



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MAREZE

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DETERIORANTES
MESÓFILOS EM LEITE CRU REFRIGERADO**

Londrina
2017

JULIANA MAREZE

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DETERIORANTES
MESÓFILOS EM LEITE CRU REFRIGERADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mareze, Juliana .

Identificação molecular de deteriorantes mesófilos em leite cru refrigerado / Juliana Mareze. - Londrina, 2017.
64 f.

Orientador: Vanerli Beloti.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Mesófilos - Tese. 2. Qualidade - Tese. 3. Proteólise - Tese. 4. Lipólise - Tese. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

JULIANA MAREZE

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DETERIORANTES MESÓFILOS
EM LEITE CRU REFRIGERADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elsa Helena Walter Santana
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Dr. Ronaldo Tamanini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

DEDICO

Dedico a todos aqueles que amo,
principalmente aos meus pais e minha irmã.

AGRADECIMENTO

Primeiramente à Deus, por ser minha base, iluminando meu caminho e me concedendo forças diante das dificuldades.

Agradeço aos meus pais - Carlos Roberto Mareze e Maria Cristina Passarin Mareze – e à minha irmã - Marcelle Mareze - por todo apoio, carinho e amor dedicado. Obrigada pelo constante incentivo e por torcerem incessantemente pela minha vitória.

Agradeço também ao Egon Henrique Horst, que mesmo estando longe, sempre permaneceu ao meu lado, alegrando meus dias. Obrigada por acreditar, confiar e me incentivar a seguir em frente.

De forma especial, agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Vanerli Beloti, e Ronaldo Tamanini, pela disponibilidade, atenção, paciência e dedicação exemplares.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, o que tornou possível a realização dessa obra.

Aos colegas do LIPOA, obrigada pelo apoio e por torcerem pelo meu sucesso. Da mesma forma às minhas colegas de mestrado, Natalia Gonzaga e Louise Marioto. Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.

Agradeço também as minhas amigas Camila O. Rosa, Francine M. Giotto, Hanna Prochno, Raphaela N. de Souza, Andressa P. de Souza, Emmanuelle Goldoni e Leiluna Rettig que me acompanham desde a época da graduação. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

De forma geral, agradeço a todas as minhas amigas de infância, em especial à Carmem Bueno, Nathalia Furtado, Tarini G. Ferreti, Jéssica Aimê P. Souza, Natani G. Eisele e Camila Moraes, que nunca me deixaram sentir distante.

MAREZE, Juliana. **Identificação molecular de deteriorantes mesófilos em leite cru refrigerado**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A baixa qualidade do leite cru e reduzida vida útil do leite pasteurizado no Brasil causados pela deterioração dos constituintes do leite por parte dos microrganismos deteriorantes reflete diretamente seu potencial tecnológico para indústria. Conhecer os microrganismos deteriorantes que constituem a microbiota do leite cru refrigerado possibilita identificar a origem destes contaminantes, desta forma permite-se estabelecer ações de controle para evitar sua presença no leite. O objetivo deste estudo foi identificar geneticamente a microbiota mesofílica deteriorante do leite cru refrigerado da região de Castro-PR por meio de ferramentas moleculares a fim de caracterizar a microbiota com atividade proteolítica e lipolítica. Foram coletadas 18 amostras de leite cru refrigerado direto dos tanques de expansão de propriedades da região centro-oriental do Paraná. As propriedades eram dotadas de ordenhadeira mecânica de circuito fechado com sistema de pré-resfriamento em placas e refrigeração por tanque de expansão. A contagem de microrganismos mesófilos foi realizada em Petrifilm AC™ e para a verificação da atividade proteolítica e/ou lipolítica utilizou-se ágar leite suplementado (9:1) com solução leite em pó desnatado reconstituído (10%) e ágar tributirina suplementado (99:1) com tributirina, respectivamente. Para extração de DNA das cepas de mesófilos foi utilizada a técnica da fervura e para amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizou-se a técnica de PCR, utilizando os *primers* 27F e 1492R. Utilizou-se a análise de RFLP para definir os grupos genéticos entre as cepas isoladas e facilitar a escolha dos exemplares para sequenciamento. A média da contagem de microrganismos mesófilos foi de 3,58 log UFC/mL. A microbiota mesofílica com atividade proteolítica e /ou lipolítica foi identificada através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Todas as cepas foram identificadas com percentual de identidade de 100% a partir da comparação com dados dos GenBank. Diante disso, selecionou-se 172 cepas, as quais apresentaram capacidade proteolítica e/ou lipolítica, onde 66 (38%) cepas apresentaram atividade proteolítica, 57 (33%) ambas atividades e (49) 29% apenas atividade lipolítica. Bactérias Gram-positivas corresponderam 83,72% do total de cepas e 16,28% foram Gram-negativas. A identificação genética das cepas mesofílicas com capacidade deteriorante mostrou predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*. (40,11%), seguida por *Staphylococcus* sp. (13,94%); *Streptococcus* sp (13,36%), *Acinetobacter* sp. (11,62%), *Kurthia* sp. e *Bacillus* sp. (5,23%), *Rothia* sp. (4,06%) e *Stenotrophomonas* (1,16%). Em relação a atividade deteriorante os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* apresentaram entre os isolados, maior atividade proteolítica enquanto que o *Streptococcus dysgalactae* apresentou maior atividade lipolítica. Os gêneros *Rothia* sp e *Kurthia* sp foram isoladas pela primeira vez como deteriorantes do leite cru.

Palavras-chave: Mesófilos. Qualidade. PCR. Lipólise. Proteólise.

MAREZE, Juliana. **Molecular identification of mesophilic spoilage bacteria in refrigerated raw milk**. 2017. 64p. Dissertation (Master's Degree in Animal Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.#

ABSTRACT

The low quality of raw milk and short shelf life of pasteurized milk in Brazil caused by deterioration of milk constituents by spoilage microorganisms directly reflects their technological potential for industry. Knowing the spoilage microorganisms that constitute the microbiota of refrigerated raw milk makes it possible to identify the origin of these contaminants, in this way it is possible to establish control actions to avoid their presence in milk. The objective of this study was to genetically identify the spoilage mesophilic microbiota of the refrigerated raw milk from Castro-PR through molecular tools in order to characterize the microbiota with proteolytic and lipolytic activity. Eighteen samples of refrigerated raw milk were collected directly from bulk tanks of properties in the central-eastern region of Paraná. The properties consisted of a closed-loop mechanical milking machine with pre-cooling system and refrigerated bulk tank. The counts of mesophilic microorganisms were carried out in Petrifilm AC™ and for the proteolytic and / or lipolytic activity using supplemented milk agar (9: 1) with reconstituted skimmed milk powder (10%) and supplemented tributyrin agar (99: 1) with tributyrin, respectively. For the extraction of DNA from the mesophilic strains, the boiling technique was used and for partial amplification of the 16S rRNA gene the PCR technique, using primers 27F and 1492R. RFLP analysis was used to define the genetic groups among the isolated strains and to facilitate the selection of the species for sequencing. The mean count of mesophilic microorganisms was 3.58 log CFU / mL. The mesophilic microbiota with proteolytic and / or lipolytic activity was identified through the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. All strains were identified with 100% identity percentage from GenBank data. A total of 172 strains with proteolytic and / or lipolytic capacity were selected, where 66 (38%) strains showed proteolytic activity, 57 (33%) both activities and (49) 29% only lipolytic activity. Gram-positive represented 83.72% of total strains and 16.28% were Gram-negative. The molecular identification of mesophilic strains with spoilage potential showed predominance of *Lactococcus* and *Enterococcus* (40.11%), *Staphylococcus* sp. (13.94%); *Streptococcus* sp (13.36%), followed by *Acinetobacter* sp. (11.62%), *Kurthia* sp. and *Bacillus* sp. (5.23%), *Rothia* sp. (4.06%) and *Stenotrophomonas* (1.16%). In relation to the deteriorating activity, the genera *Lactococcus* and *Enterococcus* presented greater proteolytic activity among the isolates, whereas *Streptococcus dysgalactae* showed higher lipolytic activity. The genera *Rothia* sp and *Kurthia* sp were isolated for the first time as spoilage of raw milk.

Key words: Mesophilic. Quality. PCR. Lipolysis. Proteolysis.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Identificação genética das cepas mesofílicas com capacidade deteriorante isoladas do leite cru refrigerado de propriedades centro-orientais do Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014..... 38
- Tabela 2 -** Avaliação da sensibilidade do método oficial, método utilizando reagente floroglucina, novo método 1 e novo método 2 em diferentes concentrações de formol em leite.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição e percentual das atividades proteolíticas e/ou lipolíticas de cepas mesofílicas isoladas de leite cru refrigerado da região de Castro-PR.	40
-------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	<i>Brain Hart Infusion</i>
DNA	Ácido desóxidorribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
mm	Mili-mol
mL	Mililitro
mM	Mili-molar
MM	Mega-Molar
NaCl	Cloreto de Sódio
PCA	Plate Count Ágar
pmol	Pico-mol
TE	Solução Tris-EDTA Tris 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	Ultra High Temperature
µL	Microlitro
IN	Instrução Normativa
AC	Aerobic Count
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
UEL	Universidade Estadual de Londrina
RNA	Ácido Ribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
USA	United States of America
UV	Ultra-violeta
ng/mL	nanograma por mililitro
log	Logarítimo
pb	Pares de base
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
RFPL	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. ESTADO DA ARTE	13
2.1. PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO PARANÁ.....	13
2.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	13
2.3. MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA NO LEITE	14
2.4. ATIVIDADE DETERIORANTE DOS MICRORGANISMOS	19
2.5. QUALIDADE E BOAS PRÁTICAS DE ORDENHA	21
2.6. FERRAMENTAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVOS GERAIS	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. ARTIGO A	32
5. CONCLUSÃO	48
APÊNDICES	48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os principais produtores de leite no mundo, no entanto, ainda enfrenta problemas com a qualidade na produção do leite cru. A excessiva contaminação por bactérias deteriorantes leva à rápida deterioração do produto, conseqüentemente refletindo na vida útil. O leite pasteurizado no Brasil tem em média 4 dias de vida útil, já em outros países como Estados Unidos, Nova Zelândia e outros países da Europa, o leite pasteurizado tem em média 15 dias. Estes países não só preconizam baixas contagens microbianas, mas também o controle de microrganismos deteriorantes (RIBEIRO JÚNIOR, 2015).

