

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

LARIANE SOUZA DA SILVA

**RASTREAMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM
ETAPAS DE ORDENHA E QUANTIFICAÇÃO DE
CASEÍNOMACROPEPTÍDEO EM LEITE CRU**

Marechal Cândido Rondon - PR

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

LARIANE SOUZA DA SILVA

RASTREAMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM
ETAPAS DE ORDENHA E QUANTIFICAÇÃO DE
CASEÍNOMACROPEPTÍDEO EM LEITE CRU

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Orientação: Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza

Coorientação: Profa. Dra. Maximiliane Alavarse
Zambom
Profa. Dra. Patricia Barcelos Costa

Marechal Cândido Rondon - PR

2015

S586r Silva, Lariane Souza da

Rastreamento de microrganismos psicrotróficos em etapas de ordenha e quantificação de caseínomacropéptido em leite cru / Lariane Souza da Silva. Marechal Cândido Rondon /PR, 2015.

64 f.

Orientador: Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

1. Leite-qualidade. 2. Leite-microbiologia. 3. Proteólise. 4. Pseudomonas I. Pozza, Magali Soares dos Santos. II. UNIOESTE. III. Título.

CDD: 637.127

Mariana Senhorini Caron – Bibliotecária – CRB9/1462

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

LARIANE SOUZA DA SILVA

RASTREAMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM
ETAPAS DE ORDENHA E QUANTIFICAÇÃO DE
CASEÍNOMACROPEPTÍDEO EM LEITE CRU

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do oeste do Paraná.

Orientação: Prof^ª Dr^a Magali Soares dos Santos Pozza

Coorientação: Prof^ª Dr^a Maximiliane Alavarse Zambom

Prof^ª. Dr^a Patricia Barcelos Costa

Marechal Cândido Rondon, ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^a Magali Soares dos Santos Pozza
Orientadora

Prof^ª Dr^a Luciana de Oliveira de Fariña

Prof^ª Dr^a Deisy A. Drunkler
Membro externo

A Deus por estar sempre presente em minha vida

*A minha mãe Reni F. de Souza a quem amo tanto admiro e se faz minha fonte de
inspiração todos os dias*

*Ao meu amado pai Ademir Rodrigues da Silva (In memoriam) a quem tanto amo,
pelos ensinamentos de valores em tão pouco tempo presente em minha vida.*

*A minha vó Pedrina Rodrigues de Souza a quem é impossível eu não amar, por
acreditar em meus sonhos e me ajudar sempre com seu carinho e dedicação a enfrentar
os obstáculos da vida.*

*Ao meu esposo Anderson Rossi pela dedicação em nosso casamento e sempre
me ajudar nos momentos mais difíceis, e principalmente pelo amor sincero.*

*A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e entenderam os
momentos importantes da vida em que não foi possível estar presente*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar.

A minha família, por me compreender em momentos que não pude estar presente, muitas vezes.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Dra. Magali Soares dos Santos Possa, pela orientação e ensinamentos para a execução do trabalho, da melhor maneira possível e pela paciência.

À professora Dra. Maximiliane Alavarse Zambom, pela orientação e por seus ensinamentos.

À professora Dra. Luciana Oliveira de Fariña, pelas orientações, ensinamentos e direção tanto pessoal quanto profissional, pelo direcionamento durante a fase experimental e escrita e pela amizade.

À professora Dra. Nereida Mello da Rosa Gioppo, pelas preocupações para que sempre tudo ocorresse tranquilamente, pela amizade, apoio profissional e pessoal.

À professora Dra. Luciana Bill Mikito, pelas orientações e contribuições para este trabalho.

À professora Dra. Ana Tereza Bittencourt, pelas orientações e dedicação com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Leorges Moraes Fonseca, pelas breves e perfeitas orientações para a orientação do trabalho.

Ao Prof. Dr Ricardo V. Nunes e à professora Dra. Marcela A. Neres, pela ajuda com os materiais para a execução do experimento.

Ao Paulo Henrique Morch, secretário da Pós Graduação, pela dedicação e por sua disposição para sempre resolver os problemas da melhor maneira possível.

Aos produtores da Cooperativa localizada na região oeste do Paraná, por sempre me receberem da melhor maneira possível e com uma maravilhosa simpatia.

À seção de transporte da Unioeste, *campus* de Cascavel - PR, por, sempre que necessário, cederem o carro para as coletas das amostras.

Ao Marcelo Roger Menegatti, pela dedicação sem medir esforços para as coletas deste trabalho.

Aos amigos maravilhosos e sinceros que fiz durante essa faze, Andressa Faccenda, André Sanches, Ana Lucia Almeida Santana, mesmo estando longe estiveram sempre presentes em minha vida.

A Hâmara Milaneze de Souza, minha sempre companheira em todas as etapas deste trabalho, com dedicação e auxílio, sempre sem medir esforços.

"Ninguém é suficientemente perfeito que não possa aprender com o outro, e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão."

São Francisco de Assis

RASTREAMENTO DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM ETAPAS DE ORDENHA E QUANTIFICAÇÃO DE CASEÍNOMACROPEPTÍDEO EM LEITE CRU

RESUMO

A crescente demanda por leite para a abastecimento da população promoveu a necessidade de evolução dessa cadeia, principalmente no que diz respeito aos aspectos relacionados à segurança dos alimentos. O presente estudo rastreou microrganismos psicrotróficos e proteolíticos que realizam a quebra da principal proteína leiteira, a k-caseína, com destaque para a identificação e preservação de *Pseudomonas* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essa espécie é de alta virulência, com importância em saúde pública e também em formação de biofilmes em superfícies diversas. As amostras coletadas para rastreamento provieram das etapas de ordenha e foram coletadas com *swabs* de mão, em teto, balde, resfriador, insuflador, e a coleta do leite cru e da água da ordenha. Utilizou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis para o rastreamento dos microrganismos nas etapas de ordenha e os resultados da avaliação do CMP foram obtidos pela Análise de Componentes Principais. Os resultados indicaram que: à medida que a contagem de bactérias psicrotróficas aumentou ($p < 0,05$), diminuíram-se os valores para o CMP, indicando menor nível de proteólise, o que possivelmente poderia estar relacionado ao fato dos microrganismos psicrotróficos presentes nas amostras não possuíam a capacidade proteolítica. O ponto de maior contaminação indicado no rastreamento foi a superfície de teto dos animais, devido ao manejo adotado, pois a maioria dos produtores não realizavam a higienização correta.

Palavras-chave: *Pseudomonas*, Proteólise, Qualidade do leite.

TRACKING OF PSYCHROTROPHIC MICROORGANISMS IN MILKING STEPS AND QUANTIFICATION OF CASEINMACROPEPTIDE IN RAW MILK

ABSTRACT

The growing demand of milk to supply the population has promoted the evolution of this chain, especially with regard to aspects related to food safety. Thus, this study traced psychrotrophic and proteolytic microorganisms, which are responsible for the separation of the main milk protein, k-casein, with emphasis on identifying and preserving *Pseudomonas* and *Pseudomonas aeruginosa*. This species presents high virulence, thus, it is very important to public health and to produce biofilm on several surfaces. The tracing samples were collected from the milking phases and were collected with hand swabs on udder, bucket, cooler, blower, raw milk collection and of milking water. The nonparametric Kruskal-Wallis analysis was used to screening of microorganisms in milking phases, while CMP evaluation results were obtained by the Principal Component Analysis. The results indicated that as the psychrotrophic bacteria counting increased ($p < 0.05$), CMP values decreased. This has indicated lower levels of proteolysis, and it could possibly be related to the fact that psychrotrophic microorganisms present in samples did not have the proteolytic ability. The highest point of contamination indicated in tracing was the surface of the animals' udder due to the adopted management, since most producers did not carry out a correct hygiene during this phase.

Keywords: *Pseudomonas*, proteolysis, milk quality.

LISTAS DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO 1

Figura 1	Estrutura da micela de caseína.....	22
Figura 2	Local da hidrólise.	23

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO 2

Figura 1	Diagrama de ordenação representando os dois primeiros eixos da análise de componentes principais para as variáveis relativas à contagem de bactérias e CMP.....	43
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO 3

Figura 1	Representação dos pontos das etapas de ordenha.....	56
-----------------	---	----

LISTAS DE TABELAS

LISTA DE TABELAS – ARTIGO 1

Tabela 1	Principais proteínas do leite.....	20
Tabela 2	Tipos de refrigeração recomendada pela IN 62/2011.....	25
Tabela 3	Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27

LISTA DE TABELAS – ARTIGO 2

Tabela 1	Características observadas nas propriedades leiteiras, durante a ordenha...	39
Tabela 2	Resultados das contagens microbiológicas - 1ª Coleta.....	40
Tabela 3	Resultados das contagens microbiológicas, tempo de coleta e análise de caseinomacropéptido - 2ª Coleta.....	42
Tabela 4	Cargas fatoriais das variáveis analisadas no leite de 11 produtores	42

LISTA DE TABELAS – ARTIGO 3

Tabela 1	Resultados expressos em Log UFC/mL, do rastreamento para psicrotróficos em etapas de ordenha.....	53
Tabela 2	Resultados expressos em log UFC/mL, da contagem de <i>Pseudomonas</i> spp em etapas de ordenha.....	55
Tabela 3	Resultados expressos em log UFC/mL, da contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em etapas de ordenha.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Qualidade do leite	17
2.1.1	Qualidade microbiológica do leite.....	18
2.2	Proteína	20
2.3	Processo bioquímico da proteólise microbiana	22
2.4	Coleta, transporte e armazenamento.....	24
2.5	Qualidade da água em propriedades leiteiras	25
2.6	Família pseudomonadaceae	26
2.7	Referências	28
3	PRESENÇA DE PSICROTRÓFICOS TOTAIS <i>PSEUDOMONAS</i> SPP E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> E AVALIAÇÃO DE PROTEÓLISE EM LEITE CRU	32
3.1	Introdução	34
3.2	Material e métodos	36
3.2.1	Avaliação do manejo nas propriedades	36
3.2.2	Coleta das amostras	36
3.2.3	Análises microbiológicas.....	37
3.2.4	Quantificação de CMP.....	37
3.2.5	Análise estatística	38
3.3	Resultados e discussão.....	38
3.4	Conclusão	44
3.5	Referências	44
4	RASTREAMENTO DE PSICROTRÓFICOS TOTAIS, <i>Pseudomonas</i> <i>spp</i> E <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM ETAPAS DE ORDENHA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	48
4.1	Introdução	50

4.2	Material e métodos	52
4.2.1	Aplicação de formulário	52
4.2.2	Coleta e transporte	52
4.2.3	Análises microbiológicas.....	52
4.2.4	Análise estatística	53
4.3	Resultados e discussão.....	53
4.4	Conclusão	57
4.5	Referências	58
ANEXOS		60
ANEXO A Formulário das atividades desenvolvidas nas propriedades		61
ANEXO B Imagens dos processos com o leite.....		62
ANEXO C Quadro dos valores encontrados para Caseinomacropéptido entre primeira e segunda coletas.....		64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é, atualmente, o quarto maior produtor mundial de leite. Em 2013, produziu 34 bilhões de litros e obteve um valor bruto da produção de quase R\$ 23 bilhões. O Sudeste e o Sul se destacaram nessa atividade e responderam por mais de 60% da produção nacional. Nesse mesmo ano, o Paraná ocupou a terceira posição na produção brasileira, com 3,5 bilhões de litros. Sendo a região oeste paranaense um importante polo processador de produtos lácteos no estado, juntamente com as regiões sudoeste e noroeste processam 80% do queijo produzido no estado (PARANÁ, 2013; BRASIL, 2014).

A produção de leite ultra alta temperatura (UAT) se distribui, principalmente, nas regiões norte central, oeste e sudoeste do Paraná. Na região oeste, houve um crescimento de 26% na produção de leite, e um aumento do rebanho de vacas em lactação de 9%, de 2001 até 2011 (PARANÁ, 2013).

