sendo incubadas a 21 °C por 24 horas, para realização dos primeiros testes.

As culturas foram estocadas a temperaturas de -20°C em meio à base de leite desnatado e glicerol.

Para a realização de novos testes, as culturas foram ativadas e repicadas, para placas de Petri contendo NA (Ágar nutriente) ou BHI (Brain Heart Infusion agar - Difco) e incubadas a 21°C por 24 horas.

### 5.4 Caracterização dos Microrganismos

A caracterização dos isolados bacterianos se deu por meio de testes para análise morfo-tintorial e testes bioquímicos.

5.4.1. Testes para análise das características morfo-tintoriais dos isolados bacterianos.

5.4.1.1. Morfologia Celular;

5.4.1.2. Coloração de Gram;

5.4.1.3. Reação de Gram, a partir da reação de KOH 3%;

5.4.1.4. Coloração de esporos.

5.4.2. Testes bioquímicos.

5.4.2.1. Metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose em meio OF;

5.4.2.2. Teste de Oxidase;

5.4.2.3. Teste da Catalase;

- 5.4.2.4. Crescimento em Agar MacConkey (MC)
- 5.4.2.5. Produção de amônia a partir da arginina;
- 5.4.2.6. Teste de motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e indol em meio SIM;
- 5.4.2.7. Teste de Ágar de Ferro e Açúcar triplice em meio TSI;
- 5.4.2.8. Teste de Vermelho de metila (VM);
- 5.4.2.9. Teste de Vogues-Proskauer (VP);
- 5.4.2.10. Teste de Citrato de Simmons;
- 5.4.2.11. Agar Lisina Ferro
- 5.4.2.12. Teste de Urease
- 5.4.2.13. Formação de ácidos a partir de carboidratos;
- 5.4.2.14. Testes enzimáticos.
  - 5.4.2.14.1. Proteólise;
  - 5.4.2.14.2. Lipólise;
  - 5.4.2.14.3. Lecitinólise.

## 5.5 Descrição dos Testes de Caracterização dos Microrganismos.

### 5.5.1 Reação de KOH 3%

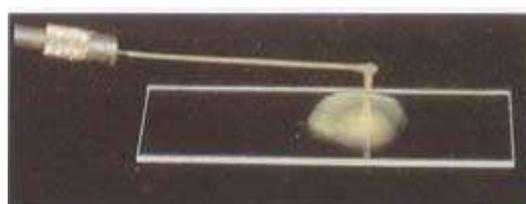
Colocou-se uma gota de KOH a 3% (p/v) em uma lâmina de vidro e suspendeu-se uma colônia retirada de um crescimento em placa de NA. Homogeneizou-se bem, com a ajuda de alça de platina, e realizamos a leitura dentro de 60 segundos.

Interpretação:

Gram negativas – formação de um filamento viscoso Fig. 2;

Gram positivas – não há produção de viscosidade na suspensão.

Figura 2. Caracterização bacteriana gram-negativa com formação de um filamento viscoso



### 5.5.2 Coloração de Gram.

O esfregaço foi preparado a partir de uma colônia bacteriana suspensa em água estéril. Após fixação do esfregaço em chama, este foi corado com a solução de violeta genciana fenicada por um minuto, escorrendo ao final sem lavar; e a seguir cobriu a lâmina com lugol fraco e esperou atuar por um minuto; lavou-se com solução descorante (à base de álcool-acetona) até que o líquido se tornou incolor (15 – 30 segundos); lavou em água corrente e cobriu a lâmina com fuscina para Gram, deixando atuar por 30 – 60 segundos e, por fim, lavamos com água corrente, deixando secar na posição vertical, observando ao microscópio, com o uso da objetiva de imersão (100x de aumento total).

Interpretação:

Bactérias Gram negativas – As células apresentam coloração de tonalidade avermelhada.

Bactérias Gram positivas – As células apresentam coloração púrpura escura.

### 5.5.3 Motilidade no meio SIM, Teste de produção de Indol e H<sub>2</sub>S

O teste de motilidade foi realizado em um meio SIM (Biobás). O meio foi inoculado com uma colônia isolada da bactéria (18 - 24 horas de incubação) através de uma picada com agulha de níquel-cromo. O tubo inoculado foi incubado a 30 °C, durante 48 horas. Após 48 horas foram utilizadas algumas gotas do reagente de Kovacs para a reação de indol.

Interpretação dos resultados:

Meio turvo - motilidade positiva;

Produção de H<sub>2</sub>S – meio escuro;

Positivo Indol - desenvolvimento de um anel vermelho escuro na superfície do tubo.

### 5.5.4 Teste de Catalase

Uma colônia foi colocada em uma lâmina de microscópio limpa. Em seguida adicionou-se, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizando o

conteúdo. A presença de bolhas de gás dentro de alguns segundos, indicou uma reação positiva.

Reação de Catalase: negativo à esquerda e positivo a direita Fig. 3.

Figura 3. Caracterização bacteriana quanto a reação de catalase.



#### 5.5.5 Teste de OF

As bactérias foram semeadas em dois tubos contendo o meio de Hugh Leifson, pH 7,1, usando agulha (inoculação por picada em profundidade). Foi adicionado a um dos tubos óleo mineral estéril (5 a 6 mm altura), para criar um ambiente de anaerobiose. Incubou-se a 30 °C e foi examinado diariamente durante 14 dias, pois alguns microrganismos só produzem ácidos (resultado da utilização da glicose) após vários dias de incubação.

Quadro 7. Esquema de identificação de acordo com a resposta ao teste OF

Utilização da Glicose	Tubo aberto	Tubo com óleo
Por oxidação	Amarelo	Verde
Por fermentação	Amarelo	Amarelo
Sem reação	Verde ou azul	Verde

**Fermentativa** Enterobactérias como *Escherichia coli*  
**Oxidativa** *Acinetobacter, Pseudomonas*  
**Sem reação** *Alcaligenes faecales*

#### 5.5.6 Produção de Amônia a partir da Arginina

O teste foi realizado com uma colônia da placa de NA ou BHI. Com o auxílio de uma agulha de níquel, a cultura foi inoculada ao meio semi - sólido, a superfície

do tubo foi coberta com óleo mineral estéril e incubada à temperatura ótima de crescimento (30 °C) por dois a sete dias.

Interpretação dos resultados:

Arginina positiva - hidrólise da arginina com formação de amônia indicada pela mudança de cor de salmão para rosa.

Arginina negativa - sem mudança de coloração.