Por ser uma excelente fonte de proteínas, gorduras, vitaminas e minerais, o leite e seus derivados constituem parte significativa da dieta humana. Porém, estes nutrientes favorecem o crescimento de alguns microrganismos desejáveis e/ou indesejáveis, como exemplo deste último, os microrganismos deteriorantes e patogênicos (FERNANDES, 2009). A microbiota presente no leite cru é complexa, e o que determina esta composição são as características do ambiente, dos animais e principalmente a higiene de ordenha (QUIGLEY et al., 2013). As condições de higiene durante a ordenha, definem o tipo e a qualidade do leite produzido, repercutindo em toda a cadeia, incluindo a indústria, produção de derivados lácteos e a saúde pública (BELOTI, 2015).

Sabe-se que qualidade microbiológica do leite no Brasil é uma constante preocupação, por isso, mudanças no setor lácteo foram implantadas com a intenção de melhorar a produção do leite no Brasil, dando ênfase à refrigeração do leite na propriedade e o seu transporte a granel. É através do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que a Instrução Normativa nº62 (IN 62) estabelece a obrigatoriedade da refrigeração do leite na propriedade leiteira e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para serem seguidos (BRASIL, 2011).

A refrigeração do leite cru logo após a ordenha é uma prática que tem reduzido o crescimento da microbiota mesofílica responsável pela acidificação do leite cru em temperatura ambiente (NICODÈME et al. 2005). Porém, o período de armazenamento do leite sob refrigeração pode determinar o crescimento de microrganismos que conseguem adaptar-se a essas temperaturas, que são os psicotróficos (HANTSIS-ZACHAROV; ALPERN, 2007).

Boa parte da microbiota psicotrófica é controlada pelo processo de pasteurização, no entanto, algumas bactérias deste grupo não são destruídas, passando a compor a microbiota remanescente no leite pasteurizado. Estas bactérias são denominadas de termodúricas.

A quantidade de microrganismos termodúricos, é outro fator que está intimamente relacionado com a vida útil dos alimentos já processados (MOREIRA; MONTANHINI, 2014).

Enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas pelos microrganismos deteriorantes, são termoestáveis, ou seja, não são inativadas por tratamentos térmicos como a pasteurização ou tratamento UHT (BARBANO; MA; SANTOS, 2006). Estas enzimas são responsáveis pela modificação dos principais constituintes do leite, alterando o sabor, odor e rendimento para produção de derivados, tornando o produto impróprio para o consumo e reduzindo sua vida útil (KOKA; WEIMER 2000; VIDAL-MARTINS et al., 2005). Mesmo em concentrações baixas, as proteases e as lipases causam defeitos em produtos com longa vida de prateleira como o leite UHT, e principalmente no leite em pó onde as enzimas são preservadas, podendo ser reativadas após sua reconstituição (CELESTINO et al., 1997; CHEN et al. 2003).

Devido à baixa qualidade do leite cru e reduzida vida útil do leite pasteurizado no Brasil, causados pela microbiota deteriorante, conhecer os microrganismos deteriorantes que constituem a microbiota do leite cru refrigerado possibilita identificar a origem destes contaminantes, desta forma permite-se estabelecer ações de controle para evitar sua presença no leite. Recentemente, técnicas moleculares tem permitido a identificação rápida e eficaz da microbiota do leite cru, permitindo o conhecimento da complexa microbiota que compõe o leite.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO PARANÁ

Em 2015, o Brasil foi o quinto maior produtor de leite do mundo com uma produção estimada de 35 milhões de litros/ano. Deste total apenas 24,05 milhões de litros foram beneficiados em laticínios sob regime de inspeção (FAO, 2013; IBGE, 2016).

Do total de leite adquirido pelos laticínios no ano de 2015, cerca de 700 milhões de litros foram oriundos do estado do Paraná, sendo Minas Gerais e Rio Grande do Sul responsáveis pela aquisição de 1,6 bilhões e 800 milhões, respectivamente (IBGE, 2016). Em termos municipais, Castro (PR) lidera a posição com uma produção de 239 milhões de litros no ano de 2014, 0,7% da produção nacional. Piracanjuba (GO) com 154,8 milhões de litros, e em Patos de Minas (MG) com 148,7 milhões de litros ocupam a 2ª e 3ª posição na produção, respectivamente (IBGE, 2014).

Apesar de estar entre os maiores produtores de leite, o Brasil ainda enfrenta problemas com a qualidade na sua produção. No entanto, algumas bacias leiteiras, como a bacia de Castro, localizada na região central do estado do Paraná, tem se destacado por ser composta por propriedades altamente tecnificadas, cujo leite apresenta baixas contagens totais de microrganismos, atendendo até mesmo aos padrões de qualidade internacionais (USFDA, 2003; EU COUNCIL, 2004).

2.2. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

A necessidade de implementar medidas para melhorar a qualidade do leite no país motivou a elaboração do Plano Nacional da Qualidade do Leite (PNQL) no ano de 1998 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O objetivo inicial do programa era o de aumentar a competitividade do setor leiteiro no Brasil (BRASIL, 1998).

Em 2002 o programa recebeu bases legais, por meio da Instrução Normativa 51, estabelecida pelo MAPA onde se definiram Regulamentos Técnicos para a produção, identidade e qualidade dos diversos tipos de leite, bem como as condições para a sua refrigeração na propriedade rural e transporte do leite a granel até a indústria (BRASIL, 2002).

Esta legislação trouxe alterações importantes para a produção leiteira com consequências relevantes para a qualidade do leite como a fixação de parâmetros de qualidade para o leite cru, inexistentes até então (BRASIL, 2002). Contudo a implantação destes novos

parâmetros não correu conforme previsto. A prorrogação desta normativa foi apresentada na forma de uma nova legislação, a Instrução Normativa 62 (IN 62), publicada em dezembro de 2011 (BRASIL, 2002; 2011). Essa normativa teve como função prorrogar os prazos para exigências de contagens de células somáticas (CCS) e contagem padrão em placas (CPP) do leite cru e ainda restringir a produção leiteira à apenas dois tipos: leite cru tipo A e leite cru refrigerado (BRASIL, 2011).

Porém, assim como aconteceu com a IN 51, neste ano de 2016 as exigências de CCS e CPP para o leite cru foram mais uma vez prorrogadas, e os parâmetros de CCS com os valores de 400 mil CS/ml e CPP com os valores 100 mil UFC/ml ganharam mais 2 anos para serem atingidos. Portanto, os valores de 500 mil CS/ml e 300 mil UFC/ml ficarão vigentes até o ano de 2018 para regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e 2019 para Norte e Nordeste (MAPA, 2016).

Outro ponto importante, que interfere na quantidade de microrganismos presentes no leite, é a refrigeração do leite cru. A legislação preconiza a refrigeração a 4°C em tanque de expansão e a 7°C em tanque de imersão, em até 3 horas, no máximo, após sua obtenção na ordenha, podendo permanecer na propriedade leiteira por até 48 horas, antes de ser transportado para o laticínio. Assim, se a contaminação inicial for alta, há tempo suficiente para a multiplicação microbiana mesmo no leite refrigerado. Além disso, o tempo de transporte ao laticínio e o ganho de temperatura nesse trajeto que pode ser até 3°C da temperatura original, favorecendo ainda mais a multiplicação destes microrganismos contaminantes (BRASIL, 2011).

Então, o leite pode demorar dias para ser beneficiado após a sua obtenção, tendo como resultado o aumento na contagem de microrganismos contaminantes, principalmente os deteriorantes e conseqüentemente aumento na produção de suas enzimas. Estes fatores levam a uma redução da qualidade microbiológica do produto causando prejuízos tecnológicos após o seu beneficiamento e redução da vida útil. O controle da contaminação, a velocidade de resfriamento e beneficiamento são essenciais para prolongar a vida útil do leite e seus derivados (BELOTI, 2015).

2.3. MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA NO LEITE

A qualidade e a vida útil do leite fluido são dependentes, principalmente, da microbiota presente no leite cru. No Brasil, o maior problema ainda é o excesso de contaminação microbiana do leite que leva à rápida deterioração do produto, inclusive daqueles

tratados termicamente como o leite pasteurizado, UHT e leite em pó (CHEN et al., 2003; MONTANHINI, 2012).

A refrigeração do leite imediatamente após a ordenha e sua estocagem nos taques de resfriamento numa temperatura igual ou inferior a 4°C tende a diminuir a multiplicação dos microrganismos. Entretanto, longos períodos de armazenamento do leite sob refrigeração, pode favorecer o crescimento da microbiota psicotrófica, particularmente a *Pseudomonas* spp., que está dentre os microrganismos deteriorantes mais importantes em leite refrigerado (FAGUNDES et al., 2006). Contudo, outras espécies pertencentes à família das Enterobacteriaceae, aos gêneros *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e outras espécies Gram-positivas como as do gênero *Bacillus* e *Paenebacillus*., também podem estar presentes (MUIR, 1996; RYSER, 1999; ENEROTH et al., 2000).