O consumo de leite e de produtos lácteos segue aumentando no Brasil, conforme a renda da população aumenta. Porém, o consumo ainda se encontra abaixo do recomendado. Enquanto cada pessoa deveria consumir, de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde, por volta de 210 litros de leite por ano, o país é capaz de fornecer apenas cerca de 170 litros de leite por habitante ao ano (BRASIL, 2014).

O comportamento de consumo dos produtos lácteos pela população brasileira também vem evoluindo. Quanto aos compostos do leite, o que antes era prioridade no consumo, como a gordura, passou para segundo plano. Atualmente, são mais valorizados os produtos, cujas proteínas sejam o principal componente, como queijos, iogurtes e leite desnatado. Isso ocorre em função da busca pelos benefícios decorrentes do consumo de proteínas, inclusive dos alimentos com propriedades funcionais (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). As indústrias leiteiras passaram a seguir essa linha para se adequar as necessidades do consumidor (PINHEIRO, 2009).

Segundo as perspectivas da Companhia Nacional de Abastecimento, o consumo de derivados de leite estará em crescimento até 2022, assim, para equiparar a produção à demanda, as indústrias terão que produzir mais e com alta qualidade (MAPA, 2013).

Viotto (2006) destaca que o pagamento por qualidade do leite, além da quantidade, pode ser um fator a ser considerado, já que um leite mastítico causa um aumento de proteína do soro e acarreta a desestabilização das micelas de caseína, a proteína mais importante para a produção de queijos e, também, reduz a produção leiteira. Dessa forma, o produtor passaria a se preocupar com a higiene empregada na propriedade, pois o leite, uma vez contaminado, não tem mais a qualidade recuperada, mesmo após o tratamento térmico, pois, embora haja diminuição dos microrganismos, suas enzimas permanecem ativas e causam problemas ao longo de vida de prateleira do produto (PINHEIRO, 2009). Por panorama, surge a necessidade da produção de leite de melhor qualidade, com menor presença microbiana para um maior rendimento.

Os microrganismos psicotróficos e proteolíticos do gênero *Pseudomonas* são a principal causa de deterioração da matéria prima leiteira. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é oportunista, capaz de causar infecções secundárias da glândula mamária e formação de biofilmes. Dessa forma, em função da sua importância em saúde pública, o objetivo deste estudo foi rastrear estes microrganismos, quantificá-los nas etapas da ordenha e avaliar o nível de proteólise presente no leite cru, proveniente de propriedades leiteiras de uma cooperativa na região oeste do Paraná, em tanques de refrigeração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade do leite

O leite possui cerca de 86,6% de água e 13,4% de sólidos totais (MUNHOZ, 2011); apresenta substâncias em forma de emulsão (gordura), suspensão (caseína, sais) e solução (lactose, proteínas do soro) (PEREDA, 2005). Esses constituintes podem variar em função de diversos fatores, como raça do gado, intervalos entre ordenhas, diferenças fisiológicas, estação do ano, nutrição e, principalmente, higiene no manejo da ordenha, pois se houver contaminação da matéria prima nesta fase, ela não poderá ser recuperada, pois as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas serão comprometidas por diversas atividades microbianas (PINHEIRO, 2009).

O armazenamento do leite sob refrigeração é outro fator muito importante, em se tratando da qualidade do produto, visando à redução de multiplicação de microrganismos mesófilos, os quais tem como crescimento temperaturas entre 20° a 45°C, porém, o grupo de psicotróficos está associado com manejo inadequado de higiene, tendo em vista que esse grupo possui capacidade de crescimento em temperatura de refrigeração e permanecem se multiplicando (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

A Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que o leite deve ser coletado na propriedade leiteira em, no máximo 48 horas, sendo o recomendado 24 horas. Essa Instrução regulamenta também o máximo de Contagens de Células Somáticas (CCS) e de Contagem Bacteriana Total (CBT), as quais devem apresentar 300 000 UFC e 500 000 CCS/ML, respectivamente.

A CCS é um meio de diagnóstico da mastite subclínica e também serve como medida padrão internacional para determinar a qualidade do leite. Altas contagens de CCS podem influenciar na diminuição dos componentes do leite (proteína, gordura e lactose), por modificarem a permeabilidade dos vasos sanguíneos e por diminuir a síntese do tecido secretor (RIBAS *et al.*, 2014). Maieski (2011) verificou que amostras

de leite com até 500 000 (cél/mL) apresentam maior teor de gordura do que as amostras com elevada CCS.

Quanto a CBT, é um indicador da higiene do manejo com os animais durante a ordenha e lavagem de utensílios. Segundo Maieski (2011), quanto maior a contagem bacteriana menor será o tempo de conservação do produto.

Silva, Marcondes e Jácome (2013) avaliaram os sistemas de produção em: confinamento, semiconfinamento e extensivo, e verificaram que, nos três sistemas, não houve diferenças entre os parâmetros gordura, proteína e CCS. No entanto, a CBT teve alterações mínimas no sistema semiextensivo e semiconfinado, resultados que o autor relacionou com a chegada de animais com o úbere sujo. Por fim, os autores destacaram que esses resultados estão dentro dos padrões da legislação e concluiu que o sistema de produção não interfere na porcentagem de gordura, proteína CCS e CBT, mas a qualidade da higiene sim.

2.1.1 Qualidade microbiológica do leite

O leite, mesmo procedente de animais sadios, possui contaminação microbiana decorrente de vários fatores, dependendo do tipo de manejo adotado na propriedade, sendo as fontes principais de contaminação: os equipamentos, o interior e o exterior do úbere. Porém, é difícil saber qual a principal fonte de contaminação pelas contagens bacterianas totais, sendo necessário realizar protocolos de quantificação de grupos específicos (PEREDA, 2005).

Dentre os microrganismos presentes no leite, os mais importantes são as bactérias mesófilas, termófilas e as psicrotróficas, sendo este último grupo o responsável pela diminuição do rendimento lácteo e ocasionar problemas de prateleira (RABELO, 2012).

Microrganismos psicrotróficos são aqueles capazes de se desenvolver em temperatura abaixo de 7 °C, ou seja, temperatura de refrigeração. Apresentam características mesofílicas (multiplicação entre 25 e 35 °C) e estão amplamente distribuídos na natureza: água, solo, plantas e animais. Os principais grupos de psicrotróficos envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas* spp e *Bacillus* spp,

porém, há uma maior predominância de *Pseudomonas* spp (MELO JUNIOR, 2005; PEREDA, 2005; RABELO, 2012).

A importância da diminuição desses microrganismos, pela higiene no campo, é dada pela capacidade dos psicrotróficos de produzirem enzimas como proteases, lipases e fosfolipases, capazes de hidrolisar gordura e proteína. Essas enzimas, produzidas pelas psicrotróficas, são capazes de prejudicar o produto final (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009), pois o microrganismo não sobrevive ao tratamento térmico, porém, as enzimas que são produzidas durante a multiplicação possuem a característica de termorresistência e permanecem ativas mesmo após o tratamento térmico, ocasionando a proteólise no produto final e provocando alterações sensoriais, como sabor rançoso, gelificação e odores, ao longo de vida de prateleira.

Segundo Melo Junior (2005), há vários tipos de proteases, sendo algumas originárias do sangue do animal e outras derivadas da ação bacteriana. A plasmina, decorrente do sistema de defesa do organismo, é a principal enzima proteolítica presente no leite fresco. Mesmo com baixa CCS e CBT, o leite possui naturalmente quatro vezes mais plasminogênio associado à caseína, porém, qualquer fator, como por exemplo, um processo infeccioso da glândula mamária que faça a conversão da plasmina, resulta em hidrólise de α e β -caseínas, ou seja, pode-se ter baixa hidrólise e, possivelmente, a não degradação da K-caseína. No entanto, a hidrólise causada pelas altas CCS e CBT foi demonstrada por Gigante (2004) com a coagulação do leite, pois altas CCS e CBT podem ser o resultado de infecções da glândula mamária e esse pode ser o fator que predispõe à hidrólise pela plasmina sanguínea e também pela proteólise bacteriana, na presença de microrganismos.

De acordo com Melo Junior (2005), a estabilidade térmica da plasmina decresce de 10% a 17% durante a pasteurização. Entretanto, grande parte resiste ao tratamento térmico, relação semelhante ocorre com as enzimas bacterianas. Enquanto a protease causa a hidrólise proteica, quebrando α e β -caseínas, as proteases de origem microbiana causam um maior prejuízo, pois acabam por degradar a K-caseína, resultando, assim, na desestabilização da micela de forma semelhante à quimosina, liberando o CMP. Dessa forma, o autor cita que é necessária atenção para o leite com altas contagens de microrganismos, pois, através destes parâmetros pode-se ter a hidrólise, tanto através da plasmina sanguínea quanto à causada pelos microrganismos (MELO JUNIOR, 2005).

2.2 Proteína

O leite bovino possui cerca de 3,5% de proteína, cuja função fundamental é o fornecimento de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento do recém-nascido. As proteínas são distribuídas em duas classes: 80% se caracterizam como caseína e 20% de proteína do soro (FENNEMA; PARKIN; DAMOSARAN, 2010). As principais proteínas do leite estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 Principais proteínas do leite

Proteínas (PTN)	Quantidade no leite (g/L)
Caseínas	24 - 28
α_{s1}	12 - 15
α_{s2}	03 - 04
β	09 - 11
κ	03 - 04
PROTEÍNAS DO SORO	05 - 07
β -lactoglobulina	2
α -lactalbumina	1,2
Albumina sérica	0,1 - 0,4
Imunoglobulina	0,7
Lactoferrina	0,1

Fonte: adaptado de Sgarbieri (2004) e Fennema, Parkin e Damosaran (2010).

A variação da quantidade de proteínas do leite está ligada à raça, ao estágio de lactação e alimentação dos animais. As proteínas do soro exercem um papel importante, ligado à imunidade passiva do recém-nascido, durante os primeiros estágios de vida, pela ingestão do colostro. Essas proteínas do soro permanecem em altas concentrações durante esse estágio, diminuindo o valor da caseína, ocorrendo o inverso após 72 h (SGARBIERI, 2004).

Em geral, as proteínas do soro possuem certo grau de estabilidade estrutural, justamente por apresentarem uma estrutura globular contendo algumas pontes dissulfeto (PINHEIRO, 2009), interações hidrofóbicas e cadeias peptídicas dobradas (FENNEMA; PARKIN; DAMOSARAN, 2010).

Dentre as proteínas do soro, pode-se afirmar que a α -lactalbumina (α LA) e a β -lactoglobulina (β LG) são os componentes principais, pois se apresentam em maior quantidade e massa. A β LG é o maior peptídeo do soro, apresentando um peso molecular médio de 18,4 a 36,8 kDa. O alto peso molecular está associado com a resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, ocorrendo a absorção, portanto, no intestino delgado. A importância deste peptídeo se dá por ser carreadora de retinol (pró vitamina A) materno para o filhote (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). Suas propriedades biológicas são anti-hipertensivas, antioxidantes, antimicrobiana, imunoestimulante e hipocolesterolêmico (PINHEIRO, 2009).

As imunoglobulinas também apresentam alto peso molecular (150 – 1000 KDa) no leite e possuem um papel importante na imunidade (PINHEIRO, 2009). Para Sgarbieri (2004), a ingestão de derivados do soro pode trazer benefícios, assim como os produtos lácteos, pois há evidências de aumento de imunoglobulinas em pessoas com deficiência na imunidade. Esses valores foram significativos, mesmo se apresentando em menores índices, comparados com a caseína. O autor cita como benefícios do consumo as atividades antimicrobiana, antiviral, anticâncer e cardiovascular, dentre outros.

Quanto à caseína, cerca de 80% da PTN do leite, consiste em α_{s1} , α_{s2} , β , e κ , possui a responsabilidade de transportar cálcio, fosfato e proteína para o neonato, além de possuir a capacidade estabilizadora do leite. Esta estabilidade se dá por se apresentar na forma de micela ou partículas coloidais. Na Figura 1, observa-se que os resíduos hidrofóbicos resultam na forte associação entre as caseínas, tornando-as insolúveis em água (FENNEMA; PARKIN; DAMOSARAN, 2010; LASMAR, 2007).