#### 5.5.7 Crescimento em meio Mac Conkey (MC)

O MC é seletivo para bactérias gram-negativas porque possui sais de bile e de cristal violeta, que interferem no metabolismo das bactérias gram-positivas. É também diferenciador devido à presença de lactose na sua composição, distinguindo as bactérias que fermentam a lactose (LAC+ ) das que não fermentam (LAC- ). Este meio possui como indicador de pH o vermelho neutro, cuja cor a pH ácido é rosa e pH alcalino é incolor. Este teste foi usado para verificar se a bactéria for gram-negativa e para observar se a mesma fermentava ou não a lactose. As culturas puras foram semeadas com a ajuda de uma alça de platina e semeadas em Agar MC, sendo incubadas a 21 °C por 24horas.

Interpretação dos resultados:

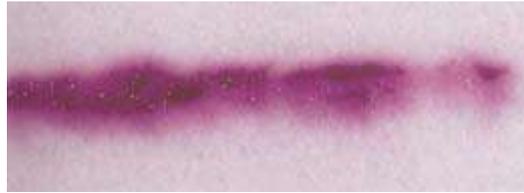
- Fermentam a lactose (LAC+ ) - formam colônias róseas ou vermelhas.
- Não Fermentam a lactose (LAC- ) – não formam colônias róseas ou vermelhas.

#### 5.5.8 Teste de Oxidase

Para este teste utilizamos tiras de papel contendo o reagente p-fenilenodiamina (Laborclim).

Utilizando um palito de madeira estéril foi transferido asépticamente uma ou duas colônias recém isoladas (18-24h de cultura em NA a 21 °C) e homogeneizada sobre a superfície da tira. Interpretação do resultado Fig. 4.

Figura 4. Caracterização bacteriana quanto a reação da oxidase



Bactéria Oxidase positiva - coloração violeta,  
Oxidase negativa – incolor .

#### 5.5.9 Teste de Agar de Ferro e Açúcar Tríplice em Meio de TSI

O teste foi feito inoculando por picada a base (crescimento em anaerobiose) do meio TSI (Difco) e a seguir a parte inclinada (aerobiose) até a extremidade final fazendo uma estria em “zigue-zague”.

Interpretação dos resultados:

\* Inclinação vermelha (alcalino) e fundo amarelo (ácido): apenas fermentação da glicose;

Inclinação amarela (ácida) e fundo amarelo (ácido): fermentação da glicose juntamente com a lactose e/ou sacarose;

\* Meio preto: produção de H<sub>2</sub>S (Salmonella). \* Produção de gás: presença de gás no meio.

#### 5.5.10 Teste de Vermelho de metila (VM)

Esta prova bioquímica foi utilizada para caracterizar os microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae. O teste foi realizado utilizando uma colônia da placa de NA ou BHI crescida a 21 °C por 18 a 24 horas. Com o auxílio de uma alça de platina a cultura foi inoculada ao meio, e em seguida incubada a 30 °C por até cinco dias. Após incubação, adicionaram-se algumas gotas do indicador VM.

Interpretação do resultado:

Positivo – meio muda de cor para vermelho.

Negativo – meio permanece amarelo.

### 5.5.11 Teste de Vogues-Proskauer (VP)

Utilizamos os mesmos tubos da prova de Vermelho de Metila. Após o período de incubação e a realização do teste VM, foi adicionado ao tubo 0,6 mL de solução A ( $\alpha$ -naftol 5%) e 0,2 mL de solução B (hidróxido de sódio 40%). O tubo foi agitado vigorosamente várias vezes para que o oxigênio atmosférico penetre e oxide a acetoína em diacetila. O KOH atua como agente oxidante e o  $\alpha$ -naftol como catalisador e intensificador de cor. Com o uso de um agente oxidante, a cor produzida desaparece rapidamente, sobretudo porque o complexo de reação diacetila-peptona pode ser rapidamente oxidado em um composto incolor.

Interpretação do resultado:

Teste positivo - quando ocorre a coloração vermelha do meio entre 15 a 30 minutos.

Teste fracamente positivo - quando ocorre a coloração rósea.

Teste negativo - quando ocorre a coloração marrom-esverdeada

### 5.5.12 Teste de Urease

A partir da cultura crescida em BHI ou NA (cultura com 24 horas de incubação), foi inoculado com uma alça de platina um tubo contendo o meio. Incubou-se a 35 °C por 24 horas  $\pm$ 2. Quando o resultado obtido for negativo, deixar o tubo por mais sete dias à temperatura ambiente, pois o resultado ainda pode ser alterado.

Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo).

Interpretação de resultados:

Urease positiva - o meio muda para rosa claro

Urease negativo - o meio se mantém com a cor inicial amarelo

### 5.5.13 Teste de Citrato de Simmons

Esta prova bioquímica tem como finalidade a caracterização de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e fundamenta em

determinar a capacidade dos microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinidade do meio.

A partir da cultura crescida em BHI ou NA (cultura com 18 - 24 horas de incubação) inoculou-se com uma agulha de níquel-cromo um tubo contendo o meio Citrato de Simmons (Agar inclinado). O teste foi realizado inoculando uma estria sobre a superfície do meio. Incubado a 35 °C por 96 horas $\pm$ 2. Foi utilizado um tubo não inoculado (controle negativo). Os microrganismos que não conseguem utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, não crescem no meio de cultura, e o mesmo permanece com a sua coloração inicial (verde).

Interpretação de resultado:

Positiva – alcalinização do meio que se torna azul intenso, principalmente no ápice

#### 5.5.14 Ágar Lisina Ferro (Lia)

A partir da cultura crescida em BHI (cultura de 18-24 horas) inoculou-se a colônia a ser analisada no meio de Agar Lisina Ferro através de picada com agulha de platina e estrias na rampa. O Inoculo foi incubado a 35 °C por 24 horas. Este teste tem como finalidade determinar a presença de lisina de descarboxilase e a produção de sulfato de hidrogênio. É um teste diferencial de culturas.

interpretação dos resultados deve ser feita da seguinte forma:

\*Crescimento de Salmonella:

Positivo: o Fundo e a inclinação do meio no tubo alcalinos (púrpura) com produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio). Pode ocorrer também ausência de produção de H<sub>2</sub>S.

\*Crescimento de Proteus: O meio adquire uma coloração castanha em função da reação de desaminação da lisina à ácido alfacetocarbônico.

#### 5.5.15 Formação de Ácidos a partir de Carboidratos

Arabinose, inulina, lactose, manose, rafinose, ribose, sorbitol e trealose, transferimos várias colônias crescidas em ágar-sangue durante 24 a 48 horas para

os tubos contendo os meios específicos para cada carboidrato a ser testado e estes foram incubados em estufa a 35°C por até 14 dias.

Interpretação de resultado:

Reação positiva - coloração do meio muda de púrpura para amarelo.

Reação negativa - a coloração do meio permanece inalterado, ou seja, de coloração púrpura.