Bactérias associadas à mastite, infectam o canal do teto, podendo passar para o leite durante a ordenha. Os mais comuns causadores de mastite e que também podem estar presentes no leite são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Estas bactérias não se multiplicam bem no leite refrigerado mas podem permanecer viáveis (ROBINSON, 2002).

Devido ao seu elevado valor nutricional, juntamente com o pH próximo do neutro e elevada atividade de água, o leite serve como um excelente meio de crescimento para microrganismos, cuja multiplicação depende principalmente da temperatura, presença de outros microrganismos competidores e seus metabólitos (CLAEYS et al, 2013).

Assim, a qualidade microbiológica do leite cru é de extrema importância para a indústria de leite, pois reflete diretamente no potencial tecnológico do produto, uma vez que, a contaminação por microrganismos deteriorantes prejudica a qualidade do leite, interferindo no rendimento para industrialização, provocando alterações nas características sensoriais e reduzindo o tempo de prateleira do leite fluido e derivados lácteos (BARBANO; MA; SANTOS, 2006; CASTRO et al., 2014).

MESÓFILOS

Microrganismos mesófilos são todos aqueles, aeróbios ou anaeróbios facultativos ou não, capazes de crescerem em temperaturas entre 25 e 40°C. Este grupo de microrganismos são os mais abundantes, visto que essa temperatura predomina na maior parte do nosso planeta (JAY, 2005). A contagem de microrganismos mesófilos no alimento é utilizada para indicar a contaminação total dos alimentos, contaminação da matéria-prima,

processamento insatisfatório ou mau armazenamento em relação ao tempo e temperatura, servindo como um bom indicador de qualidade (NERO et al., 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Outro ponto importante é que altas contagens de aeróbios mesófilos podem indicar que também houve condições para o crescimento de microrganismos patogênicos, já que todos os microrganismos patogênicos são mesófilos e estes podem estar presentes no leite. Os principais mesófilos considerados microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias são os coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos, enterobactérias e estafilococos (FRANCO; LANGRAF, 2008).

A refrigeração do leite cru imediatamente após a ordenha é uma prática que visa a redução da acidificação do leite provocada por microrganismos mesófilos (NICODÈME et al. 2005). Porém, boa parte destes microrganismos apresentam capacidade de multiplicação quando submetidos a temperatura de refrigeração, principalmente em longos períodos de armazenamento, favorecendo o crescimento de microrganismos com característica psicrotrófica (BURDOVÁ et al., 2002; FAGUNDES et al., 2006)

Quando a contaminação no leite é baixa, há predominância de bactérias ácido lácticas (BAL), principalmente por espécies do gênero *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (QUIGLEY et al., 2013). Essas bactérias apresentam grande aplicabilidade na produção de alimentos fermentados por conferirem características sensoriais adequadas. Além disso, são microrganismos imprescindíveis para o equilíbrio da microbiota intestinal humana pelas características probióticas de algumas espécies (ZHANG, CAI, 2014). As BAL produzem, além do ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono, peptídeos antifúngicos, e principalmente as bacteriocinas, que são as de maior interesse (VÁSQUEZ et al., 2009; ASTERI et al., 2010).

Estudos têm demonstrado a importância da utilização da microbiota ácido láctica como probiótico e bioconversante, conferindo segurança microbiológica frente aos principais patógenos e deteriorantes de origem alimentar (HERREROS et al. 2005; MARTÍN-PLATERO et al. 2009; VOULGARI et al., 2010, FURTADO et al., 2015). Porém, algumas espécies de BAL são consideradas indesejáveis no alimento, como é o caso do gênero *Enterococcus* (BELOTI, 2015). Esse gênero é o mais controverso dentro do grupo das BAL, isto se deve particularmente ao seu potencial biotecnológico, probiótico (FRANZ et al., 2003) e à associação com infecções e resistência aos antimicrobianos (MORENO et al., 2006; ENDTZ et al., 1999).

A composição da microbiota mesofílica varia conforme a intensidade da contaminação, assim, em boas práticas de higiene na ordenha o leite apresenta baixas contagens e predomínio de bactérias desejáveis como os *Lactococcus* e *Lactobacillus*. Entretanto, quando as contagens de microrganismos mesófilos se encontram em níveis altos, há evidências de práticas insatisfatórias durante a ordenha e seu armazenamento (ROBINSON, 2002) e conforme a contaminação aumenta, microrganismos deteriorantes como os do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter* e entre outros, agregam-se no alimento (BELOTI, 2015).

PSICROTRÓFICOS

São microrganismos que apresentam capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (entre 2 e 8°C) mas sua temperatura ótima de multiplicação se encontra entre 20°C e 30°C, ou seja, também pode ser mesófilos (JAY, 2005; BELOTI et al., 2015). Em baixas temperaturas o metabolismo dos microrganismos psicrotróficos passa a ser predominantemente proteolítico e/ou lipolítico (CHEN et al., 2003; LIU et al., 2007). Estas características fazem deste grupo os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos, visto que a refrigeração é utilizada como método de conservação dos alimentos (RUSSELL, 2002; BEALES, 2004).

É frequente em leite cru refrigerado com altas contagens de mesófilos, que a quantidade de psicrotróficos seja ainda maior, em condições precárias de higiene, podem atingir mais de 75% da microbiota total do leite (NIELSEN, 2002), superando a população de mesófilos (SANTANA; BELOTI; BARROS, 2001). No Brasil, alguns autores têm relatado elevadas contagens de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado armazenado por 48 horas em propriedades rurais (CERQUEIRA et al., 1999; ARCURI et al., 2006; PERIN et al., 2012).

A utilização de água não potável, deficiências de procedimentos de higiene de utensílios, tanques entre outros equipamentos que entram em contato com o leite e drenagem inadequada da água dos equipamentos de ordenha atuam como fontes de contaminação destes microrganismos (ENEROTH et al., 2000a, 2000b; KAMIYAMA, OTENIO, 2013).

Os psicrotróficos de maior incidência no leite cru refrigerado e derivados são: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Yersinia* representando as bactérias Gram-negativas e *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*,

Lactobacillus, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* representando as Gram-positivas (SORHAUG, STEPANIAK, 1997; MCPHEE, GRIFFITHS, 2011).

TERMODÚRICOS

Os termodúricos constituem em uma microbiota com capacidade de sobreviver em altas temperaturas, como da pasteurização, e pode ser composta por bactérias formadoras de esporos (esporuladas), sem, contudo, multiplicarem-se nestas temperaturas (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Os microrganismos termoresistentes causam deterioração contínua do leite, mesmo após o tratamento térmico, permanecendo viáveis e ativas no produto ao longo de sua vida útil (JAY, 2005).

Este grupo é comumente formado pelos *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp.; *Clostridium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Alcaligenes* (ROBINSON, 2002; SCHELDEMAN et al., 2004;) sendo os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* os principais formadores de esporos (WALSTRA et al., 2001; FRANCO e LANDGRAF, 2008). A água residual da lavagem dos equipamentos de ordenha e o tipo de material da cama de animais confinados são importantes fontes de contaminação desses microrganismos (MAGNUSSON et al., 2007).

Os microrganismos formadores de esporos possuem a capacidade alterar sua forma vegetativa para sobreviver às condições extremas do meio. Os esporos podem até mesmo sobreviver ao processamento UHT (FORSYTHE, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2008; ESPEJO et al., 2014). Os esporos têm fundamental importância para a indústria de laticínios, uma vez que, podem resistir ao processo da pasteurização, limpeza e sanitização dos equipamentos (JAY, 2005; FUQUAY et al., 2011; BUEHNER et al., 2014). Além disso, a presença de esporos nos alimentos é um fator determinante da qualidade, pois quando as condições do meio se tornam favoráveis, os esporos formados podem germinar e se multiplicar nos alimentos já processados, constituindo a microbiota remanescente no produto (ABEE et al., 2011).

2.4. ATIVIDADE DETERIORANTE DOS MICRORGANISMOS

A alteração na composição do leite causada pelos microrganismos, principalmente a degradação de gorduras, de proteínas e de carboidratos, sucedidas por suas

preferências nutricionais, torna-o inadequado para industrialização e consumo (COUSIN, 1982). Essas alterações decorrentes do metabolismo microbiano podem ser classificadas como lipolítico, proteolítico e sacarolítico (JAY, 2005; BELOTI, 2015).

METABOLISMO SACAROLÍTICO

Quase a totalidade dos microrganismos apresenta capacidade de degradar açúcares. É o metabolismo mais simples, e que gera maiores quantidades de energia. Assim, os mais abundantes no leite cru mantido em temperatura ambiente (TRONCO, 2008). Estes microrganismos apresentam vias metabólicas para a degradação de carboidratos, ou seja, açúcares, e a enzima responsável pela degradação da lactose no leite é a β -D-galactosidase (lactase) (BELOTI, 2015). Esta enzima transforma a lactose em β -D-galactose e α -D-glicose e é a principal causa de acidificação no leite.

Os principais grupos de microrganismos responsáveis pela degradação da lactose no leite são as bactérias ácido lácticas e os coliformes, ou seja, esse metabolismo sacarolítico é característico dos microrganismos mesófilos, o que significa que a refrigeração pode diminuir a atividade destas enzimas e conseqüentemente a acidificação do leite (ANDRADE, 2005). Os coliformes são bactérias Gram negativas que indicam contaminação de origem ambiental e/ou fecal e as bactérias ácido lácticas são bactérias desejáveis, utilizadas na elaboração de derivados lácteos como queijos e iogurtes (FRANCO; LANDGRAF, 2008; BELOTI, 2015).