A K-caseína se torna a mais importante estabilizadora, pois as frações de α e β acabam se tornando mais sensíveis por possuírem vários sítios de fixação para íons cálcio e também pela sensibilidade à temperatura ambiente. Já a K-caseína possui maior insensibilidade aos íons cálcio, resistindo independentemente da temperatura. Pode-se dizer que a K-caseína é a fração protetora da estrutura, tornando o leite estável, em condições de processamento (ROCHA, 2004)

Por se apresentar em maior quantidade e ser importante componente para a fabricação de queijos, derivados lácteos e estabilização do leite, na qual há a importância de durabilidade de prateleira, existe o interesse de que essa molécula esteja,

no mínimo, nas quantidades estabelecidas pela instrução normativa Nº 62, e que não haja fatores de degradação.

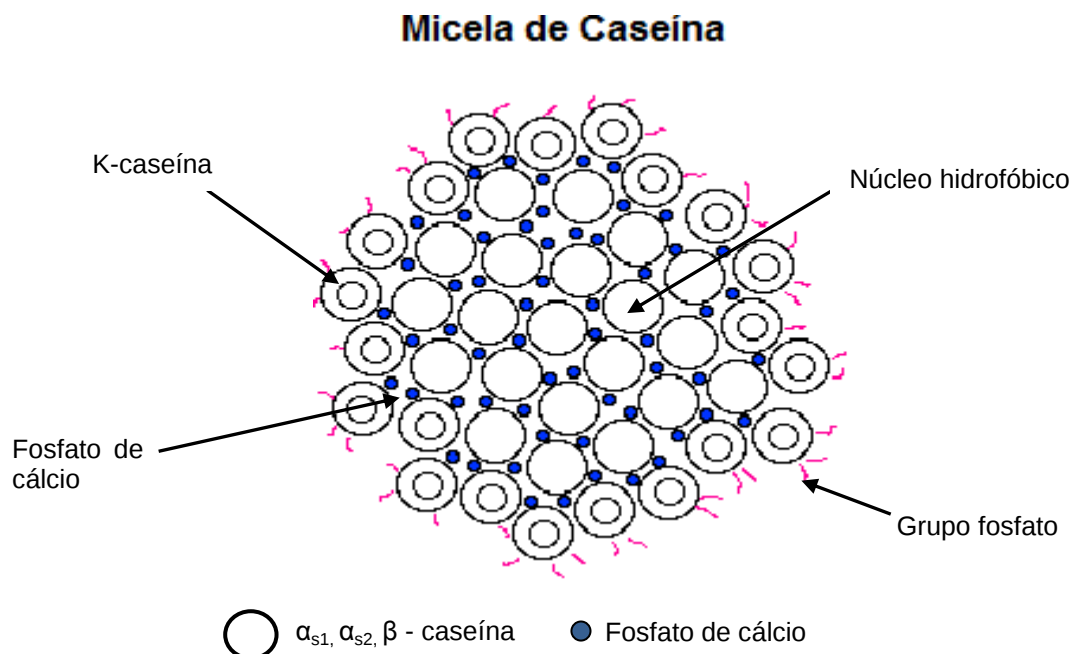


Figura 1 Estrutura da micela de caseína.

Fonte: Adaptado de Lasmar (2007) e Fennema, Parkin e Damosaran (2010).

2.3 Processo bioquímico da proteólise microbiana

O processo de proteólise microbiana consiste na ação das enzimas produzidas pelos microrganismos psicrótrópicos, após a pasteurização, ocorrendo então a desestabilização das micelas. Os microrganismos não resistem ao processo de pasteurização, porém, as enzimas que se localizam intracelularmente são termorresistentes e continuam ativas, mesmo após o processamento (AMORIN, 2007).

Amorim (2007) utilizou como exemplo a quimosina, como agente para realizar a coagulação do queijo. Ao ocorrer a hidrólise das proteínas, é liberado o CMP, desencadeando, dessa forma, o processo semelhante ao processo de proteólise.

Na Figura 2 está esquematizada a hidrólise da micela, ocasionando desestabilização, com formação do grupamento CMP. A hidrólise ocorre na K-caseína, estabilizadora de micela (MARTINS, 2009).

Na Figura 2 está demonstrada a análise realizada por ação enzimática, tanto pela quimosina utilizada para a fabricação do queijo quanto as proteases de origem microbiana e ação da plasmina sanguínea, com liberação do CMP entre os aminoácidos 105 – 106, além dessa ruptura demonstrada, podem realizar também a ruptura em metionina 106 e alanina 107 formando o pseudo-CMP, que será diferenciado por ter um aminoácido a menos (MAGALHÃES, 2008).

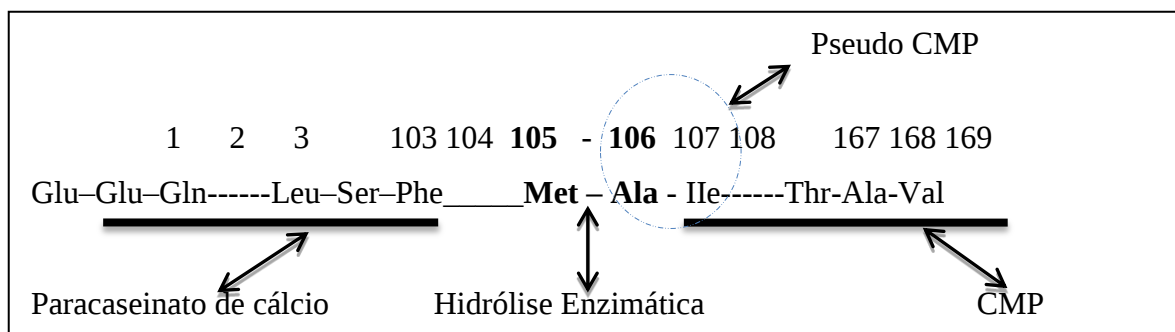


Figura 2 Local da hidrólise.

Fonte: adaptado de Magalhães (2008).

As análises de CMP podem levar a falsos resultados quanto à fraude por adição de soro, justamente pela hidrólise realizada no mesmo local. No entanto, Magalhães *et al.* (2008) sugeriram que a contagem de UFC/mL deve ser observada e, se essa contagem exceder a 10^6 , deve-se atentar às enzimas proteolíticas que causam a hidrólise, além da desestabilização do leite. Essas contagens representam que o leite tem má qualidade para o consumo. Para Zocche *et al.* (2002), contagens a partir de 10^4 UFC/mL já evidenciam possíveis problemas.

Na legislação brasileira não existem valores estipulados para a contagem de psicotróficos, há somente o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (1980), que estabelece que o leite pode apresentar, no máximo, 10% de microrganismos psicotróficos, em relação à contagem total de mesófilos (BRASIL, 1980). Porém, o grupo de psicotróficos já se apresenta no leite em situações de manipulação correta, em níveis aproximados a 10% de sua microbiota, mas esses valores podem ser alterados, havendo condições de higiene precárias (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

Medidas devem ser adotadas para o controle e a não disseminação dos microrganismos responsáveis pela hidrólise, como os citados anteriormente, do gênero *Pseudomonas* spp, pois, ativam a plasmina no leite, possuem alta capacidade de adaptação e formam biofilmes nas superfícies (GIGANTE, 2004; KONEMAN *et al.*, 2001).

2.4 Coleta, transporte e armazenamento

O leite tem um papel importante para a nutrição humana e é um ótimo meio de cultura para o crescimento de vários microrganismos, tanto para o crescimento de bactérias com estocagem na temperatura ambiente: as mesófilas, quanto para as que tem o seu crescimento ótimo sob refrigeração: as psicrotróficas (ZENI *et al.*, 2013).

Antes das instruções normativas entrarem em vigor, a principal preocupação era com relação aos microrganismos mesófilos, pois não havia a consciência da refrigeração logo após a ordenha, na propriedade leiteira. Após essas mudanças o principal foco passou a ser as psicrotróficas, embora não haja total despreocupação com mesofilos (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 29 de dezembro de 2011, há, além da importância de se estabelecer um menor valor entre CCS e CBT para o produtor, a responsabilidade das indústrias quanto à qualidade do leite, até o seu processamento. A IN 62/2011 prevê a coleta do leite nas propriedades, no máximo, em 48 horas, sendo o indicado 24 horas. A coleta deve ser realizada em caminhões com equipamentos isotérmicos e, após a chegada na indústria, a refrigeração em silos deve ocorrer imediatamente. A temperatura recomendada pela IN 62/2011 para conservação do leite é de 4 °C. O estabelecimento que optar pela coleta em latões, à temperatura ambiente, deverá fazê-lo, no máximo, em até 2 horas. Na Tabela 2 estão representados os tipos de refrigeração recomendados pela Instrução Normativa 62/2011.

Tabela 2 Tipos de refrigeração recomendada pela IN 62/2011

EQUIPAMENTOS DE REFRIGERAÇÃO	
Tanque de Expansão	Deve fazer o resfriamento do leite à temperatura de 4°C, no tempo máximo de 3 horas após término de ordenha.
Tanques de Refrigeração Comunitários	Deve estar localizado estrategicamente para facilitar a entrega a cada ordenha, tendo em vista que não poderá ser acumulada mais que uma ordenha para envio.
Tanques de Imersão	Devem ser dimensionados de modo que permitam refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7 °C, no tempo máximo de 3 horas após término da ordenha.

Fonte: adaptado de Brasil (2011).

Em relação à eficiência da refrigeração, em comparação com tanques de imersão e tanques de expansão, Bersot *et al.* (2009) obtiveram resultados considerados não satisfatórios, pois 80% não estão dentro dos padrões estabelecidos, sendo que, para tanque de expansão, 40% dos produtores com armazenamento em tanque de imersão, apresentam-se fora dos padrões. Esses resultados apontam que o armazenamento não é o único fator determinante para a qualidade do leite e que a higiene empregada e a temperatura correta de armazenamento podem ser consideradas como os fatores principais (MOURA *et al.*, 2009).

2.5 Qualidade da água em propriedades leiteiras

A qualidade da água é de grande importância para a obtenção de uma boa qualidade de leite. A água utilizada para a lavagem de utensílios deve ter a mesma qualidade de água para consumo (GUERRA; JÚNIOR; RANGEL, 2011).

A exigência pela qualidade da água é definida com base nos parâmetros estabelecidos para a saúde humana, pois uma água contaminada pode alterar a composição do leite e aumentar a infecção da glândula mamária, oferecendo risco para a saúde humana e diminuindo a ação dos desinfetantes.

Os desinfetantes podem perder sua eficiência por minerais presentes na água, resultando em um acúmulo de gordura e proteína formando incrustações vulgarmente

conhecidas como “pedra do leite”, ocasionando formação de biofilmes e posteriores problemas na qualidade do leite (CERQUEIRA *et al.*, 2006).

Outro fator a ser considerado é que a mesma água utilizada para a lavagem poderá ser veículo para a contaminação e ocasionar a ineficiência da desinfecção, principalmente com a diluição dos desinfetantes, que são influenciados pela presença de microrganismos que possuem a capacidade de neutralizar os compostos e alterar a capacidade de desinfecção (BAPTISTA, 2003).

Esses problemas ocasionam a diminuição da qualidade do leite, podendo ocorrer aumento de CBT, além de veicular patógenos de importância de saúde pública, como a *Pseudomonas* spp (CERQUEIRA *et al.*, 2006).

Além da manipulação incorreta, durante a ordenha, que diminui consideravelmente a qualidade do leite, pode-se ressaltar os problemas relacionados à contaminação ambiental pela água, durante a lavagem de equipamentos (ALFONZO *et al.*, 2012). Cerca de 40% das bactérias psicrófilas presentes no leite coincidem com a microbiota da água, sendo este ambiente propício para a sua propagação. Portanto, pode-se destacar a importância de se ter água de qualidade para a lavagem dos equipamentos, pois, se a qualidade da água está comprometida, ela pode se tornar um meio de cultivo para estes microrganismos, segundo Guerra, Júnior e Rangel (2011). Além da qualidade da água, há que se considerar a importância da escolha de um desinfetante correto para a remoção dos resíduos do leite, compostos basicamente por gorduras. Para a eliminação desses resíduos é necessária, também, a fricção manual (BAPTISTA, 2003).