#### 5.5.16 Coloração de Esporos

As bactérias caracterizadas pela coloração de Gram como sendo bacilos gram-positivas, foram avaliadas quanto a capacidade de produção de esporos. Estas foram inoculadas (a partir de cultura crescida em BHI) no meio específico para esporulação, 2X SG (extrato de carne, triptona, amido, sulfato de manganês, ágar bacteriológico, glicose).

O pH da solução antes de ser esterilizado foi ajustado para 7,0.

As estirpes foram inoculadas no meio 2X SG na proporção de 1:10 e incubada a 30 – 32 °C com agitação mecânica por 4 horas.

Em seguida, esta cultura foi diluída na proporção de 1:25, utilizando o mesmo tipo de meio estéril e incubada a 30°C com agitação por mais 24h, para sincronizar a esporulação. No outro dia as culturas foram deixadas à temperatura ambiente, por 48 horas.

Depois foi feita uma preparação a fresco em lâmina de vidro e também esfregaço corado, para observar se há esporos. Os mesmos frascos inoculados foram submetidos a três tratamentos para verificar a resistência dos esporos formados:

1- 80°C/10minutos;

2- 5% de clorofórmio;

3 -10% de clorofórmio.

As percentagens de clorofórmio foram calculadas sobre o valor restante do meio nos frascos que haviam sido incubados anteriormente por 24h sobre agitação.

Após o tratamento térmico as amostras foram inoculadas em placas de petri contendo o mesmo meio utilizado para o crescimento dos esporos para verificar a resistência dos esporos formados.

Para tratamento com clorofórmio foi acompanhado por um período maior. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por aproximadamente 7 dias, durante este período foram agitados manualmente e avaliados quanto à resistência do esporo ao clorofórmio. Esta avaliação foi feita em placas de petri contendo o meio 2X SG e incubado a 30°C por até 14 dias.

Se ocorrer a formação de colônias realizar a contagem dos mesmos. Em intervalos de 48 horas foi feito o esfregaço a fresco e por coloração de esporos, em verde-malaquita em 5% à quente como corante principal, que resiste à lavagem subsequente com água e, posteriormente, safranina (cora as estruturas da célula vegetativa), como corante de contraste. Desta forma, o esporo se cora de verde, porém o resto da célula ou a célula que não possui esporo se tingem em vermelho ou róseo.

#### 5.5.17 Caracterização das Bactérias Isoladas Quanto à Produção de Enzimas Hidrolíticas.

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de lipases, proteases e lecitinases. A produção destas enzimas foi avaliada qualitativamente pela formação de halo em torno da colônia e o diâmetro do halo foi medido para uma estimativa quantitativa. A verificação da atividade hidrolítica foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. A produção de proteases foi determinada em meio ágar leite (Difco, França), suplementado com 5% de leite em pó, com incubação, a 21°C, por 3 dias. A atividade proteolítica foi avaliada pela formação de halos claros ao redor das colônias. A atividade da lipase extracelular foi avaliada em meio ágar base, suplementado com tributyrin, adicionado de solução de púrpura de bromocresol 1,5%. As placas foram incubadas, a 21°C, por 3 dias. A lipólise foi observada pela formação de uma zona clara ao redor da colônia. A detecção de lecitinases foi determinada em ágar TSA, suplementado com 10% de

emulsão de gema de ovo, incubado, a 21°C, por 3 dias. A atividade das lecitinases foi detectada pela formação de uma zona opaca ao redor das colônias.

## 5.6 Identificação dos Gêneros

As características culturais e morfológicas dos isolados foram convertidas em uma matriz binária de presença e ausência. Deste modo, agruparam-se os isolados em um dendrograma de similaridade, gerado por meio do aplicativo computacional PAST (Paleontologica IStatistics Software Package for Education and Data Analysis), utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard.

Foi realizada a identificação das bactérias psicrotróficas presentes no leite cru refrigerado em nível de gênero conforme o Manual Bergey de Identificação Bacteriana (1994).

## 5.7 Análise Estatística.

Os resultados obtidos no estudo foram submetidos à análise estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). Para análise estatística de contagem padrão em placas, de psicrotróficos foi feita a transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ), a fim de normalizar a distribuição de frequência. Para a avaliação da atividade enzimática foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em triplicata, e os dados foram analisados por meio de análise de co-variância (ANCOVA), utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Fischer, ( $p=0,01$ ). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa XLSTAT e o Excel 2007.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS E  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS TERMORRESISTENTES EM LEITE CRU  
BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF PSYCHOTROPHIC BACTERIA AND  
THERMORESISTANT ENZYMES PRODUCTION IN RAW MILK

Preparado de acordo com as normas da revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

## RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho isolar e caracterizar bioquimicamente a microbiota psicrotrófica, bem como avaliar seu poder deteriorador no leite cru refrigerado, armazenado em tanques de expansão, individuais e coletivos, de propriedades das regiões Agreste e Sertão do Estado de Alagoas. Foram analisadas amostras de leite coletadas em 23 tanques individuais e 13 coletivos, onde se verificou a presença de bactérias psicrotróficas nos dois tipos de tanques de refrigeração, sendo um total de 105 isolados bacterianos. Foi detectada a predominância de bactérias psicrotróficas gram-negativas 78,09% (82/105), dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, enquanto que as bactérias gram-positivas foram da ordem de 21,90% (23/105) dos gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. *Pseudomonas* foi o gênero predominante com 43,81% (46/82). A grande maioria dos isolados bacterianos demonstrou alto poder de produção de enzimas extracelulares – protease, lipase e/ou lecitinase, evidenciando assim potencial deteriorador do leite e derivados. Estatisticamente não foi significativa a diferença de produção enzimática pelos isolados entre tanques individuais e coletivos, não havendo dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de enzimas e o tipo de tanque.

**Palavras-chave:** Gram-negativas, Proteases, Lipases, *Pseudomonas*, Termodúricos.

## ABSTRACT

The goal of this study was the isolation and biochemical characterization of psychotropic microbiota, evaluating its deteriorating potential on refrigerated raw milk stored in both individual and collective expansion tanks located in farms from Agreste and Sertão regions of Alagoas State. Milk samples from 23 (individual) and 13 (collective) tanks were analyzed, and the presence of psychotropic bacteria was diagnosed in both types of refrigeration tanks, totalizing 105 bacterial isolates. There was a predominance of gram-negative psychotropic bacteria 78,09% (82/105) from genus *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Shigella*, whereas gram-positive bacteria represented 21,90% (23/105) of total isolates, from genus *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus*. In general, *Pseudomonas* was the most prevalent genus isolated 43,81% (46/82). The majority of bacterial isolates had high extracellular enzymes production – protease, lipase and/or lecithinase, which evidenced elevate deteriorating potential for milk and its derivatives. There was no significant difference on enzymatic production among isolates or between

individual and collective tanks, as well as no dependency between total number of enzymatic producer bacterial isolates and tank type.