METABOLISMO PROTEOLÍTICO

Os microrganismos capazes de degradar proteína são os proteolíticos, e as enzimas responsáveis por esta degradação são as proteases. Em sua maioria, as proteases presentes no leite, agem sobre a κ -caseína resultando na desestabilização das micelas de caseína o que provoca a coagulação do leite (RECIO et al., 2000). As proteases também hidrolisam as caseínas disponíveis no leite, resultando em peptídeos solúveis que são responsáveis pelo sabor amargo aferido ao leite (DATTA; DEETH, 2003).

A degradação das proteínas do leite também gera problemas tecnológicos como a sedimentação e geleificação em leite UHT (CELESTINO et al., 1997). Além disso, provocam diminuição do rendimento na fabricação de derivados lácteos, pois a caseína é a

principal proteína do leite, portanto, o principal componente na produção de derivados lácteos, como o queijo.

O controle da microbiota psicrotrófica, onde se incluem os principais microrganismos produtores de proteases no leite, constitui um fator importante para assegurar a qualidade e a vida útil de produtos lácteos (MOREIRA; MONTANHINI, 2014).

Entre os microrganismos psicrotróficos proteolíticos de importância no leite, a *Pseudomonas* spp é considerada como a principal deteriorante por sua grande capacidade de produzir enzimas, porém, bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* tem ganhado destaque, por resistirem aos tratamentos térmicos e constituírem a microbiota dos alimentos processados, como consequência, reduzindo sua vida útil (SCHELDEMAN et al., 2004).

METABOLISMO LIPOLÍTICO

Microrganismos que produzem lipases são capazes de degradar gordura, e são lipolíticos. Muitas bactérias que produzem proteases também produzem lipases (CHEN et al., 2003). As lipases, como as proteases tem boa atividade em baixas temperaturas, por isso são uma boa alternativa de sobrevivência dos microrganismos em temperatura de refrigeração (HASS, 2001). Cabe ressaltar que pouco se sabe sobre a temperatura que inibe a atividade das lipases bacterianas, havendo relatos sobre sua atividade em temperaturas de 150°C por alguns segundos (RATHI, SAXENA, GUPTA, 2001). Porém, há uma estreita relação entre o tempo e temperatura em que lipase é submetida (GUPTA, GUPTA, RATHI, 2004).

Assim como os proteolíticos, os microrganismos lipolíticos têm fundamental importância na deterioração do leite, uma vez que as lipases são as principais responsáveis pela alteração de características sensoriais no leite fluido (CHEN et al., 2003; FUQUAY et al., 2011). Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura do leite, em ácidos graxos livres (AGL) de cadeia curta, o aumento excessivo da concentração de AGL no leite, está associado ao aparecimento de odores desagradáveis no leite, como pútrido e rançoso (WANG, XU, 2009; BELOTI, 2015). Entre os principais microrganismos lipolíticos estão os do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, que também são proteolíticos (FUQUAY et al., 2011).

2.5. QUALIDADE E BOAS PRÁTICAS DE ORDENHA

Na glândula mamaria, o conteúdo acima da cisterna do úbere é estéril em animais sadios. No entanto, a contaminação ocorre rapidamente por microrganismos presentes cisterna do teto, superfície dos tetos e úbere, equipamentos de ordenha e do ambiente (BRITO e BRITO, 1998). A origem destes contaminantes ambientais se dá principalmente através do solo, fezes, silagem ou outros alimentos e o ar (ROBINSON, 2002). O principal parâmetro utilizado para verificar a qualidade do leite é o seu perfil microbiológico, sendo determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte (GUIMARAES, 2002).

A qualidade do leite cru produzido no Brasil tem influência das características do sistema de produção. A maior parte dos produtores pode ser classificada como pequenos ou médios, com baixa produção diária e de caráter familiar (STOCK, 2014). Portanto, há pouco investimento na atividade, incluindo propriedades com baixa tecnificação, falta no controle sanitário dos animais e condições higiênicas insatisfatórias na ordenha, armazenamento e transporte desse leite, resultando em problemas durante toda a cadeia produtiva e como consequência a baixa qualidade do leite produzido (SANTOS; FONSECA, 2007; NERO, VIÇOSA, PEREIRA, 2009).

Ausência de boas práticas de higiene em cada etapa do processo de ordenha pode ser responsável pela inclusão de milhões de microrganismos indesejáveis no leite, podendo incluir tanto microrganismos patogênicos como deterioradores. A higiene dos utensílios e dos equipamentos de ordenha, descarte dos primeiros jatos e a realização do pré-dipping são as principais práticas que eliminam estas fontes de contaminação (MATSUBARA et al., 2011). Mattos et al. (2010) e Silva et al. (2011) afirmam que principais pontos de contaminação na ordenha são os tetos dos animais, os três primeiros jatos, a água residual e a superfície de utensílios de ordenha como baldes, latões, teteiras, resfriador e mãos do ordenhador.

A principal causa da contaminação do leite é o emprego inadequado ou a ausência de boas práticas de higiene na ordenha (SILVA et al, 2011). A carga microbiana depende da quantidade de microrganismos que entram em contato antes, durante ou após a ordenha e do binômio tempo/temperatura de estocagem desse leite, ressaltando que a multiplicação microbiana é condicionada pela temperatura de armazenamento do leite (NERO, VIÇOSA, PEREIRA, 2009).

A utilização de água não tratada também compromete a qualidade do leite, devido a contaminação da mesma nos equipamentos de ordenha e de resfriamento, além disso,

pode veicular agentes causadores de mastite, conseqüentemente interferindo na sanidade dos animais e na qualidade da matéria prima obtida (AMARAL et al., 2004).

2.6. FERRAMENTAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A pesquisa de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos é um método que auxilia o controle de qualidade e a inocuidade dos alimentos. Técnicas convencionais na microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos em conjunto com testes sorológicos, para isolar, quantificar e identificar microrganismos (GANDRA et al., 2008). Esses métodos são sensíveis, inespecíficos e dão resultados qualitativos e quantitativos sobre o microrganismo presente no alimento. Embora sejam confiáveis e eficientes, para os resultados serem obtidos requerem dias a semanas, tornando esses métodos laboriosos (MARIN et al., 2006).

O desenvolvimento de técnicas moleculares propiciou um avanço na utilização de métodos seguros, eficientes e rápidos para a detecção, identificação e caracterização de bactérias (ADZITEY, HUDA, ALI, 2013). As técnicas moleculares que tem se destacado são fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Essa técnica tornou-se a mais utilizada em diagnóstico microbiológico (MALORNY et al., 2003).

Neste método a fita dupla de DNA é desnaturada em duas fitas simples, cada fita é anelada por pequenos fragmentos específicos de DNA (*primers*), usados para delimitar a sequência a ser amplificada, e a extensão da porção final dos *primers* ocorre pela enzima termoestável DNA polimerase, criando duas novas fitas de DNA complementares (JOSHI, DESHPANDE, 2010). Desta forma, a PCR permite a rápida amplificação in vitro de pequenas quantidades do material genético (DNA ou RNA) em milhões de vezes (KONEMAM et al., 2001; MALORNY et al., 2003). O material genético amplificado pode ser visualizado na forma de banda através da eletroforese em gel (BOER, BEUMER, 1999).

Técnicas moleculares de tipagem identificam diferentes cepas de uma mesma espécie. Um exemplo dessas técnicas, são os métodos de DNA *fingerprinting*, ou seja, baseados em análises de fragmentos de DNA como eletroforese de campo pulsado (*pulsedfield gel electrophoresis* – PFGE), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*random amplified polymorphic DNA* - RAPD). São utilizadas para realizar a diferenciação de isolados

bacterianos pela formação de grupos com similaridade genética (OLIVE, BEAN, 1999). A técnica de RFLP envolve o uso de enzimas de restrição que digerem e separam o DNA em fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos são analisados por eletroforese em gel de agarose. Este método favorece a diferenciação das bactérias pelas variações nas sequências de DNA (BABALOLA, 2003; FOLEY et al. 2009).

A utilização de genes altamente conservados nas subunidades 5S, 16S e 23S do ribossomo permite obter informações taxonômicas em vários níveis de classificação e distinção entre espécies e são considerados os mais adequados para estudos de diversidade (CLAESSON et al., 2010). Tais genes estão presentes em todos os organismos vivos e apresentam um maior grau de conservação genética (HARMSEN, KARCH, 2004). Uma das vantagens de se utilizar as informações contidas neste gene, especialmente o 16s rRNA é sua disponibilização em bancos de dados, na maioria das vezes, acessíveis gratuitamente (COUTINHO et al., 1999; JANDA, ABBOTT, 2007).