2.6 Família Pseudomonadaceae

Os membros da família pseudomonadaceae se caracterizam como bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com aerobiose estrita e, em grande maioria, apresentam mobilidade por meio de um ou mais flagelos polares. Utilizam glicose e outros carboidratos para seu crescimento. O grupo classificado como

fluorescente apresenta característica de produção de pigmentação azul-esverdeada (KONEMAN *et al.*, 2001).

A *Pseudomonas aeruginosa* pertence a esse grupo e é uma cepa potencialmente produtora de biofilme, que protege a bactéria contra antibióticos e o sistema imune do hospedeiro, além de ser um microrganismo altamente virulento, é resistente a vários antibióticos e desinfetantes, como a canamicina e quaternário de amônio (BIOKAR, 2009). Na Tabela 3 estão descritos alguns dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs): “Doença de natureza infecciosa ou tóxica causada por ou através de consumo de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos”. Microrganismos podem causar alterações químicas prejudiciais nos alimentos, resultando na “deterioração microbiana”, utilizando o alimento como fonte de energia e podem ser patogênicos, afetando tanto o homem quanto os animais, representando riscos à saúde (TEIXEIRA, 2014).

Tabela 3 Fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Fator de Virulência	Atividade Biológica
Alginate	Permite adesão da bactéria às superfícies e a formação de biofilme.
<i>Pili</i>	Permite aderência a receptores de gangliosídeos presente nas células epiteliais do hospedeiro.
Neuraminidase	Facilita a ligação dos <i>pili</i> .
Lipopolissacarídeo	Produce endotoxina e é a causa da infecção.
Exotoxina A	Destruição tecidual; interrompe a atividade celular e a resposta macrofágica.
Exoenzima S	Inibe a síntese proteica.
Fosfolipase C	Destrói a membrana citoplasmática.
Elastase	Degrada a imunoglobulina e elimina a atividade dos neutrófilos.
Leucocidina	Inibe a função dos neutrófilos e linfócitos
Piocianinas	Impede o crescimento de outras bactérias

Fonte: Adaptado de Koneman *et al.* (2001).

Segundo Arias e Carrilho (2012), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) e toxinfecções compreendem mais de 250 casos, resultantes de contaminação por microrganismos patogênicos que, incorrendo em riscos para os consumidores e perdas econômicas das indústrias.

Por apresentar um grande potencial de problemas de saúde pública para pessoas e animais imunodeprimidos, torna-se essencial que sejam identificadas as cepas

pertencentes ao grupo: a *Pseudomonas aeruginosa*, pois, trata-se de uma importante bactéria proteolítica, comumente encontrada no leite, derivados e infecções na glândula mamária, é formadora de biofilmes nas paredes de tanques, nos equipamentos de ordenha e presença na água (FERNANDES *et al.*, 2009).

2.7 Referências

ALFONZO, E. P. M. *et al.* Caracterização microbiológica da qualidade do leite coletado em tanques de expansão. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Juiz de Fora – MG, v. 67, n. 388, p. 48-52, set./out. 2012.

AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (caseinomacropeptídeo)**. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2007.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina - PR, v. 33, n. 2, p. 775-790, abr. 2012.

BAPTISTA, P. **Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar**. 1. ed. Guimarães: Forvisão, 2003. 68 p.

BERSOT, L. S. *et al.* Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*, **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Juiz de Fora – MG, v. 64, n. 371, p. 34-38, 2009.

BIOKAR DIAGNOSTICS. **Ágar Cetrimida**. 2009. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/TDS_BK049_v6%20Port.pdf. Acesso em: 31 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, n.172, p. 6, dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Plano mais pecuária**, Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, 2014. 32 p.

BRASIL - Ministério da Agricultura. R.I.I.S.P.O.A. 1980. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Aprovado pelo decreto nº 30690, de 20.03.52, alterado pelo decreto nº 1255, de 25.06.62. Brasília – DF: Ministério da Agricultura, 1980.

CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al.* Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. **Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite**. Goiânia – GO, v. 1, p. 273-290. 2006.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMOSARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERNANDES, M. C. *et al.* Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745-748. 2009.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. **Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite**. Goiânia – GO. v. 1, p. 235-254. 2004.

GUERRA, M. G.; JÚNIOR, J. G. B. G.; RANGEL, A. H. N. Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, Natal RN, v. 5, n. 3, p. 230-235, 2011.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutri.** Campinas SP, v. 19, p. 2006.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

LASMAR, M. M. **Deteção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de leite cru conservadas em bronopol**. 2007. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MAIESKI, L. M; **Os principais microrganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite**. Especialização em Produção, Tecnologia e Higiene de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal do Rio Grande do sul – UFRG. 2011

MAGALHÃES, M. A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do Agronegócio – Brasil 2012/13 a 2022/23 – Projeções de Longo Prazo**. 2013 Acesso em: 06 de julho de 2015.

MARTINS, A. D. **Proteínas do leite na fabricação de queijos**. 2009. Disponível em: http://tecnologiadefabricacaodequeijo.blogspot.com.br/_2009/03/proteinas-do-leite-na-fabricacao-de.html. Acesso em: 24 fev. 2015.

MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2005.

MOURA, L. B. *et al.* Análise de micro-organismos mesófilos em leite cru comercializado na cidade de Quixeramobim. Semana Tecnológica FATEC, 1. Quixeramobim – CE, 2009. **Anais...** Quixeramobim – CE: FATEC, 2009.

MUNHOZ, P. **Simpósio da Cadeia Produtiva do Leite**, Umuarama PR, 2011.

NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Santa Maria - RS, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009. ISSN 1679-9216.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento – SEAB. **Cultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Ano 2012/2013. Curitiba: SEAB, 2013.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed 2005. 279 p.

PINHEIRO, F. F. Sistema de pagamento como incentivo à qualidade do leite. *In*: **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1. 2009. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8. Anais... 2009.

RABELO, R. N. **Características físicas, químicas, celulares e microbiológicas do leite cru obtido em tanques de expansão individuais de fornecedores de um laticínio do nordeste do estado de São Paulo**. 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

RIBAS, P. N. *et al.* Escore de células somáticas e sua relação com os componentes do leite em amostras de taque do estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 14-23. 2014.

ROCHA, L. G. **Influência do tratamento térmico no valor nutricional do leite fluido**. 2004. 44 f. TCC (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO, 2004 .

SILVA, A. L.; MARCONDES, M. I.; JÁCOME, D. C. **A qualidade do leite de acordo com o sistema de produção.** Universidade do Leite - Departamento zootecnia Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2013.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas das proteínas do soro do leite. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, dez. 2004. ISSN 1415-5273.

VIOTTO, W. H.; CUNHA, C. R. **Teor de sólidos do leite e rendimento industrial.** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006.

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

ZOCHE, F. *et al.* Qualidade microbiologia e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002 2002.

3 **PRESENÇA DE PSICROTRÓFICOS TOTAIS *PSEUDOMONAS* SPP E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E AVALIAÇÃO DE PROTEÓLISE EM LEITE CRU**

RESUMO

Este estudo avaliou a ocorrência da proteólise em leite cru durante o tempo de estocagem em tanques de refrigeração, além da quantificação de psicotróficos totais, *Pseudomonas* spp e *Pseudomonas aeruginosa* no leite cru. Foram coletadas amostras de leite cru em 11 propriedades de uma cooperativa da região oeste do Paraná em dois períodos, a partir da simulação do leite que a indústria levaria para o beneficiamento. As amostras coletadas foram submetidas à análise microbiológica no leite cru, e foi avaliada a proteólise do leite pelo método de determinação de CMP por HPLC. Para interpretação estatística dos dados, foi utilizada análise não paramétrica a partir do teste *kruskal-Wallis* e da Análise de Componentes Principais para contagens de bactérias e determinação de CMP. O nível médio de proteólise e a contagem dos microrganismos obtidos nas amostras avaliadas por meio da mediana foram satisfatórios. Pela análise de componentes principais, observou-se uma relação diretamente proporcional entre *P. aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. O nível de CMP e a contagem de bactérias psicotróficas, foram considerados inversamente proporcionais. A avaliação sugere que os valores obtidos de contagem de microrganismos não são fatores determinantes para a liberação de CMP, pois quanto maior a quantidade de bactérias psicotróficas menor a concentração de nível de proteólise.

Palavras-chave: Caseinomacropéptídeo, Proteólise, Adulteração, Leite.

**PRESENCE OF TOTAL PSYCHROTROPHIC AS *PSEUDOMONAS* SPP AND
PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND PROTEOLYSIS EVALUATION IN RAW
MILK**

ABSTRACT

This trial evaluated the proteolysis presence in raw milk during the storage period in cooling tanks, as well as quantified the total psychrotrophic, *Pseudomonas spp* and *Pseudomonas aeruginosa*, in raw milk and evaluated. Raw milk samples were collected in 11 farms of a western Paraná cooperative twice, in order to simulate the route taken by the industry to milk processing. The collected samples were submitted to microbiological analysis on raw milk as well as there was an evaluation of milk proteolysis by determining method of CMP by HPLC. In order to obtain the statistical interpretation of the studied data, a nonparametric analysis using Kruskal-Wallis test and Principal Component Analysis was used to count bacteria and determine CMP. The average level of proteolysis and counting of the obtained microorganisms in the evaluated of median samples showed acceptable rates and according to the main component analysis, there was one of them that in directly relationship between *P. aeruginosa* and *Pseudomonas spp*. The CMP level is correlated with psicrotrophic bacteria counting and it is considered inversely proportional. Such evaluation suggests that the values obtained from microorganisms counting are not determining factors for CMP release because the greater is psicrotrophic bacteria amount, the lowest concentration is proteolysis level.

Keywords: Caseinmacropeptide, Proteolysis, Tampering, Milk.

3.1 Introdução

O leite bovino possui cerca de 3,5% de proteína, cuja função fundamental é o fornecimento de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento do recém-nascido. Essas proteínas estão distribuídas em duas classes: (1) 80% são caracterizadas como caseína, encontrando-se principalmente na forma molecular, responsável pelo rendimento de derivados lácteos. Destacam-se quatro frações principais: α_1 , α_2 , β e k-caseína; (2) 20% são da classe denominada PMA do soro e são representadas pelas proteínas sorológicas: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albuminas e imunoglobulinas (FENNEMA; PARKIN; DAMOSARAN, 2010; SGARBIERI, 2012).

No passado o soro era descartado, hoje sabe-se que apresenta características nutricionais excelentes para fabricação de bebidas lácteas. 85-90% do volume do leite resultam do soro, ou seja, mesmo com as utilidades do soro, as indústrias leiteiras apresentam grande volume do subproduto, ocasionando casos de adulteração no leite com o intuito de aumento de volume pelo incremento com o soro (FRIEDRICH *et al.*, 2010; SGARBIERI, 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ainda não dispõe de instrumento de prevenção de fraude, que torne obrigatória a análise da adição de soro na plataforma de recebimento, apenas a análise de densidade, o que demonstra apenas se há ou não a presença de água (BRASIL, 2011; VALENTE *et al.*, 2014). Essa adição ilegal de soro, imperceptível sensorialmente, não ocasiona problemas ao consumidor, o que ocorre é que o consumidor é lesado financeiramente, pois pagará por um produto cujas propriedades foram alteradas (OLIVEIRA, 2010, FRIEDRICH *et al.*, 2010).

A detecção de adição de soro é determinada pela análise do caseinomacropéptido (CMP) em leite, cuja técnica consiste em quantificar o CMP livre presente no leite (BRASIL, 2006).