**Keywords:** Gram-negative, Proteases, Lipases, *Pseudomonas*, Thermotolerant.

## INTRODUÇÃO

O leite é constituído de proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e sais minerais, tornando-se um alimento bastante rico em nutrientes. Dessa forma, sua qualidade é foco de várias discussões dentro da produção leiteira em nosso país. O Brasil em 2015 ocupou o sexto lugar na produção mundial (IBGE, 2015), com cerca de 35 bilhões de litros, tendo um consumo per capita da ordem de 173,6 litros (CONAB, 2016).

O isolamento e a identificação de microrganismos em leite cru se tornam interessantes do ponto de vista de saúde pública, pois dependendo das espécies isoladas, ações direcionadas podem ser tomadas visando à melhoria de sua qualidade. A deterioração do leite é consequência, sobretudo do crescimento de microrganismos psicrófilos (Tebaldiet *et al.*, 2008).

As bactérias psicrófilas são aquelas que têm a habilidade de se desenvolverem em baixas temperaturas – abaixo de 7°C. Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo estar presentes nos mais diversos ambientes, independente do clima ou da estação do ano. A quantidade de bactérias psicrófilas necessárias em um determinado produto para que possa haver alterações e causar problemas está em torno de  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> (Pinto *et al.*, 2006).

No leite, os principais gêneros de bactérias psicrófilas são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Yersinia* e *Pseudomonas*, gram-negativos; *Bacillus*, *Listeria* e *Clostridium*, gram-positivos (Horst, 2006). Destacam-se como termorresistentes os gêneros *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, enquanto que *Clostridium* e *Bacillus* são formadores de esporos (Walstra *et al.*, 2001). Destes, o gênero *Pseudomonas* spp, é o mais frequente (Horst, 2006).

São as principais responsáveis pelo deterioramento do leite cru refrigerado e de seus derivados ao produzirem proteases, lipases e lecitinases, as quais hidrolisam a proteína e a gordura do leite. Apesar de a maior parte das bactérias psicrófilas não resistirem ao processo da pasteurização, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, persistindo mesmo ao tratamento UHT, continuando assim em atividade, trazendo grandes prejuízos através de suas ações, destacando variações no sabor e cheiro em diferentes

produtos (Arcuri *et al.*, 2008). Estas bactérias também estão relacionadas com intoxicações alimentares após o consumo do leite ou seus derivados.

Objetivou-se com esse trabalho isolar e caracterizar bioquimicamente a microbiota psicotrófica, bem como seu poder de produção de enzimas extracelulares no leite cru refrigerado armazenado em tanques de expansão, individuais e coletivos de propriedades das regiões Agreste e Sertão do Estado de Alagoas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em 23 tanques individuais e 13 tanques coletivos, após homogeneização mecânica programada, em propriedades das regiões do agreste e sertão alagoano, no período de outubro a novembro de 2016. Foram coletadas 72 amostras de leite, duas por tanque, em tubos estéreis de 50 ml, identificadas, acondicionadas e mantidas sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelo, sendo transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

Para a contagem e o isolamento, diluições das amostras foram plaqueadas em Plate Count Agar (PCA) e incubadas a 7°C por 10 dias. Após a contagem, foram isoladas cinco colônias de cada placa em ágar Nutriente, que foram incubadas a 21°C por 24 horas para identificação. Os resultados foram expressos como logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama de amostra ( $\log_{10}$  UFC $\text{ml}^{-1}$ ).

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à morfologia celular, coloração e reação de Gram, coloração de esporos, metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose (OF), à produção de oxidase e catalase, ao crescimento em Agar MacConkey, hidrólise da arginina, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S e indol em meio SIM, Ágar de ferro e Açúcar tríplice (TSI), teste de Vermelho de metila (VM), teste de Vogues-Proskauer (VP), teste de Citrato, hidrólise da Urease e formação de ácidos a partir de carboidratos.

As características culturais e morfológicas dos isolados foram convertidas em uma matriz binária de presença e ausência. Deste modo, agruparam-se os isolados em um dendrograma de similaridade, gerado por meio do aplicativo computacional PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis), utilizando o Coeficiente de Similaridade de Jaccard.

Foi realizada a identificação das bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado em nível de gênero conforme o Manual Bergey de Identificação Bacteriana (1994).

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto a sua capacidade de produção de proteases, lipases, e lecitinases. A produção destas enzimas foi avaliada pela formação de halo em torno da colônia e o diâmetro deste foi medido para uma estimativa quantitativa. A produção de enzimas extracelulares foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. A produção de proteases foi determinada em meio ágar leite (Difco, França), suplementado com 5% de leite em pó, com incubação a 21°C por 3 dias. A atividade da lipase extracelular foi avaliada em meio ágar base, suplementado com tributyrin, adicionado de solução de púrpura de bromocresol 1,5%. As placas foram incubadas a 21°C por 3 dias. A detecção de lecitinases foi determinada em ágar TSA, suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo, incubado a 21°C por 3 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram submetidos à análise estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação). Para análise estatística de contagem padrão em placas de psicrotróficos, foi feita a transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ), a fim de normalizar a distribuição de frequência. Para a avaliação da atividade enzimática foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em triplicata, e os dados foram analisados por meio de análise de co-variância (ANCOVA) e regressão, utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Fischer, ( $p=0,01$ ). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa XLSTAT e o Excel 2007.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de bactérias psicrotróficas nas amostras de leite foi similar para os dois tipos de tanques, variando entre 2,60 a 7,48  $\log_{10}\text{UFCml}^{-1}$  e, 2,00 a 7,84  $\log_{10}\text{UFCml}^{-1}$  (tanques individuais e coletivos respectivamente). Pinto et al. (2015) encontraram variações semelhantes, indo de 2,3 a 7,00  $\log_{10}\text{UFCml}^{-1}$  em tanques individuais, ao passo que em tanques comunitários, o intervalo de contagem variou de 3,95 a 6,50  $\log_{10}\text{UFCml}^{-1}$ .