O método de sequenciamento mais utilizado é o da terminação de cadeia, mais conhecido por Sequenciamento *Sanger*. Esse método gera várias sequências de nucleotídeos (PEIXOTO, 2013). Essas sequências são comparadas com outras já depositadas em bancos de dados, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Ribosomal Differentiation of Microorganisms (RIDOM), possibilitando a identificação do microrganismo estudado (BECKER et al. 2004). O sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal tem sido extensivamente utilizado com finalidade taxonômica e filogenética (BECKER et al. 2004) e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana pois apresenta regiões altamente conservadas e contêm informações suficientes (1.500 pares de bases) para realizar sequenciamento (NOLTE, CALIENDO, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., GROOT, M. N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R., & VAN DER VOORT, M. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food microbiology**, v.28, n. 2, p.199-208, 2011.
- ADZITEY, F., HUDA, N., ALI, G. R. R. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. **3 Biotech**, v.3, n.2, p.97-107, 2013.
- AMARAL, L. D., ROMANO, A. P. M., NADER FILHO, A., ROSSI JUNIOR, O. D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, n.4, p.417-421, 2004.
- ANDRADE, A. C. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, UFU, Uberlândia-MG, 97f., 2005.
- ARCURI, E. F., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., PINTO, S. M., ÂNGELO, F. F., & SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ASTERI, I.A.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E.; The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**. v.63, n.2, p.234-242, 2010.
- BABALOLA, O. O. Molecular techniques: an overview of methods for the detection of bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.710–713, 2003.
- BARBANO, D. M., MA, Y., SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life 1, 2. **Journal of Dairy Science**, v.89, p15-19, 2006.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2004.
- BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., SCHUMANN P., PETERS G., VON EIFF C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.4988-4995, 2004.
- BELOTI, V. **Leite: Obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015, 417 pp.
- BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 119-130, 1999
- BRASIL, RDC 12. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**, 2 de janeiro de 2001, Brasília, 2001.
- BRASIL. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 13. 21 set. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 31 dez. 2011.

BRASIL. Portaria nº 166, de 5 de maio de 1998. Criar Grupo de Trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade e à modernização do setor produtivo de leite e derivados no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, 6 maio 1998.

BRITO, J. R. F., PINTO, S. M., SOUZA, G. N., ARCURI, E. F., BRITO, M. A. V. P., SILVA, M. R. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.2, p.125-131, 2004.

BRITO, M. A. V. P; BRITO, J. R. F. **A qualidade higiênica do leite**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Juiz de Fora-MG, 1998.

BUEHNER, K. P., ANAND, S., GARCIA, A. Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 midwest dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97, 6777-6784, 2014.

BURDOVÁ, O., BARANOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., ROZANSKA, H., ROLA, J. G. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. **Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy**, v.46, n.2, p.325-330, 2002.

CASTRO, K. A., SILVA, K. A. L., PEREIRA, A. I. A., ORSINE, J. V. C. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos prato e mussarela, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.8, n.1, p.1237-1250, 2014.

CELESTINO, E. L., IYER, M., ROGINSKI, H. Reconstituted uht-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of uht milk on its physico-chemical attributes and flavor. **International Dairy Journal**, v.7, n.2, p.129-140, 1997.

CERQUEIRA, M.M.O.P., PICININ, L.C.A., FONSECA, L.M., SOUZA, M.R., LEITE, M.O., PENNA, C.F.A.M. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. In: MESQUITA, A.J., DURR, J.W., COELHO, K.O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, v.1, 2006, p. 273-290.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255- 275, 2003.

CLAESSON, M.J.; WANG, Q.; O’SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; ROSS, R.P.; O’TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 1-13, 2010.

CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., DE BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., DE ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y., HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, v.31, n.1, p.251-262, 2013.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

- COUTINHO, H., OLIVEIRA, V. D., MANFIO, G., ROSADO, A. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 71, p. 491 – 503, 1999.
- DATTA N.; DEETH H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT-Food Science and Technology**. v.36, n.2, p.173–182, 2003.
- ENDTZ, H. P., VAN DEN BRAAK, N., VERBRUGH, H. A., VAN BELKUM, A. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.18, n.10, p.683-690, 1999.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n.1, p. 99-106, 2000a.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5, p. 325-331, 2000b.
- ESPEJO, G. G. A., HERNANDEZ HERRERO, M. M., JUAN, B., TRUJILLO, A. J. Inactivation of Bacillus spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. **Food Microbiology** 44, 204-210, 2014.
- EU COUNCIL. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal of the European Union**, 2004.
- FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W.P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.568-572, 2006.
- FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Faostat. **Countries by commodity**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 13 de setembro de 2016.
- FERNANDES, R. **Microbiology handbook dairy products**. 3. ed. Cambridge, UK. Royal Society of Chemistry, 2009. 173pp.
- FOLEY, S. L., LYNNE A. M., NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.4, p.430–440, 2009.
- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002, 357 p.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Ateneu, 2008, 192pp.
- FRANZ, C. M., STILES, M. E., SCHLEIFER, K. H., HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2, p.105-122, 2003.
- FUQUAY, J. W., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences** (2nd ed.). London: Elsevier, 2011, pp. 1009.
- FURTADO, D. N., TODOROV, S. D., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T., & FRANCO, B. D. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk:

Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 1, p.201-206, 2015.

GANDRA, E. Á., GANDRA, T. K. V., DE MELLO, W. S., DA SILVA GODOI, H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2008.

GUIMARAES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102-103, p. 25-34, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

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

HARMSSEN, D., KARCH, H. 16S rRNA for diagnosing pathogens: a living tree. **ASM News-American Society for Microbiology**, v.70, n.1, p.19-24, 2004.

HASS, M. Lipolytic microorganisms. In: DOWNS, F.P.; ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. p.175-181.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**. v.22, n. 5, p.455-459, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Estatística da Pecuária de Produção. 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601_publ_completa.pdf>. Acesso em: Acesso em: 13 de setembro de 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agropecuária Municipal**. 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: Acesso em: 13 de setembro de 2016.

JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v.45, n.9, p.2761-2764, 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia dos Alimentos**. (6^a ed.) New York: Chapman and Hall, p. 701, 2005.

JOSHI, M., DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International Journal of Biomedical Research**, v.2, n.1, p.81-97, 2011.

KAMIYAMA, C. M., OTENIO, M. H. Aspectos sobre qualidade da água e qualidade de produtos na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n.391, p.42-50, 2013.

- KOKA R. e WEIMER B. C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**. v.89, n.2, p.280–288, 2000.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN, W. C. Diagnóstico microbiológico. 5ª edição, São Paulo, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2001, 420pp.
- LIU, M., WANG, H., GRIFFITHS, M. W. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of applied microbiology**, v.103, n.6, p.2174-2184, 2007.
- MAGNUSSON, M., CHRISTIANSSON, A., e SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of dairy science**, v.90, n.6, p.2745-2754, 2007.
- MALORNY, B. TASSIOS, P. T., RÅDSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.
- MAPA. Mapa e Embrapa desenvolvem sistema que qualifica políticas públicas para o leite. <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-e-embrapa-desenvolvem-sistema-que-qualifica-politicas-publicas-para-o-leite>> Acesso em: 10 de fev 2017.
- MARIN, V. A. LEMOS, A. A. D., FREITAS, E. I. D. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.
- MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. v.132, n.1, p.24-32, 2009.
- MATSUBARA, M. T., BELOTI, V., TAMANINI, R., FAGNANI, R., DA SILVA, L. C. C., MONTEIRO, A. A., BARROS, M. D. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, p.277-286, 2011.
- MATTA, H., PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.2, p.59-62, 1999.
- MATTOS, M.R.; BELOTTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.F.; NERO, L.A.; BARROS, M.A.F.; PIRES, E.M.F.; PAQUEREAU, B.P.D. Qualidade do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p.173-182, 2010.
- MCPHEE J. D., GRIFFITHS M. W. Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. In: John, W.F. (Ed). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Second Edition. Academic Press, San Diego, 2011, p.379-383.
- MONTANHINI, T. M. Caracterização fenotípica e genotípica de *Bacillus cereus* isolado em produtos lácteos com relação ao seu comportamento psicrotrófico, **Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos**, UFPR, Curitiba-PR, 80f., 2012.
- MOREIRA, N. V., MONTANHINI, M. T. M. Contaminação do leite na ordenha por microorganismos proteolíticos e lipolíticos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 8, n. 2, p. 29-38, 2014.

- MORENO, M. F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n.1, p.1-24, 2006.
- MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw and fresh products. **International Journal of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.
- NERO, L. A., VIÇOSA, G. N., PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p. 386-390, 2009.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NICODÈME, M., GRILL, J. P., HUMBERT, G., & GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of applied microbiology**. v.99, n.3, p.641-648, 2005.
- NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6628-6634, 2002.
- NOLTE F.S., CALIENDO A.M. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: MURRAY P.R., BARON E.J., JORGENSEN J.H., PFALLER M.A., YOLKEN R.H. (8ª ed), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, 2003.
- OLIVE, D. M., BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.
- PEIXOTO, B. M. Classificação de sequência e análise de diversidade em metagenômica, 2013. 77 f. Tese mestrado, Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP - Instituto de Computação.
- PERIN, L. M., MORAES, P. M., ALMEIDA, M. V., NERO, L. A. Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.333-342, 2012.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v.37, n.5, p.664-698, 2013.
- RATHI, POOJA; SAXENA, R. K.; GUPTA, RANI. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187-192, 2001.
- RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by action of psychrotrophic protease on ksein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. **Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de concentração: Sanidade Animal) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.
- ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. 3 ed, John Wiley & Sons, 2002, 784pp.