Durante a fabricação de queijo, a adição de quimosina, por exemplo, utilizada como coágulo, rompe as micelas de caseína, mais especificamente entre o aminoácido 105 - 106 da k-caseína, resultando na liberação do CMP, que fará parte das proteínas sorológicas (AMORIM, 2007; SGARBIERI, 2012). De modo semelhante, os microrganismos psicotróficos presentes no leite cru realizam a hidrólise na mesma

região, podendo ocasionar possíveis falsos positivos quanto à adição de soro (MAGALHÃES, 2008).

Antes da Instrução Normativa 62/2011 entrar em vigor, regulamentando o resfriamento do leite na propriedade leiteira, a principal preocupação eram os microrganismos mesofílicos, que possuem capacidade de crescimento à temperatura ambiente. Como este problema foi resolvido, o que passou a ser preocupante é a multiplicação dos microrganismos psicotróficos (PEREDA, 2005; BRASIL, 2011).

Os microrganismos psicotróficos são aqueles capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7 °C, ou seja, à temperatura de refrigeração. São muito adaptáveis, pois apresentam também características mesofílicas (multiplicação entre 25 e 35 °C), estão amplamente distribuídos na natureza, água, solo, plantas e animais. Os principais grupos de psicotróficos envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas* spp, com maior predominância e *Bacillus* spp (MELO JUNIOR, 2005; PEREDA, 2005; RABELO, 2012).

A preocupação pela diminuição desses microrganismos advém do fato de que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas, que resistem ao tratamento térmico e que realizam a proteólise e a lipólise, ocasionando problemas de prateleira, como sabor rançoso, amargo e coagulação do leite (PEREDA, 2005).

Há também a preocupação com a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismo que apresentar todas as características já descritas, é altamente virulenta e possui grande capacidade de resistência a desinfetantes à base de amônia quaternária e clorexidine. Apesar de não ter muitas ocorrências em propriedades leiteiras, sabe-se que esse microrganismo possui características potenciais para formação de biofilme, ou seja, deve ser levada em consideração a sua presença, pois uma vez instalada, sua remoção do local é difícil e, também, por ser uma espécie importante relacionada à saúde animal e humana (FERNANDES *et al.*, 2009; KONEMAN *et al.*, 2001; CHAPAVALL *et al.*, 2009; MACEDO, 2000).

O objetivo deste estudo foi abordar a quantificação microbiológica de psicotróficos, incluindo o gênero *Pseudomonas* spp e a espécie *P. aeruginosa* em leite cru resfriado, indicando o microrganismo com a maior unidade formadora de colônia. As amostras coletadas, em função do cronograma de coleta da indústria, apresentaram a condição na qual a matéria prima chegava para a indústria leiteira.

Após as análises microbiológicas, o nível de proteólise também foi avaliado e estimou-se a correlação entre os microrganismos propostos, a coleta da indústria e o manejo observado em cada propriedade, durante cada coleta.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Avaliação do manejo nas propriedades

O estudo foi realizado com 11 onze produtores participantes de uma cooperativa da região oeste do Paraná, selecionados em função da proximidades da cidade de Cascavel - PR.

As propriedades rurais foram visitadas e observadas, em relação ao manejo adotado pelo produtor e, principalmente, no que diz respeito aos procedimentos adotados e sua relação com a qualidade do leite. As observações foram anotadas em formulário específico e os resultados foram correlacionados com os resultados das análises laboratoriais.

3.2.2 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no dia em que o caminhão tanque passaria para recolher o leite e levá-lo para a indústria leiteira, em dois períodos em cada propriedade, simulando, dessa forma, o leite que a indústria levaria para o beneficiamento.

Os potes de coleta foram previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos e a coleta do leite foi realizada diretamente do resfriador, utilizando-se material de inox flambado com álcool 70° e chama.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas até o laboratório de Bacteriologia e Micologia Clínica, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, para a análise microbiológica.

No caso das análises microbiológicas, as amostras foram submetidas à análise imediatamente após a sua chegada; as amostras para análise de proteolíticos foram imediatamente congeladas.

Para quantificação de CMP, as amostras de leite para avaliação de CMP foram analisadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – Laboratório de Cromatografia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2.3 Análises microbiológicas

A metodologia empregada para análise microbiológica foi a semeadura em duplicatas, por superfície nas diluições de 10^{-1} a 10^{-3} com água peptonada 0,1%, em tubos contendo 9 mL (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

Para a contagem de *Pseudomonas* spp foi utilizado o Ágar Pseudomonas Base a 37 °C por 24 horas. Para a quantificação de psicrotróficos foi utilizado o Ágar PCA a 7 °C por 10 dias (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Para a contagem de *Pseudomonas aeruginosa* o meio de cultura utilizado foi o Ágar Cetrimide a 37 °C por 48 horas.

3.2.4 Quantificação de CMP

O nível de proteólise no leite cru foi analisado pela quantificação do caseinomacropeptídeo (CMP), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando a metodologia descrita por BRASIL (2006).

As amostras foram previamente descongeladas em banho de água a 30 °C. Em uma alíquota de 20,0 mL das amostras descongeladas, foram adicionados 10,0 mL de ácido tricloroacético a 24%, gota a gota e sob agitação constante e, após repouso por 60 minutos à temperatura ambiente, filtrou-se em papel qualitativo.

O cálculo da curva de regressão linear foi em ($Y = AX + B$), em que: A representa a declividade, coeficiente angular ou a inclinação da reta e B representa a interseção com o eixo Y ou o coeficiente linear, utilizando-se a concentração de CMP

em miligramas por litro *versus* altura ou área do pico. Aceitando-se a curva para valores de $R > 0,95$, identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do CMP.

A concentração de CMP foi transformada em miligramas por litro pelo cromatógrafo, nas amostras pela equação da curva de calibração ($Y = AX + B$). Os resultados das amostras foram expressos em miligramas de CMP por litro (mg/L) (BRASIL, 2006).

3.2.5 Análise estatística

Em relação à avaliação estatística do trabalho, os dados foram avaliados quanto ao padrão de distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene. Uma vez que os dados não estavam em acordo com os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, a comparação da contagem logarítmica das bactérias (*P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp e Psicotróficas) foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os dados das contagens microbianas, bem como as quantidades de CMP foram avaliados por meio da Análise de Componentes Principais. Os dados das variáveis analisadas foram normalizados e a qualidade dos dados foi verificada pelo método Kaiser-Meyer-Olkin (KMO test). A avaliação da correlação entre as matrizes de variáveis foi avaliada pelo teste de esfericidade de Bartlett e a definição do número de componentes principais foi realizada pelo critério de Broken-Stick. Todas as análises foram realizadas no software XLSTAT versão 2015.

3.3 Resultados e discussão

A partir das observações realizadas (Tabela 1) quanto ao manejo de ordenha nas propriedades, nenhuma propriedade apresentou canalização para o leite e apenas uma faz ordenha manual. Esses dados caracterizam as propriedades como apresentando baixo nível tecnológico (FERRAZA *et al.*, 2015). No entanto, segundo Santana *et al.* (2001), a qualidade leiteira está correlacionada à higiene e não ao nível tecnológico.

Tabela 1 Características observadas nas propriedades leiteiras, durante a ordenha

Propriedades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tipo de ordenha	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MN	MC	MC	MC
Leite canalizado	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não
Pré-dipping	não	água	HP	água	não	água	HP	água	água	HP	água
Secagem dos tetos	pano	pano	pano	não	não	não	papel	pano	não	papel	não
Armazenamento	T.I	T.I	T.E	T.I	T.I	T.E	T.E	T.E	T.I	T.I	T.I
Coleta da indústria	96h	96h	96h	48h	96h	48h	48h	48h	96h	72h	48h

Notas: * MC: ordenha mecânica, MN: ordenha manual, T.I: tanque de imersão, T.E: tanque de expansão, HP: hipoclorito de sódio.

Quanto à utilização de pré-dipping, 18% dos produtores não utilizam a prática, sete utilizam água como medida e somente dois foram observados utilizando o hipoclorito de sódio. A técnica, indicada para o manejo pré-ordenha, consiste na lavagem com água somente em casos em que o teto do animal apresentar sujidades e, após o procedimento, deve se utilizar papel não reciclado ou toalha individual para a secagem. A utilização da água sem critérios estabelecidos pode ocasionar água residual nas pontas dos tetos ocasionando posterior contaminação (SANTOS *et al.*, 2013).

A utilização de desinfetantes no pré-dipping diminui consideravelmente os microrganismos presentes, consequentemente, aumenta a qualidade do leite e diminui as ocorrências com mastite. Em experimento de pesquisa, Ramalho *et al.* (2012) observaram a eficiência *in vitro* da utilização de cloro frente a cepas de alguns microrganismos e constataram que o cloro apresenta características que contribuem para redução das contagens.

A utilização de panos individuais para a secagem dos tetos foi observada em quatro propriedades, 18% utilizam o papel, conforme recomendado por Brasil (2011), e cinco não utilizam a prática de secagem.

Santana *et al.* (2001) ressaltam que os procedimentos empregados de forma incorreta diminuem consideravelmente a qualidade do leite; neste caso, somente 18% dos produtores utilizam o pré-dipping de forma correta (cloro) e fazem o uso de papel, sendo que mais da metade dos produtores não trabalham de forma correta. Uma vez contaminado o leite, não é possível recuperá-lo durante o tratamento térmico (PINHEIRO, 2009).

Quanto à forma de armazenamento, 63% dos produtores utilizam o tanque de imersão como alternativa, o restante utiliza o tanque de expansão. Segundo Pinheiro (2009), o tipo de armazenamento não é o fator determinante para a qualidade do leite, mas sim a higiene empregada. Além disso, é importante ressaltar que a temperatura na qual o leite será armazenado e, também, o fator tempo são importantes (BRANDÃO *et al.*, 2013; SANTANA *et al.*, 2001). Neste caso, foi constatado visualmente que os tanques de imersão apresentavam higiene inadequada (Figura 1), o que pode resultar em qualidade leiteira insatisfatória.

Juntamente com esses fatores, o tempo de coleta da indústria foi relativamente alto, pois o menor tempo se apresentou em 48 horas e o maior foi de até 96 horas. Pela Instrução Normativa nº 62, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu que o tempo de coleta pode ser de 24 horas, sendo o tempo máximo estendido de 48 horas (BRASIL, 2011). Santos *et al.* (2013) encontraram diferenças significativas em tempo de estocagem, não havendo diferenças significativas em relação à temperatura, ocorrendo alterações microbiológicas no tempo de 24 a 96 horas, respectivamente, ou seja, independentemente da temperatura do tanque, valores microbiológicos de psicrotróficos foram alterados, principalmente em relação ao tempo, significando que este é um fator chave para a qualidade, que diminui em função do tempo de estocagem.

A contagem para psicrotróficos apresentou uma mediana de 5,00 log UFC/mL (Tabela 2). A literatura especializada traz que a principal cepa causadora de proteólise é o microrganismo *Pseudomonas* spp (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009), porém não foi obtida uma relação entre a contagem de psicrotróficos totais e *Pseudomonas* spp. Esse resultado pode sugerir a atividade de outros microrganismos proteolíticos importantes, porém, não foi realizada a análise de outros grupos bacterianos.

Tabela 2 Resultados das contagens microbiológicas - 1ª Coleta

Amostra	N	Mínimo	Máximo	Média	Mediana*	Sx
<i>P. aeruginosa</i> (Log UFC/mL)	22	<1,00	4,45	1,96	2,27a	0,443
<i>Pseudomonas</i> spp (Log UFC/mL)	22	<1,00	6,95	2,65	2,96a	0,591
Psicrotróficos Totais (Log UFC/mL)	22	1,00	5,00	3,09	5,00b	0,286

Nota: * Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as bactérias, a 5% de significância.

Quanto à *Pseudomonas aeruginosa*, a sua contagem não teve correlação com o nível de proteólise, resultado parecido com o de Oliveira *et al.* (2009). Os autores comprovaram através da incubação em leite com cepas nas quais a *P. fluorescens* (P88) e *P. fluorescens* (P250) apresentam maior nível de proteólise e *P. aeruginosa* apresentou tempo de crescimento lento, aumentando 2 ciclos log, enquanto as outras cepas aumentaram 4 ciclos log.