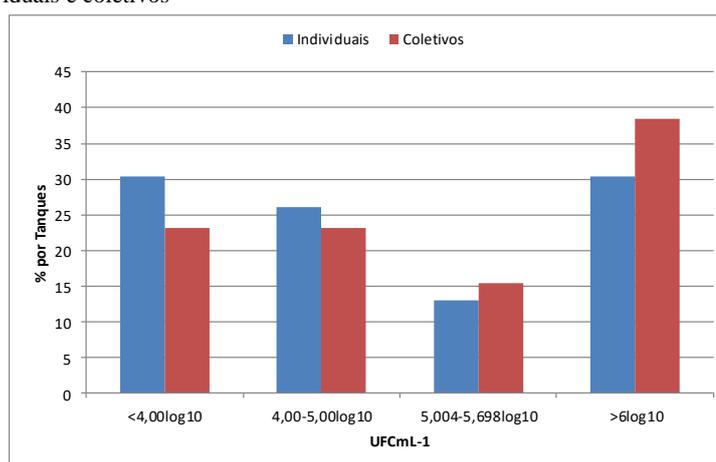
Silva (2003) também encontrou contagens altas de bactérias psicrotróficas em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de processadores de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Nessas amostras, as contagens de bactérias psicrotróficas variaram entre 6,15 e 7,94  $\log_{10}\text{UFCml}^{-1}$ , e diferenças significativas foram detectadas em função do Estado e da estação do ano.

Não existem limites estabelecidos por legislação para microrganismos psicrotróficos, porém, alguns autores verificaram que alterações bioquímicas se tornam

significativas na matéria-prima com contagens superiores a  $6,00 \log_{10} \text{UFCml}^{-1}$  (Pinto *et al.*, 2006). No entanto, outros relatos indicam que estas alterações podem ser percebidas com contagens menores, a partir de  $5,00 \log_{10} \text{UFCml}^{-1}$ .

Apenas a faixa de contagem de psicrotóxicos não é suficiente para se ter um panorama da condição dos tanques analisados, desse modo, considerando os índices mostrados por Thomas e Thomas (1973), os tanques individuais e comunitários foram separados em intervalos de contagens. O número de isolados dentro de cada uma das faixas está expresso em termos de porcentagem do total conforme mostra a Fig. 1.

Figura 1. Distribuição em porcentagem da contagem de bactérias psicrotóxicas ( $\log_{10} \text{UFCml}^{-1}$ ) em leite cru refrigerado em tanques individuais e coletivos



Contagens entre  $4,00$  e  $5,00 \log_{10} \text{UFCml}^{-1}$ , indicam a necessidade de melhorias na higiene de ordenha e/ou na higienização dos equipamentos utilizados. Conforme se verifica nesta pesquisa,  $30,34\%$  dos tanques individuais e  $23,08\%$  dos coletivos, estão dentro dos padrões de higiene preconizados. Contrariamente,  $38,46\%$  dos tanques coletivos e  $30,43\%$  dos individuais apresentaram contagens iguais ou superiores a  $6 \text{Log}_{10} \text{UFCml}^{-1}$ , sendo um indício definitivo de condições insatisfatórias de produção ou refrigeração do leite na fazenda.

Das amostras de leite cru refrigerado, foram selecionados 105 isolados bacterianos, havendo predominância de isolados caracterizados como bactérias gram-negativas,  $78\%$  (82 isolados) e  $22\%$  (23 isolados) gram-positivos. Este resultado está de acordo com outras pesquisas, nas quais esse grupo predomina como contaminantes mais frequentes do leite sob refrigeração (Arcuri *et al.*, 2008).

Considerando a morfologia, a maior parte foi de bastonetes, representando  $76,19\%$  dos isolados, os quais  $6,25\%$  foram gram-positivos e  $93,75\%$  gram-negativos, enquanto que

os cocos representaram 20,95% sendo, 18,18% gram-positivos e, 81,82% gram-negativos. Outras formas totalizaram 2,86% dos isolados.

A caracterização morfológica de colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. Predominou a forma circular e borda lisa, no entanto, as demais características apresentaram um considerável grau de diferenciação.

Todos os isolados apresentaram colônia com diâmetro maior que 1,0 mm, caracterizando-se também por apresentar: 1) formato circular e borda lisa 86,67%; 2) formato puntiforme e borda lisa 5,71%; 3) colônia granulosa com borda contínua 2,86%; 4) colônia rugosa com borda irregular 2,86%, e; 5) colônia larga com borda irregular 1,90%. Quanto à coloração da colônia, foram obtidos isolados de coloração branca leitosa (86,28%), amarela (8,00%), bege (2,86) e cinza (2,86%). Para os parâmetros elevação e transparência da colônia, os isolados apresentaram distribuição de 86,68% para elevação convexa, 11,42% côncava e 1,90% para elevação achatada, ainda 54% são colônias opacas e 46% são colônias translúcidas.

Os testes que tratam do metabolismo bacteriano são considerados os mais importantes, visto que na maioria das vezes estão relacionados com a presença de enzimas específicas. A pesquisa de catalase e oxidase é indispensável para a identificação bacteriana. As duas enzimas estão relacionadas com a proteção contra as formas reativas de oxigênio. A oxidase ou superóxido dismutase (SOD) converte o oxigênio ionizado presente em todos os aeróbios, anaeróbios facultativos e alguns aerotolerantes. De acordo com a resposta ao teste, as bactérias gram-negativas foram classificadas como: aeróbios estritos (catalase+; oxidase+) 13%, anaeróbios facultativos, que utilizam oxigênio como receptor final de elétrons (catalase+; oxidase-), 13%; anaeróbios estritos (catalase-; oxidase-), 65%; anaeróbios facultativos (catalase-; oxidase+)9% que fermentam e não utilizam oxigênio como receptor final de elétrons. Enquanto que as gram-positivas, 26% se caracterizaram como anaeróbios facultativos, que utilizam oxigênio como receptor final de elétrons e 74% aeróbios estritos.

A frequência e o percentual dos gêneros verificados nesta pesquisa podem ser observados na Tab. 1. Dentre os isolados identificados, *Pseudomonas* sp. foi o gênero predominante, com 46 isolados (43,81%), seguido por *Enterobacter* e *Streptococcus*, 15 (14,29%) e 12 isolados (11,43%), respectivamente.