- RUSSELL, N. J. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 27-34, 2002.
- RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v. 8, p. 7-9, 1999.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.
- SCHELDEMAN, P., GOOSSENS, K., RODRIGUEZ-DIAZ, M., PIL, A., GORIS, J., HERMAN, L., VOS, P., LOGAN, N. A., HEYNDRIKX, M. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.3, p.885-891, 2004.
- SILVA, L. C. C., BELOTI, V., TAMANINI, R., OVIDIO, L., MATTOS, M. R., ARRUDA, A. M. C. T., PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p.267-276, 2011.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends of Food Science and Tecnology**, v.8, n.2, p.35-41, 1997.
- STOCK, L. A. Produtores de leite no Brasil – Quantos são e quanto produzem. Balde Branco. p. 52 – 55, 2014. Disponível em:
<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/991927/1/Cnpgl2014BaldeBrancoProdutores.pdf>>.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite** (3ª ed.) Santa Maria: UFSM, 206 p. 2008.
- USFDA. U.S. Food and Drug Administration. 2003. Grade “A” pasteurized milk ordinance. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service. 290 p.
- VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de substancias antimicrobianas producidas por bacterias acido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**. v. 36, n. 1, p. 64-71, 2009.
- VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite uat/uht. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.4, p.698-704, 2005.
- VOULGARI, K., HATZIKAMARI, M., DELEPOGLOU, A., GEORGAKOPOULOS, P., LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v.21, n 2, p. 136-142, 2010.
- WALSTRA, P.; GEURTS T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA A.; BOEKEL M. V. G. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia; 2001.
- WANG, B.; XU, S. Effects of different commercial lipases on the volatile profile of lipolysed milk fat. **Flavour and Fragrance Journal**, v.24, n.6, p.335-340, 2009.
- ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a microbiota com atividade proteolítica e lipolítica presente no leite cru refrigerado precedente da região de Castro-PR e identificar geneticamente a microbiota mesofílica deteriorante por meio de ferramentas moleculares.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os microrganismos mesófilos no leite cru refrigerado;
- Avaliar a atividade proteolítica e lipolítica das cepas mesofílicas;
- Identificar as cepas mesofílicas com atividades proteolítica e/ou lipolíticas por sequenciamento do gene 16S rRNA, avaliando a proporção das cepas que compõe a microbiota do leite cru refrigerado.

4. ARTIGO A

IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DA MICROBIOTA MESOFÍLICA DETERIORANTE DO LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO

Recentemente, técnicas moleculares tem permitido a identificação rápida e eficaz da microbiota do leite cru, permitindo o conhecimento da complexa microbiota que compõe o leite. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi identificar geneticamente as bactérias aeróbias mesófilas com atividade proteolítica e/ou lipolítica isoladas do leite cru refrigerado produzido em propriedades leiteiras altamente tecnificadas e com boas práticas de higiene. Foram coletadas 18 amostras de leite cru refrigerado de diferentes propriedades rurais de Castro, localizada na porção centro-oriental do estado do Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014. A contagem de microrganismos mesófilos foi realizada em Petrifilm AC™ e para a verificação da atividade proteolítica e lipolítica utilizou-se ágar leite suplementado (9:1) com solução leite em pó desnatado reconstituído (10%) e ágar tributirina suplementado (99:1) com tributirina, respectivamente. Para extração de DNA das cepas de mesófilos foi utilizada a técnica da fervura e para amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizou-se a técnica de PCR, utilizando os primers 27F e 1492R. As contagens de microrganismos mesófilos do leite cru refrigerado variaram de 2,83 log UFC/mL a 3,58 log UFC/mL. Foram selecionadas 172 cepas com capacidade deteriorante para proteólise e lipólise, onde 66 (38%) apresentaram atividade proteolítica, 57 (33%) ambas atividades e (49) 29% apenas atividade lipolítica. Os 172 isolados de aeróbios mesófilos, foram agrupados pela análise de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), onde permitiu identificar a predominância das cepas que compõe a microbiota mesofílica. O *Lactococcus garviae* representou 25% do total de cepas mesofílicas isoladas, o *Enterococcus faecalis* representou 15,11%, em seguida o *Acinetobacter* com 11,62%, *Streptococcus dysgalactae* e o *Streptococcus uberis* representaram 7,55% e 5,81 respectivamente. E o gênero dos *Staphylococcus* spp somaram 13,94% do total de cepas isoladas. Em relação a atividade deteriorante os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* apresentaram entre os isolados, maior atividade proteolítica enquanto que o *Streptococcus dysgalactae* apresentou maior atividade lipolítica. O *Acinetobacter* e os *Bacillus* sp apresentaram, em sua maioria, ambas atividades deteriorantes. Este é o primeiro relato do potencial deteriorante da *Kurthia gibsonii* e *Rothia terrae* no leite cru, onde apresentaram frequência de 5,23% e 4,06% do total de cepas mesofílicas.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas, Proteólise, Lipólise, Qualidade.

GENETIC IDENTIFICATION OF SPOILAGE MESOPHILIC BACTERIA OF REFRIGERATED RAW MILK

ABSTRACT

Recently, molecular techniques allowed fast and efficient identification of the microbiota of raw milk, allowing to know the complex microbiota present in milk. In this context, the objective of this work was to identify genetically the mesophilic aerobic bacteria with proteolytic and / or lipolytic activity isolated from refrigerated raw milk produced in dairy farms highly technified and with good hygiene practices. Eighteen samples from different rural properties of Castro, located in the central eastern portion of the state of Paraná, were collected from November 2013 to May 2014. The counts of mesophilic microorganisms were carried out in Petrifilm ACTM and for the proteolytic and / or lipolytic activity using supplemented milk agar (9: 1) with reconstituted skimmed milk powder (10%) and supplemented tributyrin agar (99: 1) with tributyrin, respectively. For the extraction of DNA from the mesophilic strains, the boiling technique was used and for partial amplification of the 16S rRNA gene the PCR technique, using primers 27F and 1492R. The counts of mesophilic microorganisms from refrigerated raw milk ranged between 2.83 log cfu/mL to 3.58 log cfu/mL. A total of 172 strains with spoilage potential for proteolysis and lipolysis were selected, where 66 (38%) presented proteolytic activity, 57 (33%) both activities and (49) 29% only lipolytic activity. The 172 isolates of mesophilic aerobes were grouped by RFLP analysis, where it was possible to identify the predominance of the strains that composes the mesophilic microbiota. *Lactococcus garviae* represented 25% of the total mesophilic strains isolated, *Enterococcus faecalis* represented 15.11%, followed by *Acinetobacter* with 11.62%, *Streptococcus dysgalactae* and *Streptococcus uberis* represented 7.55% and 5.81 respectively. And the genus of *Staphylococcus spp* added 13.94% of the total of strains isolated. The spoilage potential of *Lactococcus* and *Enterococcus* presented greater proteolytic activity among the isolates, whereas *Streptococcus dysgalactae* showed higher lipolytic activity. *Acinetobacter* and *Bacillus sp* presented, for the most part, both spoilage potential. This is the first report of the spoilage potential of *Kurthia gibsonii* and *Rothia terrae* in raw milk, and presented a frequency of 5.23% and 4.06% of the total mesophilic strains.

Key words: Lactic acid bacteria, Proteolysis, Lipolysis, Quality.

INTRODUÇÃO

A diversidade na composição da microbiota do leite cru contribui consideravelmente para suas características sensoriais além de determinar a qualidade e tempo de vida útil do leite. Os microrganismos contaminantes do leite incluem as bactérias com relevância tecnológica como as bactérias ácido lácticas que são fundamentais na produção de derivados lácteos, principalmente dos queijos, como também os microrganismos deteriorantes, incluindo Gram-positivos e Gram-negativos, responsáveis pela alteração das características sensoriais (COPPOLA et al., 2008).

A quantidade de deteriorantes indesejáveis está associada a deficiência nas práticas de ordenha adotadas. Esta contaminação pode ser originada do solo, água, pele e pelo dos animais, utensílios e equipamentos de ordenha e até mesmo dos ordenhadores (SPERBER, DOYLE, 2009). A deterioração do leite acontece principalmente pela ação de lipases e proteases causando sérios problemas tecnológicos para as indústrias de laticínios (HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007).

A temperatura também tem papel importante na diversidade dos microrganismos que compõe o leite cru. Estocagem do leite refrigerado por longos períodos pode favorecer a seleção da microbiota mesofílica com capacidade psicrotrófica, e assim, produzir enzimas proteolíticas e/ou lipolíticas (BRAUN; FEHLHAVER, 2002). A contagem padrão em placas de aeróbios mesófilos é uma análise laboratorial utilizada para monitorar a qualidade microbiológica do leite cru, refletindo falhas de higiene na obtenção, armazenamento, transporte e beneficiamento do leite (CHAMBERS, 2002).

Técnicas convencionais na microbiologia de alimentos para pesquisa de microrganismos, embora sejam confiáveis e eficientes, para os resultados serem obtidos requerem dias a semanas, tornando esses métodos laboriosos (MARIN et al., 2006; GANDRA et al., 2008). Recentemente, técnicas moleculares têm permitido a identificação rápida e eficaz da complexa microbiota que o compõe o leite cru (LAFARGE et al., 2004). Como exemplo, o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP) é utilizado para avaliar o polimorfismo entre linhagens da mesma espécie (OLIVE, BEAN, 1999). Este método favorece a diferenciação das bactérias pelas variações nas sequências de DNA utilizando enzimas de restrição (BABALOLA, 2003; FOLEY et al. 2009).

A utilização de genes altamente conservados como 16S do ribossomo permite obter informações taxonômicas em vários níveis de classificação e distinção entre espécies (CLAESSON et al., 2010). Uma das vantagens de se utilizar as informações contidas neste

gene, é sua disponibilização em bancos de dados, na maioria das vezes, acessíveis gratuitamente (COUTINHO et al., 1999; JANDA, ABBOTT, 2007).

A utilização de métodos convencionais para quantificação e isolamento dos microrganismos em conjunto com técnicas moleculares para a identificação de microrganismos, utilizando o gene 16s rRNA, têm sido descritas para avaliar a composição de comunidades bacterianas presentes no leite (DELBÈS et al., 2007; HANTSIS-ZACHAROV, HALPERN, 2007). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi identificar geneticamente as bactérias aeróbias mesófilas com atividade proteolítica e/ou lipolítica isoladas do leite cru refrigerado da região centro-oriental do Paraná, onde o leite produzido apresenta baixas contagens de aeróbios mesófilos.