Verificou-se que, apesar de *P. aeruginosa* ser um agente proteolítico, essa relação parece ter origem em atividades infecciosas, como agente necrotizante em pele. Em relação aos bovinos, esse agente está presente em casos de mastite, principalmente em casos de animais com a imunidade relativamente baixa (GOMES, 2015). No caso citado por Fernandes *et al.* (2009), em que relataram um surto do microrganismo em infecções da glândula mamária, com manifestações clínicas agudas e microrganismo se apresentando relativamente com grande capacidade de resistência múltipla a mais de cinco antimicrobianos testados em amostras de animais com infecção da glândula mamária nas primeiras semanas pós parto.

Esses valores, obtidos para contagem de *P. aeruginosa*, sugerem possíveis formações de biofilme. Macêdo e Barra (2003) relatam a formação de biofilme a partir de células com log de 3,00 a 5,00 UFC/ml. Observa-se que as contagens máximas verificadas são de 5,55 log UFC/mL na 2ª coleta (Tabela 3) e 4,45 log UFC/mL na 1ª coleta (Tabela 2). Esses valores se baseiam apenas em avaliações do autor. Para se ter certeza de que essas células estão aderidas, são necessárias outras análises mais confiáveis, voltadas à determinação dessa aderência.

Quanto às contagens de *Pseudomonas* spp, obtiveram-se valores uma mediana de 2,60 a 4,50 log UFC/mL e máxima contagem de 6,95 log UFC/ mL na 1ª coleta (Tabela 2) a 6,00 log UFC/ mL. Há autores que sugerem que as contagens a partir de 6 log UFC/mL resultam em níveis elevados de proteólise e diminuição de rendimento para derivados lácteos (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009); PEREDA, 2005; ALVIM, 1992), ressaltando a importância da diminuição do microrganismo com medidas higiênicas no manejo de ordenha, pois esse gênero é o principal responsável pela produção de enzimas que hidrolisam a k-caseína.

Tabela 3 Resultados das contagens microbiológicas, tempo de coleta e análise de caseinomacropeptídeo - 2ª Coleta

Amostra	N	Mínimo	Máximo	Média	*Mediana	DP
<i>P. aeruginosa</i> (Log UFC/mL)	22	<1,00	5,55	2,72	0a	1,70
<i>Pseudomonas</i> spp (Log UFC/mL)	22	<1,00	6,00	3,94	4,50ab	1,73
Psicrotróficos totais (Log UFC/mL)	22	3,83	6,85	5,23	5,11b	0,78

Nota: * Letras diferentes indicam diferença estatística significativa a 5% de probabilidade entre as bactérias.

Em relação à avaliação das contagens de bactérias e o CMP, foi possível verificar que as variáveis se encontravam em acordo com os pressupostos da aplicação da ACP, uma vez que o valor de KMO foi superior a 0,5 (KMO=0,565). Foi verificada a correlação entre as matrizes de variáveis por meio do teste de Bartlett ($\chi^2=28,302$, $p<0,0001$). Pelo critério de Broken-Stick, foi possível assumir dois componentes principais considerados como significativos na análise.

Os dois primeiros fatores da ACP apresentaram uma variabilidade acumulada de 71,781% (Autovalores F1 = 1,906; F2 = 1,005). O primeiro eixo canônico (F1) aplicado às variáveis (47,7 % da variabilidade) foi regido pela variação das contagens de *Pseudomonas* e denota a relação entre *P. aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. Este componente principal demonstra que quanto maior a contagem de *Pseudomonas* spp maior é a contagem de *P. aeruginosa*.

O segundo eixo foi regido principalmente pelas bactérias psicrotróficas e CMP (25,1% da variabilidade). É possível notar que quanto maior a contagem de bactérias psicrotróficas menor o valor das proteômicas CMP (Tabela 4, Figura 1).

Tabela 4 Cargas fatoriais das variáveis analisadas no leite de 11 produtores

	F1	F2
CMP	0,440	0,740
PAL	0,790	0,178
PSSL	0,877	-0,119
PSCL	0,566	-0,641

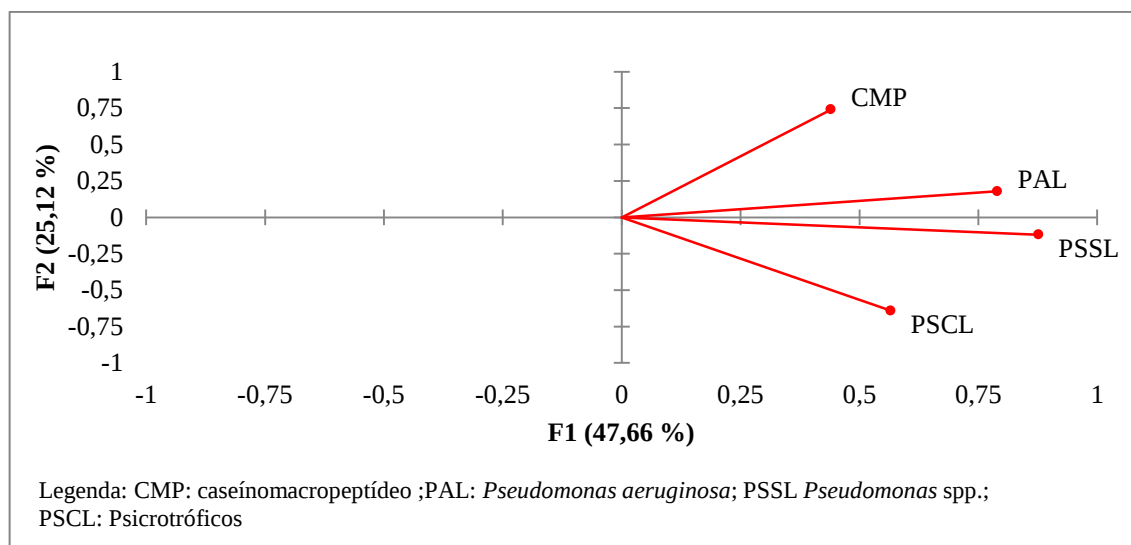


Figura 1 Diagrama de ordenação representando os dois primeiros eixos da análise de componentes principais para as variáveis relativas à contagem de bactérias e CMP.

O nível de CMP obteve correlação apenas com as bactérias psicrotróficas, sendo considerados inversamente proporcionais. Ou seja, quanto maior a quantidade de bactérias psicrotróficas, menos há concentração de proteotômicas.

Os critérios para a interpretação dos valores referentes aos índices de CMP, encontrados nas análises, sugerem que, somente quando o índice de CMP for até 30 mg/L, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o nível se apresentar entre 30 e 75 mg/L este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos, por fim, apresentando índices acima de 75 mg/L este poderá apenas ser destinado à alimentação animal, indústria química ou outro destino avaliado (BRASIL, 2006).

O leite proveniente das propriedades avaliadas neste estudo é destinado ao consumo direto, cujos valores de UFC devem variar de 4,217 e 5,634 mg/L. Porém, foram encontrados valores de 1408,8 mg/L e 33,927 mg/L, indicando índices inadequados ao consumo humano. Sendo assim, deve-se dedicar atenção às propriedades fornecedoras, bem como avaliar a qualidade do leite fornecido. Adams, Barach e Speck (1975) citam como limites valores a partir de 4 log UFC/mL e o valor mais citado na literatura é de 6 log UFC/mL.

É importante ressaltar que, mesmo uma amostra com altos valores de UFC, necessariamente, irá causar proteólise da matéria prima. Pode-se afirmar que há diferenças em cada caso, por exemplo, a primeira coleta apresentou o valor de nível de proteólise em 1408,8 mg/L e valores de psicrotróficos em 5 log UFC/mL. Já na segunda coleta observou-se o nível de proteólise de 33,927 mg/L, tendo psicrotróficos com 6,85 log UFC/mL. Assim, esta

avaliação sugere que os valores obtidos de microrganismos não são fatores determinantes para a liberação de CMP, pois, quanto maior a quantidade de bactérias psicrófilas menor foi a concentração do nível de proteólise evidenciado.

Silva (2005) comprovou, através do isolamento de *Pseudomonas* spp e avaliação da capacidade proteolítica, que 60% do total dos isolados se apresentaram com atividade proteolítica, ou seja, não são todas as cepas que são causadoras de proteólise.

3.4 Conclusão

O estudo apontou índices microbiológicos insatisfatórios em algumas propriedades, considerando os valores máximos obtidos nas amostras. No entanto, avaliando-se as proteotômicas das amostras, principal fator a ser avaliado em estudos deste tipo, os resultados em geral, foram satisfatórios.

Observando-se apenas o nível de proteólise, a unidade formadora de colônia e a capacidade proteolítica de cada amostra, não é possível confirmar hipóteses de adição fraudulenta ou hidrólise bacteriana.

Estudos como este são necessários para o desenvolvimento da qualidade na produção do leite, além disso, é necessária a inclusão de análises da capacidade de cada cepa, individualmente, de produzir hidrólise e formação de biofilme.

3.5 Referências

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**, Sanvay, v. 58, n. 6, p. 828- 834, 1975.

ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho – Filtração gélida (GF-HPLC)**. 1992. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG. 1992.

AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (caseinomacropéptido)**. 2007. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimento) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2007.

BRANDÃO, V. I. *et al.* Qualidade do leite produzido no município de Rio Pomba, MG, com base em aspectos regulatórios. **Perspectivas online**. Campos dos Goytacazes - RJ, v. 9, n. 3, p. 46-55, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa 68, de 12 de dezembro de 2006. Aprova Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, 14 de Dezembro 2006, Seção 1, Página 8, 2006.

CHAPAVAL, L. *et al.* Detecção de *Staphylococcus* sp em leite de cabra com e sem a utilização de boas práticas de ordenha. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4.; FEIRA NACIONAL DO AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA DE CORTE, 3., 2009, João Pessoa. João Pessoa: EMEPA-PB, 2009. 4 f. 1 CD-ROM.

FERNANDES, M. C. *et al.* Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745-748. 2009.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMOSARAN, S. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERRAZA, R. A. *et al.* Índices de desempenho zootécnico e econômico de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina – PR, v. 36, n. 1, p. 485-496, 2015.

FRIEDRICH, M. T. *et al.* Avaliação da estabilidade do leite *in natura* e UHT quanto ao índice de CMP. **Revista Ciatec** – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo - RS, v. 2, n. 1, p. 21-27, 2010.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Pseudomonas* spp.** Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAAnero%20Pseudomonas%20e%20Burkholderia%204-2015_1.pdf>. Acesso em: 08/07/ 2015.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

MACÊDO, J. A. B.; BARRA, M. M. Processo de desinfecção com derivados clorados orgânicos em água para abastecimento público. In: ENCONTRO MINEIRO DE ENSINO DE QUÍMICA, 3, 2003. Viçosa – MG. Viçosa – MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

MAGALHÃES, M. A. **Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e Pseudo-CMP pro cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com**

detecção por espectrometria de massa. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008.

MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT.** 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2005.

NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Santa Maria – RS, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009. ISSN 1679-9216.

OLIVEIRA, R. R. **Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo para a determinação do caseinomacropeptídeo em leite UAT.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2010.

OLIVEIRA, G. B. *et al.* Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Juiz de Fora – MG, v. 64, n. 367/368, p. 56-65, mar./ jun. 2009.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de alimentos:** alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PINHEIRO, F. F. Sistema de pagamento como incentivo à qualidade do leite. *In: Ciência Animal Brasileira*, Suplemento 1. 2009. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8. Anais... 2009.

RAMALHO, A. C. *et al.* Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, dez. 2012.

RABELO, R. N. **Características físicas, químicas, celulares e microbiológicas do leite cru obtido em tanques de expansão individuais de fornecedores de um laticínio do nordeste do estado de São Paulo.** 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicotróficos em leite. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 27-33, set. 2001.