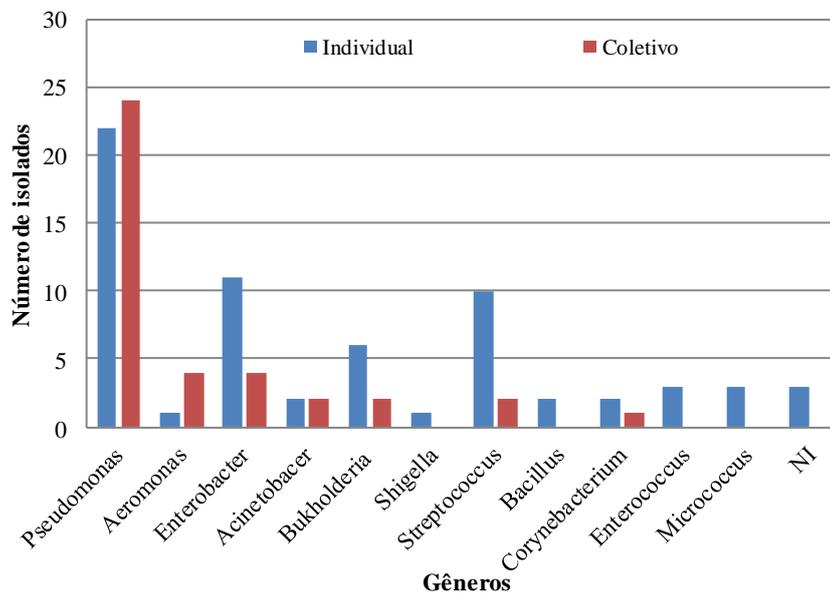
Tabela 1. Frequência e percentual de gêneros e bactérias psicrotróficas identificadas, isoladas de leite cru a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas\*

	Gêneros	Número de isolados	%de ocorrência	Grupo **
Gram -	<i>Pseudomonas</i>	46	43,81	04
	<i>Enterobacter</i>	15	14,29	05
	<i>Aeromonas</i>	05	4,76	05
	<i>Burkholderia</i>	08	7,62	04
	<i>Acinetobacter</i>	04	3,81	04
	<i>Shigella</i>	01	0,95	05
	Não identificado	03	2,86	-
Gram +	<i>Streptococcus</i>	12	11,43	17
	<i>Corynebacterium</i>	03	2,86	20
	<i>Enterococcus</i>	03	2,86	17
	<i>Micrococcus</i>	03	2,86	17
	<i>Bacillus</i>	02	1,90	18
	Total	105	100	

**\*Testes bioquímicos, \*\*Conforme Manual Bergey**

Com relação aos gêneros bacterianos, foi observado similaridade de 73,68% entre os dois tipos de tanque (Coeficiente de Jaccard). A Fig. 2 apresenta a distribuição dos gêneros por tipo de tanque.

Figura 2. Contagem de isolados por gêneros bacterianos psicrotróficos, presentes no leite cru refrigerado coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas por tipo de tanque (individual e coletivo)



Conforme se verifica, o gênero *Pseudomonas* representou o maior percentual do total de bactérias identificadas, 43,81%. Estes resultados são consistentes com os de outras pesquisas, em que também foram constatadas que espécies deste gênero representam a microbiota psicrotrófica deterioradora mais frequente do leite refrigerado (Wang e Jayarao, 2001; Aaku *et al.*, 2004; Pinto, 2005).

Arcuri *et al.* (2008), verificaram que de 308 isolados de microrganismos psicrotróficos, dos 250 que foram identificados como gram-negativos, a maioria foi identificada como *Pseudomonas* spp., representando 43,2% (108) dos isolados e destas, 87,0% (94) foram da espécie *P. fluorescens*. O mesmo ocorreu com experimento conduzido por Pinto *et al.* (2006) os quais relataram que dos 153 isolados, 66 (43,14%) pertenciam ao gênero *Pseudomonas* spp.

Também foi alta a contagem de bactérias do gênero *Enterobacter* sp. 15 (14,28%), verificando-se ainda outra enterobacteriaceae, *Shigella* sp. 01 (0,95%), podendo-se justificar seus isolamentos, pelo fato dos tanques de resfriamento estarem próximos aos estábulos, já que estas bactérias já foram isoladas das moscas de estábulo (*Stomoxys calcitrans*) por Moraes *et al.* (2004). Ávilla e Gallo (1996), em seu estudo, também identificaram 14 (46,68%) de 30 isolados bacterianos como sendo do gênero *Enterobacter* sp., os quais foram identificados também por Nörnberg *et al.* (2010) em estudo no Rio Grande do Sul, com contagens da ordem de 30% dos isolados bacterianos gram-negativos em leite cru refrigerado.

Apesar do baixo número de isolados, o gênero *Shigella* sp. assume grande importância por ser altamente patogênico, sendo responsável pela shigelose ou doença bacilar, infecção alimentar que acomete principalmente crianças entre um e 10 anos (Marques, 2008). Água contaminada com material fecal e os manipuladores são responsáveis por sua presença em alimentos, denotando falhas nas medidas de higiene.

A presença de *Enterococcus* sp. é comum na microbiota do leite cru, contudo, no Brasil, não são definidos padrões quanto a sua quantificação no produto. No presente estudo obteve-se 03 (2,86%) isolados bacterianos pertencentes a este gênero, indicando falhas na obtenção higiênica do leite por ser um microrganismo indicador de contaminação fecal nos alimentos, multiplicando-se no ambiente e abundantes nas fezes animais (Menezes *et al.*, 2015). *Enterococcus* sp. também foi demonstrado por outros autores em amostras de leite, como os relatados por Holm *et al.* (2004), que verificaram contagens de 5,00 log<sub>10</sub>UFCml<sup>-1</sup> isolados de tanques na Dinamarca, e Tebaldi *et al.* (2008), que isolaram estes microrganismos em leite cru de propriedades leiteiras no município de Boa Esperança – MG, com contagens chegando até 7,23 log<sub>10</sub>UFCml<sup>-1</sup>.

Também foram isolados microrganismos termodúricos, aqueles com capacidade de sobreviverem aos tratamentos térmicos (pasteurização), dentre eles: *Streptococcus* sp. 12 (11,43%), *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* spp., e *Micrococcus* sp., 3 (2,86%) cada, além

de bactérias do gênero *Bacillus* sp., 2 (1,90%), sendo de grande importância por desenvolverem ação deteriorante do leite pasteurizado, e por serem termorresistentes, continuando com a produção de enzimas hidrolíticas que podem estar associadas fortemente à diminuição da vida útil do leite e seus derivados.

Várias espécies de *Bacillus* são capazes de produzir esporos altamente resistentes ao calor. Segundo Scheldeman *et al.* (2006), alguns bacilos sobrevivem ao tratamento UHT (2-5s, 140-145°C), desempenhando um papel na deterioração do leite, acarretado pelo seu desenvolvimento posterior ao tratamento térmico. A deterioração do leite por espécies de *Bacillus* é proporcionada por suas enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis.

Ribeiro Júnior *et al.* (2014), verificaram contagens médias de 3,54 log<sub>10</sub>UFCml<sup>-1</sup> de termodúricos psicrotróficos ao analisarem 20 amostras de leite cru refrigerado no norte do Paraná. Pinto *et al.* (2015), também isolaram bactérias dos gêneros *Enterococcus* sp. e *Bacillus* sp. de amostras de leite cru refrigerado.