MATERIAL E MÉTODOS

Contagem e isolamento das cepas

Foram coletadas 18 amostras de leite cru refrigerado de diferentes propriedades rurais da região de Castro no estado do Paraná, entre o período de novembro de 2013 a maio de 2014. As amostras foram transportadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde procedeu-se as análises em até 6 horas após a coleta.

Diluições decimais seriadas foram preparadas e alíquotas de 1 mL foram semeadas em Petrifilm ACTM (3M Microbiology, St.Paul, MN) e incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas conforme orientação do fabricante. Todas as cepas foram repicadas para ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA) suplementado (9:1) com solução leite em pó desnatado reconstituído (10%) e para ágar tributirina (Himedia, Mumbai, India) suplementado (99:1) com tributirina (Himedia, Mumbai, India). As placas foram incubadas 32°C por 48 horas para verificação da atividade proteolítica e lipolítica, respectivamente (BEERENS; LUQUET, 1990; HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007).

Para as cepas que apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica, realizou-se a caracterização morfo-colorimétrica pela coloração de Gram (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). As culturas de trabalho foram mantidas em caldo BHI (Acumedia, Baltimore, USA) com 25% Glicerol a -20°C para análises moleculares.

Extração do DNA e amplificação do gene 16 rRNA

Para extração foi utilizada a técnica da fervura de acordo com Ribeiro Júnior et al. (2016), que consistiu em suspender 1 mL do caldo de cultura em tubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase e RNase, pirogênico e centrifugados a 14.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de TE [Tris-HCl (10MM): EDTA (1mM)] ao precipitado de células bacterianas, e em seguida ressuspendeu-se em vortex. Os tubos permaneceram por 15min em banho de ebulição. Posteriormente, submeteu-se os tubos a banho de gelo pelo mesmo período. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 5 min a 4°C e o sobrenadante recolhido (100 µL) e transferido para microtubo estéril e estocado a -20°C.

A amplificação parcial do gene 16S rRNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada utilizando-se os *primers* 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT), descritos por Osborne et al. (2005). A reação foi realizada com 1 µL de amostra (50 ng/mL), 39 µL de água ultrapura esterilizada; 1 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹ de cada base nitrogenada); 5 µL de tampão 10X; 1,5 µL de MgCl₂ (50 mmol L⁻¹); 1µL de cada primer (27 F e 1492 R na concentração de 20 pmol µL⁻¹); 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), com volume final de 50 µL, e realizada em termocilador (Aeris™ Thermal Cycler, Esco® Micro Pte, Singapore) utilizando-se desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Young et al. (1991) com modificações.

Para visualização do resultado da PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e submetidas por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e a imagem capturada em transiluminador UV.

Restrição enzimática e agrupamento

Utilizou-se a análise de RFLP para definir os grupos genéticos entre as cepas isoladas e facilitar a escolha dos exemplares para sequenciamento. Para isso, foram selecionadas duas enzimas de restrição, Cfo I (Promega) e Taq I (Ludwig) utilizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Para Cfo I foi preparado um mix constituído por 18µL da enzima, 18 µL de solução tampão e 144 µL de água milli-Q. A reação foi preparada em um microtubo, com 4 µL do DNA amplificado de cada bactéria e 4µL do mix preparado. A reação foi realizada no termociclador

(Aeris™ Thermal Cycler, Esco® Micro Pte, Singapore), utilizando-se 37°C por 15 minutos e 65°C por 20 minutos.

Quanto a enzima Taq I, foi preparado um mix constituído por 9 µl da enzima, 18 µl de solução tampão e 123 µl de água milli-Q. O preparo da reação foi o mesmo utilizado para a enzima Cfo I, utilizando-se 65°C por 15 minutos e 80°C por 20 minutos. Decorrido este processo, as amostras foram corridas em gel de agarose 2,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm². Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e as imagens capturadas em transiluminador UV.

As imagens capturadas pelo sistema de foto-documentação foram analisadas no programa de bioinformática BioNumerics 7.5 (Applied Maths NV, Sint – Martens – Latem, Bélgica) e os parâmetros de similaridade foram avaliados utilizando o coeficiente Dice com tolerância de 10% pelo método de UPGMA para análise dos *clusters*. Os isolados que apresentaram similaridade mínima entre 80% - 85% foram considerados como pertencentes a um mesmo grupo genético, gerando um dendograma. A seleção do representante de cada grupo deu-se a partir da melhor qualidade de banda verificada nas imagens da PCR das cepas.

Sequenciamento de DNA

A purificação do produto da PCR foi realizada por meio do Kit de purificação *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e para quantificação de DNA, utilizou-se o *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

Para sequenciamento do gene rRNA dos isolados de mesófilos com capacidade deteriorante, utilizou-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em sequenciador automático pelo método de Sanger (ABI 3500. Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com os *primers* 27F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (OSBORNE et al., 2005) com produto de 1400 pb.

A qualidade das sequências foi avaliada através do eletroferograma gerado pelo software BioEdit (Ibis Bio-sciences, Carlsbad, CA, USA). As sequências foram comparadas com o banco de dados do GeneBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para busca de similaridades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de microrganismos mesófilos do leite cru refrigerado variaram de 2,83 log UFC/mL a 4,81 log UFC/mL (Tabela 1). A IN 62 estabelece 5,47 log UFC/mL ($3,0 \times 10^5$ UFC/ml) como máximo permitido para contagem bacteriana total (CBT) do leite cru refrigerado (BRASIL, 2011). Foram obtidas 172 cepas com atividade proteolítica e/ou lipolítica, onde 66 (38%) apresentaram atividade proteolítica, 57 (33%) ambas atividades e 49 (29%) apenas atividade lipolítica. Bactérias Gram-positivas corresponderam 83,72% do total de cepas e 16,28% foram Gram-negativas (Figura 1).

A amplificação do gene 16S rRNA através da PCR e a análise de RFLP permitiu agrupar as 172 cepas em 16 grupos distintos. O Sequenciamento *Sanger* possibilitou a identificação de 13 cepas, onde todas apresentaram percentual de identidade de 100% a partir da comparação com outras sequencias depositadas no banco de dados do GenBank (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação genética das cepas mesofílicas com capacidade deteriorante isoladas do leite cru refrigerado de propriedades centro-orientais do Paraná, no período de novembro de 2013 a maio de 2014.

Bactérias n(%)	Cepas por Grupo n(%)	Identidade (%)	Cepa similar n° de acesso GenBank
Gram negativo – 28 (16,28%)			
<i>Acinetobacter sp.</i>	20 (11,62)	100%	KR028443
ni ¹	5 (2,90)	-	-
ni ¹	3 (1,74)	-	-
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	2 (1,16)	100%	KY078821
Gram positivo – 144 (83,72%)			
<i>Lactococcus garvieae</i>	43 (25)	100%	KX880958
<i>Enterococcus faecalis</i>	26 (15,11)	100%	LC012005
<i>Streptococcus dysgalactae</i>	13 (7,55)	100%	KU255012
<i>Staphylococcus simulans</i>	12 (6,97)	100%	KP059117
<i>Streptococcus uberis</i>	10 (5,81)	100%	KX792218
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (5,23)	100%	JQ511571
<i>Kurthia gibsonii</i>	9 (5,23)	100%	KT260410
<i>Bacillus licheniformis</i>	8 (4,65)	100%	EF203098
<i>Rothia terrae</i>	7 (4,06)	100%	LN589722
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	3 (1,74)	100%	KJ783395
<i>Bacillus sp.</i>	1 (0,58)	100%	KX981315
ni ¹	1 (0,58)	-	-
Total	172 (100)		

¹Não foi possível a identificação da cepa isolada (ni)

A representação da percentagem das cepas que compõe a microbiota mesofílica deteriorante mostra que o *Lactococcus garvieae* representou 25% do total de cepas mesofílicas

isoladas, seguida por *Enterococcus faecalis* com 15,11% e *Acinetobacter* sp. com 11,62%. *Streptococcus dysgalactae* e o *Streptococcus uberis* representaram 7,55% e 5,81 respectivamente. E o gênero dos *Staphylococcus* spp e *Bacillus* spp somaram 13,94% e 5,23 do total de cepas isoladas, respectivamente.

A identificação da microbiota mesofílica deteriorante do leite cru refrigerado permitiu agrupar as cepas em diferentes grupos sendo possível verificar a proporção de cada uma juntamente com a caracterização da atividade deteriorante (Figura 1).