SANTOS, A. S. *et al.* Crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013.

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

SILVA, P. D. L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado.** 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino**. São Paulo: Atheneu, 2012. 664 p.

VALENTE, G. F. S. *et al.* Aplicação de redes neurais artificiais como teste de detecção de fraude de leite por adição de soro de queijo. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Juiz de Fora – MG, v. 69, n. 6 p. 425-432, 2014.

4 RASTREAMENTO DE PSICOTRÓFICOS TOTAIS, *Pseudomonas* spp E *Pseudomonas aeruginosa* EM ETAPAS DE ORDENHA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

RESUMO

O presente estudo avaliou a presença de psicrotróficos totais, *Pseudomonas* spp e *Pseudomonas aeruginosa* em etapas de ordenha, por meio de *Swabes* de superfície de resfriador, de insuflador, de balde, de mãos e de teto além da coleta de leite e da água da sala de ordenha. Os resultados foram avaliados juntamente com um formulário de observação realizado durante as coletas. Constatou-se que a maior contaminação ocorreu com relação aos psicrotróficos totais, com valores máximos obtidos de 5,11 log UFC/mL. Esse valor apresenta um potencial hidrolítico para a k-caseína. A presença de *P. aeruginosa* corroborou com a literatura sendo observadas baixas contagens. Os resultados obtidos tanto para o gênero *Pseudomonas* spp quanto para a espécie de *P. aeruginosa* apresentaram valores não significativos ($p>0,05$) para uma mediana, entretanto, foram observadas altas contagens para psicrotróficos.

Palavras-chave: Leite, Qualidade, Psicrotróficos.

**TRACING OF TOTAL PSYCHROTROPHICS, *PSEUDOMONAS* SPP AND
PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN MILKING PHASES IN MILKY COW FARMS IN
WESTERN PARANÁ REGION**

ABSTRACT

This study evaluated the presence of total psychrotrophic, *Pseudomonas* spp and *Pseudomonas aeruginosa*, in milking phases through surface Swabs of cooler, blower, bucket, handy and udder as well as milk and water collection at milking room. These results were evaluated along with an observation formulary that was obtained during the collections. It was found out that most contamination occurred to the total psychrotrophic, whose maximum values were 5.11 log CFU/mL. This study shows a hydrolytic potential for k-casein. *P. aeruginosa* presence has corroborated the literature and low scores were also observed. The obtained results for both *Pseudomonas* spp genus and *P. aeruginosa* species showed insignificant values ($p > 0.05$) for median. However, high counts were observed for psychrotrophic.

Keywords: Milk, Quality, Psychrotrophics.

4.1 Introdução

O Paraná se encontra na 4ª posição no número de vacas ordenhadas no Brasil e em 3º lugar na produção leiteira, com 4,5 bilhões de litros (PARANÁ, 2015). A região oeste é umas das mais importantes produtoras de leite do Paraná, juntamente com a região sudoeste e noroeste, é responsável por 80% de queijos processados, possuindo ainda grande potencial produtivo (PARANÁ, 2013).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sugere o consumo de 210 litros de leite por ano por pessoa (BRASIL, 2014), mas o que o país é capaz de fornecer são apenas cerca de 170 litros de leite por habitante ao ano. O aumento do rendimento leiteiro deve ser considerado pelas autoridades como um fator a ser desenvolvido. Além disso, a indústria leiteira deve se preocupar com toda cadeia produtiva do leite para melhorar cada vez mais seus índices. Dessa forma, tendo em vista o mercado exigente, que aumenta a cada ano, e para que se supra essa necessidade de maior rendimento leiteiro, é necessário que a qualidade se torne o foco do desenvolvimento do setor.

O leite possui substâncias nutritivas em sua composição, entre elas proteínas, sais minerais e gordura, sendo um ótimo alimento para a dieta humana. Por essas razões, o leite é também um ótimo meio de cultura para o crescimento de microrganismos que necessitam de substratos para seu desenvolvimento. Os microrganismos mesófilos se adaptam bem nas condições em armazenamento leiteiro sem refrigeração, já os psicrótróficos crescem bem em temperatura de refrigeração. Dentro dessa classe, há aqueles que possuem a capacidade psicrótrófica com adaptação mesofílica, como o *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo (MELO JUNIOR, 2005; PEREDA, 2005).

O *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo que apresenta grandes problemas quanto à diminuição de rendimento leiteiro nas propriedades. Estudos apontam a capacidade a associação deste microrganismo com a proteólise, no entanto, essa característica parece estar mais relacionada com necrose em feridas.

Por apresentar características de boa adaptação, a *P. aeruginosa* é um potencial representante de casos em formação de biofilmes em indústrias beneficiadoras de alimentos, altas contagens em água de abastecimento e alta virulência. Relaciona-se com casos de infecções nas glândulas mamárias de bovinos em imunodepressão, assim como nas primeiras

semanas pós-parto em vacas lactentes (GOMES, 2015; MACÊDO; BARRA, 2003; FERNANDES *et al.*, 2009).

O gênero *Pseudomonas* spp compõe um importante grupo relacionado ao rendimento leiteiro. É o gênero mais frequentemente encontrado no leite e ocasiona muitos problemas em leite cru e pós processado, como hidrólise da k-caseína, ocasionando a desestabilização e gelificação do leite, odor, ranço e sabor amargo (ALVIM, 1992).

Esse microrganismo possui capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração, ou seja, é um microrganismo psicrotrófico. São bactérias que não possuem um grupo taxonômico específico, pertencem tanto às Gram negativas quanto às Gram positivas. Pela sua alta capacidade de adaptação e capacidade de alterações na qualidade do leite, como citado anteriormente, o gênero *Pseudomonas* spp é o foco desta avaliação (ALVIM, 1992; KONEMAN *et al.*, 2001).

O gênero *Pseudomonas* é formado por bastonetes Gram-negativos, aeróbios, maioria móvel com um ou vários flagelos polares, produzem pigmentos solúveis e estão presentes em ambientes como solo, água e também sobre a pele, mucosa e fezes de humanos e animais (GOMES, 2015; PEREDA, 2005).

Os microrganismos psicrotróficos passaram a ter importância na década de 70, pois, como cita Pereda (2005), cientistas da Universidade de Lund revelaram presença de proteases ativas no leite esterilizado, produzidas por *Pseudomonas*. A importância da diminuição desses microrganismos está, justamente, na capacidade que possuem de liberar enzimas presentes intracelularmente durante o tratamento térmico, ou seja, o microrganismo fica inativo com o processo, porém as enzimas possuem características termoestáveis e continuam degradando a proteína do leite, mesmo após o processamento (NORNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

As instalações das propriedades, as mãos dos ordenhadores e a superfície de tetos dos animais, podem ser fontes de contaminação do leite, se não forem devidamente desinfetados antes e após os procedimentos de ordenha (PEREDA, 2005).

O presente artigo tem por objetivo determinar os pontos de etapas da ordenha nos quais se encontram a maior contaminação por psicrotróficos totais, *Pseudomonas* spp e *Pseudomonas aeruginosa*, em propriedades leiteiras da região oeste do Paraná.

O estudo foi realizado em uma cooperativa da região, sendo coletas de amostras dos utensílios de ordenha, das mãos dos ordenhadores, das superfícies de tetos dos animais, da água utilizada para a lavagem, e do local de armazenamento do leite, visando à determinação

do principal ponto em que há predominância de ambos os microrganismos, além de sua quantificação e o nível de contaminação do leite das propriedades.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Aplicação de formulário

Foi aplicado um breve formulário, conforme acompanhamento das atividades desenvolvidas nas propriedades, para posterior análise conjunta com as avaliações microbiológicas. (ANEXO A).

4.2.2 Coleta e transporte

Em cada propriedade foram realizadas duas coletas, totalizando 154 amostras totais com 11 produtores avaliados. A água analisada foi a mesma utilizada para a lavagem dos utensílios da sala de ordenha.

Os *swab* utilizados para a coleta nos pontos eram da marca 3M Hydra-Sponge®. Consistiam em uma esponja de celulose imersa em água peptonada tamponada 0,1%, (Figura 1) na seguinte ordem, *swab* de mãos, *swab* de insufladores (antes do início da ordenha), *swab* de teto (após higienização), *swab* balde, *swab* resfriador e coleta do leite.

O transporte das amostras foi realizado em caixas isotérmicas, com gelo até o Laboratório de Microbiologia e Micologia Clínica, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

4.2.3 Análises microbiológicas

A metodologia empregada para análise microbiológica foi o plaqueamento em duplicatas por superfície nas diluições de 10^1 a 10^3 , com água peptonada 0,1%, em tubos contendo 9 ml (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

Para a contagem de *P. aeruginosa* o meio de cultura utilizado foi o Ágar Cetrimide a 37 °C por 48 horas. Para contagem de *Pseudomonas* spp foi utilizado o Pseudomonas Ágar Base a 37 °C por 24 horas. Para quantificação de psicrotróficos foi utilizado o Ágar PCA (*Plate Count Agar*) a 7 °C por 10 dias (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

4.2.4 Análise estatística

Foi utilizada a análise estatística não-paramétrica, por meio do teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade utilizando-se o *software* XLSTAT, versão 2015.

4.3 Resultados e Discussão

Para a contagem de psicrotróficos (Tabela 1), os principais contaminantes do leite foram a superfície teto (3,99 Log UFC/mL) e o resfriador (3,90 Log UFC/mL), entretanto o insuflador e balde não diferiram estatisticamente deste grupo (3,85 e 3,75 Log UFC/mL) ($p>0,05$). Sendo assim, as contagens que podem ter contribuído para a maior contaminação do leite foram representadas pela superfície de teto e insuflador.

Na segunda coleta, o teto também apresentou valores medianas com contagens que podem influenciar a contaminação do leite (4,32 Log UFC/mL).

Tabela 1 Resultados expressos em Log UFC/mL, do rastreamento para contagem de psicrotróficos em etapas de ordenha

	Coleta1				Coleta 2			
	Máximo	Média	Mínimo	*Mediana	Máximo	Média	Mínimo	*Mediana
Água	5,78	3,17	1,89	3,00 ^{abcde}	4,15	2,79	1,65	2,83 ^{bcdefg}
Balde	5,85	3,62	<1,00	3,75 ^{cdef}	6,16	4,21	2,35	4,20 ^{efgh}
Insuflador	6,00	3,71	<1,00	3,85 ^{cdef}	5,75	3,64	<1,00	4,07 ^{cdefgh}
Mão	6,00	3,10	<1,00	3,26 ^{abcdef}	6,00	3,77	<1,00	4,05 ^{defgh}
Resfriador	5,25	3,95	2,25	3,90 ^{cdef}	6,37	4,10	2,00	3,91 ^{efgh}
Teto	6,50	3,62	<1,00	3,99 ^{cdef}	6,75	4,21	<1,00	4,32 ^{efgh}
Leite	6,85	5,23	3,83	5,11 ^f	6,45	4,90	2,50	5,00 ^h

Nota: *Medianas seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, a 5% de significância.

De acordo com o formulário aplicado durante a coleta, na maior parte das propriedades o manejo pré-ordenha não era realizado corretamente. Apenas dois dos produtores realizavam o manejo corretamente, com desinfecção à base de cloro, os demais utilizam água como medida, sem nenhuma padronização.

Constatou-se que apenas dois produtores utilizam papel para secagem dos tetos, sendo esses os mesmos que realizam o manejo pré-ordenha corretamente e o restante utiliza pano ou não utilizam nada para a secagem.

A água deve ser utilizada apenas quando a superfície se encontra com sujidades e não utilizada como medida rotineira. A utilização da água pode trazer contaminações através da água residual. A pré-ordenha consiste na imersão dos tetos em solução desinfetante, deixando agir por alguns minutos, para posteriormente realizar a secagem com papel não reciclado, Quando for necessária a utilização da água para remoção de sujidades, após essa remoção deve ser realizada a imersão com desinfetantes (SANTOS *et al.*, 2013).