A presença de bactérias do gênero *Bacillus* em tanques de refrigeração desperta o interesse não só pela característica deteriorante, mas também pela possibilidade de ocorrerem espécies patogênicas como *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* que podem produzir toxinas responsáveis por quadros de gastroenterites em seres humanos (Jay, 2005).

*Streptococcus* e *Corynebacterium* no leite podem indicar a presença de animais doentes no rebanho. Segundo Bizari (2002), 90% das mastites são ocasionadas por bactérias do gênero *Streptococcus*. Estes microrganismos podem ser encontrados em leite proveniente de vacas com mastite.

Ainda foram isoladas bactérias gram-negativas patogênicas dos gêneros *Acinetobacter* sp. 4 (3,81%), *Burkholderia* sp. 8 (7,61%) e *Aeromonas* sp. 5 (4,76%), como verificados em estudo por Pinto *et al.* (2015), Nörnberg, (2009) e Arcuri *et al.* (2008), onde os autores demonstraram seus altos poderes deteriorantes através das atividades lipolíticas e proteolíticas. Carneiro e Rossi Júnior (2006), analisando possíveis pontos de contaminação e disseminação de bactérias do gênero *Aeromonas* sp. na linha de produção, constataram ser positivas em 90% das amostras de leite cru, 30% das de leite da saída do pasteurizador, 40% nas de leite do tanque de abastecimento da máquina de empacotar e 25% das amostras de leite pronto para consumo. Ainda segundo os autores, este gênero possui capacidade de sobreviver e multiplicar em alimentos mantidos sob refrigeração, como o leite, e, várias

cepas são capazes de produzir toxinas. Sua presença em leite pasteurizado, particularmente no tipo A, pode conferir a este produto um sério risco à saúde.

A análise estatística do número de isolados proteolíticos, lipolíticos e lecitinolíticos, não detectou diferenças significativas entre tanques individuais e coletivos, (teste  $F < 0,0001$ ), indicando que não houve dependência entre o número de isolados bacterianos produtores de enzimas e o tipo de tanque.

Em sua grande maioria, os psicrotróficos são eliminados pelos tratamentos térmicos de beneficiamento do leite. A relevância desses microrganismos encontra-se na sua alta capacidade de síntese de enzimas exógenas ou extracelulares (proteases e lipases) termoestáveis, frente aos diferentes binômios empregados no beneficiamento do leite. A presença de psicrotróficos em concentrações superiores a  $6,00 \log_{10} \text{UFCml}^{-1}$  é correlacionada com a produção dessas enzimas em concentrações significativas e com os produtos resultantes da proteólise e lipólise (Vidal-Martins *et al.*, 2005).

Quanto à produção de enzimas, não foram detectadas diferenças significativas entre isolados gram-positivos e gram-negativos. Os psicrotróficos gram-positivos identificados neste trabalho apresentaram potencial para produção de proteases e lipases, evidenciando suas características deterioradoras, verificando-se que 15 (65,21%) isolados testados produziram proteases e 9 (39,13%), produziram lípases. Lecitinase foi expressa por 4 (17,39%) isolados. Quanto aos gram-negativos verificou-se que 65 (79,27%) produziram proteases, 62 (75,61%) produziram lipases e 47 (57,32 %) lecitinase. A produção de lecitinase foi observada em menor número em ambos os grupos.

Diversos estudos corroboram com esses resultados, dentre eles os citados por Arcuri (2003), que afirmam que as proteases e as lípases estão diretamente associadas à deterioração do leite e derivados, tendo ainda a lecitinase também relacionada, porém em menor escala.

A Tab. 2 apresenta o percentual de isolados produtores de enzimas em cada gênero. Dentre os isolados gram-positivos, bactérias dos gêneros *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.* e *Enterococcus sp.*, desenvolveram atividades proteolíticas, lipolíticas e lecitinolíticas, variando apenas suas proporções. Em contra-ponto, isolados do gênero *Streptococcus sp.*, apresentaram apenas atividade proteolítica, enquanto que os *Micrococcus sp.*, foram capazes de ações proteolíticas e lipolíticas. Diferentemente do que foi relatado por Pinto *et al.* (2015), que verificaram em sua pesquisa que as bactérias gram-positivas foram predominantemente proteolíticas, apresentando baixas proporções de isolados que

produziram lipases e lecitinases. Ribeiro Júnior *et al.* (2014), em estudo com bactérias gram-positivas termodúricas, utilizando 347 colônias isoladas, demonstraram que 142 (40,1%) apresentaram atividade enzimática de proteólise.

Tabela 2. Produção de enzimas extracelulares por bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado, coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas

	Gêneros	% de isolados produtores de enzimas		
		Protease	Lipase	Lectinase
Gram+	<i>Streptococcus</i>	41,66	-	-
	<i>Corynebacterium</i>	100,00	100,00	66,67
	<i>Enterococcus</i>	100,00	66,67	66,67
	<i>Micrococcus</i>	66,67	66,67	-
	<i>Bacillus</i>	100,00	100,00	100,00
	Gram -	<i>Pseudomonas</i>	97,82	93,47
<i>Enterobacter</i>		33,30	-	-
<i>Aeromonas</i>		100,00	100,00	40,00
<i>Burkholderia</i>		87,50	87,50	75,00
<i>Acinetobacter</i>		-	50,00	-
<i>Shigella</i>		-	-	-
Não identificado		100,00	100,00	33,33

Já dentre os isolados gram-negativos, os gêneros *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Burkholderia* sp., apresentaram o maior número de isolados com atividade enzimática (Tab. 2). Entretanto, *Enterobacter* sp. e *Acinetobacter* sp., apresentaram apenas atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente, contrastando com bactérias do gênero *Shigella* sp., que não desenvolveu nenhuma atividade enzimática. Wang e Jayarao (2001), em seus estudos também observaram formação de proteases por *Pseudomonas* sp. em 80,91% dos isolados bacterianos, e 58% destes tiveram atividade lipolítica. De maneira distinta, após analisarem 33 isolados do gênero *Pseudomonas* sp., Hantsis-Zacharov e Halpern (2007), verificaram que a lipólise foi maior entre eles, atingindo uma proporção de 74%.

No presente estudo, o número de isolados bacterianos psicrotróficos proteolíticos e lipolíticos, foi maior em tanques individuais, contrastando com o relatado por Catanio *et al.* (2013), os quais verificaram que estes haviam sido em maior número nos tanques coletivos. Os autores ainda afirmam que um reduzido número de bactérias psicrotróficas, é suficiente para a produção de enzimas extracelulares, maiores responsáveis pelas alterações dos produtos lácteos.