A utilização de desinfetantes no pré-*dipping* diminui consideravelmente o número de microrganismos presentes, consequentemente aumentando a qualidade do leite e também a diminuição de ocorrências com mastite. Ramalho *et al.* (2012) observaram a eficiência *in vitro* da utilização de cloro frente a cepas de alguns microrganismos e constataram que o cloro diminui consideravelmente as contagens microbiológicas.

Os menores níveis de contaminação (3,00 e 2,86 log UFC/mL) foram observados na água, não representando, para as amostras avaliadas, fonte de contaminação de psicotróficos nos pontos pesquisados.

Adams, Barach e Speck (1975) verificaram que contagens de psicotróficos a partir de 4 logUFC/mL podem indicar características para produção de proteólise em leite, ocorrendo a diminuição da K-caseína.

Os maiores valores para contagem de *Pseudomonas* spp foram obtidos na primeira coleta (Tabela 2) no balde de ordenha (4,22 log UFC/mL), tal observação deve-se ao fato de que todos os produtores não possuíam ordenha canalizada na propriedade.

Para a segunda coleta, o principal contaminante foi o resfriador, sete produtores possuíam o tanque de imersão como resfriador do leite, os demais possuíam tanque de expansão.

Tabela 2 Resultados expressos em log UFC/mL, da contagem de *Pseudomonas* spp em etapas de ordenha

	Coleta1				Coleta 2			
	Log (UFC/mL)				Log (UFC/mL)			
	Máximo	Média	Mínimo	Mediana	Máximo	Média	Mínimo	Mediana
Água	6,80	3,78	<1,00	3,89cdef	5,00	2,12	<1,00	2,55 ^{abcdef}
Balde	6,75	3,69	<1,00	4,22cdef	4,55	2,34	<1,00	2,56 ^{abcdef}
Insuflador	6,80	3,87	<1,00	4,06cdef	5,48	2,29	<1,00	2,81 ^{abcdefg}
Mão	6,96	2,29	<1,00	2,80abcd	3,98	1,76	<1,00	2,34 ^{abcd}
Resfriador	6,94	3,48	<1,00	3,19cdef	4,29	2,40	<1,00	2,90 ^{abcdefg}
Teto	6,98	3,37	<1,00	3,00bcdef	4,50	1,48	<1,00	<1,00 ^{abc}
Leite	6,00	3,94	<1,00	4,50cdef	6,95	2,65	<1,00	2,96 ^{bcdefg}

Nota: *Medianas seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si.

Matsubara *et al.* (2011) coletaram amostras de leite antes e após de treinamento de boas práticas de manejo. Os autores observaram que a tecnificação da propriedade, para uma matéria prima de qualidade, não causava grandes impactos, mas sim os cuidados com a higiene. A desinfecção correta dos equipamentos promoveu significativa diminuição na contaminação, sendo que os autores recomendaram aos produtores a cloração dos equipamentos.

Para as contagens de *P. aeruginosa* (Tabela 3) os valores das medianas foram de <1,00 a 2,40 UFC log/mL, insuficientes para a formação de biofilmes, pois, segundo Macêdo e Barra (2003), a formação de biofilme ocorre a partir de células de 3 a 5 log UFC/mL. No entanto, as contagens máximas encontradas de 6,90 log UFC/mL na primeira coleta e 5,26 log UFC/mL para a segunda coleta, extrapolam estes valores. Para a confirmação da formação do biofilme, há que se verificar se as células estão aderidas.

A bactéria *P. aeruginosa*, por possuir alta capacidade de virulência, apresentou valores elevados para insuflador (6,90 e 5,26 logUFC/mL). Esse é um microrganismo oportunista para imunodeprimidos, ou seja, animais de primeira cria, por exemplo, possuem grandes chances de adquirir a cepa, principalmente com contaminações altas como essas nos insufladores e, uma vez instalada, pode ser de difícil tratamento. As cepas de *P. aeruginosa* produzem exotoxina responsável pela destruição tecidual, além de interromper atividade celular e resposta macrofágica (KONEMAN *et al.*, 2001).

Tabela 3 Resultados expressos em log UFC/mL, da contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em etapas de ordenha

	Coleta1				Coleta 2			
	Log (UFC/mL)				Log (UFC/mL)			
	Máximo	Média	Mínimo	*Mediana	Máximo	Média	Mínimo	*Mediana
Água	4,50	0,67	<1,00	<1,00 ^{ab}	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00 ^a
Balde	5,00	1,88	<1,00	1,67 ^{abc}	4,00	1,52	<1,00	2,20 ^{abc}
Insuflador	6,90	1,49	<1,00	0 ^{ab} ^c	5,26	1,09	<1,00	<1,00 ^{ab}
Mão	6,35	0,51	<1,00	<1,00 ^a	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00 ^a
Resfriador	5,50	1,52	<1,00	<1,00 ^{abc}	4,88	2,27	<1,00	2,89 ^{abcdef}
Teto	3,50	0,64	<1,00	<1,00 ^a	4,88	1,70	<1,00	2,00 ^{abcd}
Leite	5,55	2,72	<1,00	2,40 ^{abcde}	4,45	1,96	<1,00	2,27 ^{abcde}

Nota: *Medianas seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si.

O leite apresentou os maiores índices de contaminação para os microrganismos avaliados (Gráfico 1), seguido pela superfície de tetos. Com relação às amostras de água, o principal microrganismo rastreado foi a bactéria *Pseudomonas* spp (primeira coleta), com o valor de 3,89 log UFC/mL. No balde, a contagem para esses microrganismos foi de 4,22 log UFC/mL (primeira coleta). O insuflador foi representado pelos psicrotróficos (segunda coleta), com valor de 4,05 log UFC/mL. O resfriador obteve contagem de 3,91 para psicrotróficos na segunda coleta. Para o teto, o grupo mais representativo foi o de psicrotróficos, com 4,32 log UFC/mL (segunda coleta), assim como para o leite, cujo valor foi de 5,11 log UFC/mL (primeira coleta).

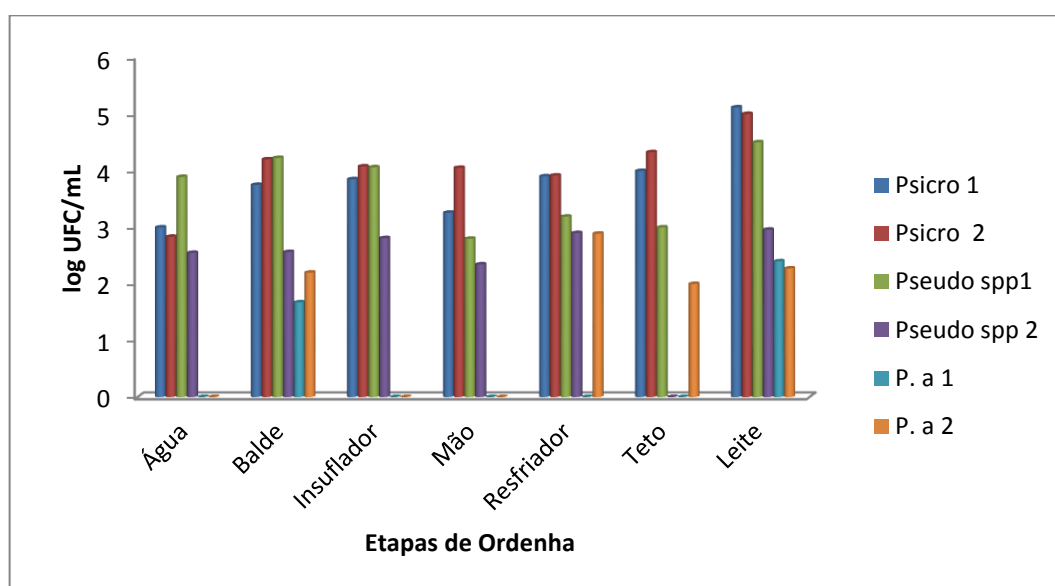


Figura 1 Representação dos pontos das etapas de ordenha.

Legenda: Psicro1: Psicrotróficos Primeira coleta; Psicro2: Psicrotróficos segunda coleta; Pseudo spp1: *Pseudomonas* spp primeira coleta; Pseudo spp2: segunda coleta *Pseudomonas* spp2; P.a1: *P. aeruginosa* primeira coleta; P.a2: *P. aeruginosa* segunda coleta.

4.4 Conclusão

Há necessidade de cuidados no manejo pré-ordenha com a utilização de desinfetantes e a secagem dos tetos. A presença da cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, embora encontrada em baixos níveis nos pontos avaliados, eventualmente, pode estar relacionada à infecções da glândula mamária dos animais, além da formação de biofilme nos equipamentos. As contagens de psicotróficos e *Pseudomonas* spp, de acordo com os valores de mediana, estão no limite estabelecido pela literatura, porém há propriedades em que a máxima obtida corresponde a valores elevados desses microrganismos e representam riscos à matéria prima leiteira.

4.5 Referências

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**, Sanvov, v. 58, n. 6, p. 828- 834, 1975.

ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho – Filtração gélida (GF-HPLC)**. 1992. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, MG. 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Plano mais pecuária**. Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, 2014. 32 p.

FERNANDES, M. C. *et al.* Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 745-748. 2009.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Pseudomonas* spp.** Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Pseudomonas%20e%20Burkholderia%204-2015_1.pdf>. Acesso em: 08 de agosto de 2015.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

MACÊDO, J. A. B.; BARRA, M. M. Processo de desinfecção com derivados clorados orgânicos em água para abastecimento público. *In: ENCONTRO MINEIRO DE ENSINO DE QUÍMICA*, 3, 2003. Viçosa – MG. **Anais...** Viçosa – MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

MATSUBARA, M. T. *et al.* Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina - PR, v. 32, n. 1, p. 277-286, 2011

MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicrotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2005.

NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Santa Maria – RS, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009. ISSN 1679-9216.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento - SEAB. **Números da pecuária paranaense**. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/nppr.pdf>. Acesso em: 05 de maio de 2015.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento - SEAB. **Cultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. Ano 2012/2013. Curitiba: SEAB, 2013.

PEREDA, J. A. O. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

RAMALHO, A, C. *et al.* Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.** Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, dez. 2012.

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

SANTOS, A. S. *et al.* Crescimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013.

ANEXOS

ANEXO A Formulário das atividades desenvolvidas nas propriedades

Propriedade _____
Nome Produtor _____
Endereço _____
Telefone _____

- 1- Produção de leite/dia _____

- 2- Lavagem de mãos _____ Roupas limpas _____ Local limpo _____
- 3- Pré-*dipping* _____; produto _____
- 4- Pós-*dipping* _____; produto _____

- 5- Limpeza do equipamento de ordenha _____; frequência _____;
 Produto _____
 Desmonte do conjunto _____; frequência _____

- 6- Teste para mastite: Caneca fundo escuro ☐ Despreza os 3 primeiros jatos ☐ CMT ☐

- 7- Local de armazenamento do leite _____ É realizado limpeza? _____
 Frequência _____ Produto _____

- 8- Origem da água _____ já realizou análise de
 água _____

- 9- Tempo que a indústria leva para coleta do leite _____

ANEXO B Imagens das coletas do material para análise.



Figura 1 Foto demonstrando abertura e coleta com Swab 3M em superfície de resfriador.



Figura 2 Condições de higiene no armazenamento do leite em tanques de imersão (Água do tanque com resíduos de leite e sujidades).



Figura 3 Esterilização de material para coleta de leite.



Figura 4 Coleta de leite de resfriador.



Figura 5 Coleta de amostra de insuflador, observar o ambiente com dejetos.

ANEXO C Quadro dos valores encontrados para Caseinomacropeptídeo entre primeira e segunda coletas

Quadro 1 Valores encontrados para Caseinomacropeptídeo entre primeira e segunda coletas

CMP	
1ª COLETA	2ª COLETA
1408,801	33,927
5,854	3,357
0,831	0
3,795	0
14,052	0
74,283	17,751
4,098	5,112
0,918	7,04
1,643	16,049
4,217	5,634
45,636	20,591