Neste estudo, os isolados do gênero *Pseudomonas* sp., apresentaram atividades de proteólise relacionadas com atividades lipolíticas e de lecitinase, fato também verificado por Pinto *et al.* (2015).

A avaliação quantitativa da produção de proteases, lipases e lectinases, que é expressa pela hidrólise da caseína e dos lipídios do leite através da formação do halo em volta da colônia de crescimento, pode ser visualizada na Tab. 3. Conforme se verifica, os isolados do gênero *Bacillus* apresentaram maiores halos para as três enzimas, seguido por *Pseudomonas* e *Corynebacterium*, maiores halos e, portanto, maior potencial deteriorador.

Tabela 3. Atividade proteolítica, lipolítica e lecitinolítica por bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado, coletado a partir de tanques de refrigeração localizados no Agreste e Sertão de Alagoas, incubadas a 21°C\*

Gêneros	Prot24	Prot48	Prot72	Lip24	Lip48	Lip 72	Lec24	Lec48	Lec72
<i>Bacillus</i>	10,144 a	18,787 a	25,204 a	9,644 a	11,847 a	16,759 a	3,333 a	7,778 a	15,921 a
<i>Pseudomonas</i>	5,364 b	13,213 b	19,782 ab	2,378 cd	13,167 a	18,762 a	0,703 b	1,787 bc	3,571 bc
<i>Corynebacterium</i>	3,381 cd	9,985 bc	15,235 bc	2,881 bc	15,949 a	15,420 a	0,000 b	1,926 bc	4,196 b
<i>Bukholderia</i>	4,481 bc	7,255 cd	12,796 c	3,731 bc	4,611 bc	4,741 bc	0,583 b	1,847 bc	3,204 bc
NI	3,301 cd	8,824 cd	13,296 c	4,023 b	6,486 b	7,963 b	0,667 b	1,000 cd	1,079 cd
<i>Enterococcus</i>	1,285 e	6,127 cde	11,877 c	1,230 de	4,051 bc	8,802 b	0,667 b	2,852 b	4,471 b
<i>Aeromonas</i>	3,323 cd	4,846 de	5,896 d	1,023 de	2,553 bc	4,141 bc	0,667 b	0,756 cd	1,279 cd
<i>Micrococcus</i>	2,063 de	3,127 ef	4,210 d	0,785 de	3,384 bc	3,914 bc	-	-	-
<i>Acitenobacter</i>	0,190 e	0,380 f	0,630 d	1,023 de	1,403 c	2,991 bc	-	-	-
<i>Eenterobacter</i>	0,190 e	0,491 f	1,096 d	0,068 e	0,264 c	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	0,190 e	0,380 f	0,630 d	0,023 e	0,153 c	-	0,017 b	-	-
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pr>F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Fischer (P<0,01)

## CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa indicam que na maioria das propriedades estudadas, as condições higiênico-sanitárias de produção e/ou de resfriamento do leite se mostraram insatisfatórias. Predominaram as bactérias gram-negativas, sendo *Pseudomonas* o gênero isolado com maior frequência. Houve uma grande relação dos gêneros isolados com a produção de enzimas extracelulares – proteases, lipases e lectinases.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAKU, E. N.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A.; MPUCHANE, S. Microbiological quality of Milk from two processing plants in Gaborone Botswana. **Food Control**, v.15 n. 3, p. 181-186, 2004.
- ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos.

In: BRITO, J.R.F. ;PORTUGAL, J.A.B. (ed). **Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo Gráfica, 2003, p.105-115.

ÁVILLA, C.R.; GALLO, C.R.. Pesquisa de Salmonella spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**, Piracicaba , v. 53, n. 1, p. 159-163, Jan. 1996 .

BERGEYS' **Manual Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994. 787p.

BIZARI, P. A. **Eficiência da contagem microscópica da matéria-prima utilizada no processamento de leite UAT\* (\*ultra alta temperatura)**. 2002. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

CARNEIRO, M.S.; ROSSI JUNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.3, p.271-276, jul./set., 2006.

CATANIO, F.S.et al. Qualidade do leite cru refrigerado de uma planta de processamento, no norte do Paraná, após a implementação das mudanças impostas pela NI 62 de 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6 Supl 2, p. 3171-3180, 2013.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária**. v.4. Safra 2016/2017 Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_09\\_13\\_09\\_06\\_46\\_perspectivas\\_d\\_a\\_agropecuaria\\_2016-17\\_digital.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_13_09_06_46_perspectivas_d_a_agropecuaria_2016-17_digital.pdf) > Acesso em: 10 jul 2017

HANTSIS-ZACHAROV, E; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw Milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

HOLM, C. et al. Predominant microflora of down graded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.87,n.5, p.1151-1157, 2004.

HORST, J.A. Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite. In: MESQUITA, A.J; DURR, J.W.; COELHO, K.O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006, v.1, p.163-174.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal 2015** Disponível

em:<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)> Acesso em: 10 jul 2017

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

MARQUES, S. C. **Caracterização bioquímica de bactérias psicrotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescense* *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável**. 2008. 58 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A. C.; MORÃO, R. P.; REIS, S. V.; SANTOS, C. A.; LOPES, I. L. N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 58-63.2015.

MORAES, A.P.R. et al. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n. 4, p. 143-149, 2004.

NÖRNBERG, M.F.B.L. **Atividade Proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microorganismos psicrotróficos em leite bovino**. 2009. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, RS, 2009.

NÖRNBERG, M.F.B.L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacterial isolated from refrigerate draw milk. **Internacional Journal of Dairy Technology**, v. 63, n.1, p. 41-46, Feb, 2010.

PINTO, C. L. O. et al. Identification of proteolytic psychrotrophic bactéria isolated from refrigerated raw Milk and characterization of its spoilage potential. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 105-116, mar/abr, 2015.

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

PINTO, U.M. **Quorumsensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite**. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Microrganismos termodúricos psicrotróficos com atividade proteolítica em leite cru refrigerado. In: SUL LEITE – SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 6.,

2014, Maringá. **Anais**. Maringá: UEM, 2014. CD-ROM.

SCHELDEMAN, P., HERMAN, L., FOSTER, S., HEYNDRICKX, M. *Bacillus sporo thermodurans* and other highly heat-resistant sporeformers in milk. **Journal Applied Microbiology**, v. 101, p.542–555, 2006.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

TEBALDI, V.M.R. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28,n.3, p. 753-760, 2008.

THOMAS, S.B.; THOMAS, B.F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. 1. **Dairy Industries**, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973

VIDAL-MARTINS, A.M.C. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.4, p. 698-704, out.-dez. 2005.

WALSTRA, P. et al. **Ciencia de La leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia; 2001, 730p.

WANG, L; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n.6, p. 1421-1429, 2001.