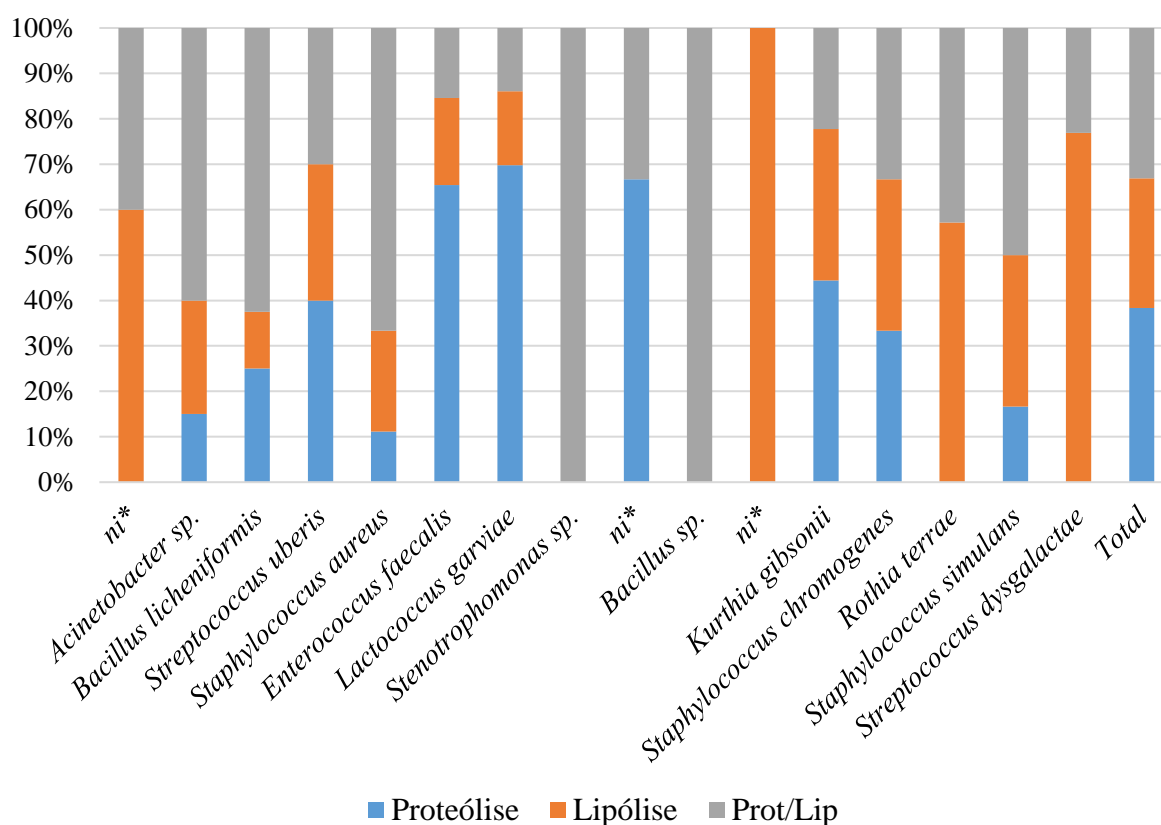


Figura 1. Distribuição e percentual das atividades proteolíticas e/ou lipolíticas de cepas mesofílicas isoladas de leite cru refrigerado da região de Castro-PR.

Observa-se que os gêneros *Lactococcus* sp. *Enterococcus* sp. foram os maiores representantes da microbiota neste estudo (Tabela 1). Estes dois gêneros fazem do grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e a sua alta predominância no leite indica um produto de excelente qualidade, além de exercerem funções importantes no leite, principalmente em produtos fermentados (CASALTA; MONTEL, 2008).

As BAL constituem parte da microbiota autóctone presente no leite cru e seus derivados (FRANCIOSI et al., 2009) e são capazes de produzirem além de ácido orgânicos,

principalmente o ácido láctico, outras substâncias com potencial antimicrobiano, como o peróxido de hidrogênio, diacetil, CO₂ e bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006). Por serem os principais produtores de ácido láctico, suas espécies são utilizadas como culturas iniciadoras (*starters*) na produção de queijos, e também são os principais responsáveis pelo aroma e sabor dos queijos (DI CAGNO et al., 2010; RANDAZZO et al., 2007).

O gênero *Lactococcus* spp. compreende 11 espécies e subespécies, sendo o *Lactococcus lactis* a espécie mais importante utilizada como cultura *starter* na produção de derivados lácteos (ZHANG, CAI, 2014). Recentemente, estudos tem demonstrado a presença de diferentes espécies, como o *Lactococcus garvieae* integrante da microbiota de queijos artesanais (QUIGLEY et al., 2011), e que também tem demonstrado papel importante nas características sensoriais desses queijos (FORTINA et al., 2007). Embora, ainda seja correlacionada como um patógeno emergente é uma espécie potencialmente produtora de bacteriocina, a gaviacin (VILLANI et al., 2001). No presente estudo, o *Lactococcus garvieae*, apresentou em sua maioria atividade proteolítica, onde, das 43 cepas isoladas, 30 (70%) apresentaram atividade proteolítica, 7 (16%) atividade lipolítica e 6 (14%) ambas atividades.

Os *Enterococcus* spp. constituem grande porção da microbiota autóctone do trato gastrointestinal dos mamíferos. Embora sua origem seja fecal, uma vez presente no ambiente, este gênero é capaz de sobreviver à diferentes condições ambientais, colonizando solo, plantas, leite e carne, podendo contaminar até mesmo produtos processados (GIRAFFA et al., 2003). Apesar de sua prevalência estar associada a condições insatisfatórias de higiene durante a produção e o processamento do leite, sua presença pode não estar diretamente associada à contaminação fecal, mas sim, pela água e equipamentos contaminados (AQUILANTI et al., 2006; HUI, 2007). Por outro lado, a presença deste gênero pode ser considerada positiva, por apresentar características tecnológicas importantes na produção de queijos maturados e ser utilizado como cultura *starter* naturalmente presente no leite (GIRAFFA, 2003). Das 26 cepas de *Enterococcus faecalis* 17 (65%) apresentaram atividade proteolítica, 5 (19%) lipolítica e 4 (15%) as duas atividades.

A quantidade de cepas do gênero *Staphylococcus* sp. representando a microbiota mesofílica do presente estudo também foi significativa. Tem sido comumente relatada como integrante da microbiota deteriorante do leite (ARCURI et al., 2008; VERDIER-METZ et al., 2009; RAATS et al., 2011). A espécie *Staphylococcus aureus* é o microrganismo de maior interesse para a indústria leiteira, pois é o agente mais frequente causador de mastite bovina e patógenos alimentares de grande importância (QUIGLEY et al., 2011). O gênero *Staphylococcus* spp apresentou em sua maioria ambas atividades proteolíticas e lipolíticas.

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* spp são patogênicas, como o *Streptococcus uberis* e o *Streptococcus dysgalactae*, onde apresentaram percentagem significativa na composição da microbiota mesofílica. Estes microrganismos fazem parte dos principais agentes causadores de mastite ambiental, e geralmente estão relacionadas com mastite subclínica (ZHAO; LACASSE, 2008). A bactéria *Streptococcus dysgalactae* é comumente isolada do leite de vacas com mastite (SCHUKKEN et al., 2013). Do total de 13 cepas isoladas dessa bactéria, 10 (77%) apresentaram atividade lipolítica e 3 (33%) apresentaram tanto a atividade lipolítica como proteolítica, já para o *Streptococcus uberis*, do total de 10 cepas, 4 (40%) apresentaram atividade proteolítica, 3 (30%) apresentaram atividade lipolítica e 3 (30%) ambas atividades.

O principal gênero conhecido pela capacidade deteriorante no presente estudo foi o *Acinetobacter*. Espécies do gênero *Acinetobacter* tem sido frequentemente isolada do leite cru refrigerado e caracterizadas pelo grande potencial deteriorante e psicrotrófico. Espécies desse gênero são encontradas no ambiente de ordenha, superfície dos tetos, feno, ar e solo (QUIGLEY et al., 2013). Do total de cepas isoladas, 12 (60%) apresentaram atividade proteolítica e lipolítica, enquanto 5 (25%) apresentaram atividade lipolítica e 3 (15%) atividade proteolítica.

Espécies do gênero *Bacillus* sp. estão amplamente distribuídas no ambiente, sobretudo em matérias secas como feno, silagem, concentrado e nas fezes, e são facilmente encontradas em toda a cadeia do leite (MATTA, PUNJ, 1999). Boa parte das bactérias do gênero *Bacillus* apresentam esporos e podem resistir ao processamento térmico permanecendo no leite e nos equipamentos da indústria de laticínios, recontaminando o leite durante seu processamento (MURPHY et al., 1999). O *Bacillus licheniformis* é a espécie de bactéria esporulada aeróbia mais frequentemente isolada do leite cru (REGINENSI et al., 2011; YUAN et al., 2012; BUEHNER et al., 2014). No presente trabalho, das 8 cepas de *Bacillus licheniformis* encontradas 5 (63%) apresentaram atividade proteolítica e lipolítica, sendo 2 (25%) apenas para atividade proteolítica e 1 (13%) somente lipolítica.

O avanço das técnicas moleculares na microbiologia de alimentos, têm permitido conhecer a microbiota que compõe o leite cru e identificar espécies que até então não haviam sido relatadas como integrantes da microbiota do leite cru. *Rothia terrae* é uma das sete espécies conhecidas pertencentes ao gênero *Rothia* (XIONG et al., 2013) e foi primeiramente relatada por Chou et al. (2008), isolada do solo em Taiwan. Espécies deste gênero tem sido descrita como microrganismos termodúricos isolados de soro de leite (WALSH et al., 2012), leite cru (GIANNINO et al., 2009; MASOUD et al., 2012) e como parte da microbiota do queijo Domiati (EL-BARADEI et al., 2007). No entanto, não foram encontrados relatos sobre sua capacidade

deteriorante no leite cru, sendo essa a primeira descrição. No presente estudo, a atividade lipolítica foi a mais predominante entre as cepas (57%).

Da mesma forma, outros estudos já descreveram sobre as espécies do gênero *Kurthia spp.* como parte da microbiota deteriorante isolada de carnes e embutidos (PIN; BARANYI, 1998), porém o potencial deteriorante da *Kurthia gibsonii* no leite cru ainda não tinha sido relatada. Esta bactéria já foi isolada do leite cru (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; MASOUD et al., 2012) e de vacas com mastite (TÜRKYILMAZ et al., 2010). Sua atividade deteriorante que mais se destacou foi a proteolítica (44%).

O gênero *Stenotrophomonas sp* já foi isolado do leite cru e é reconhecido por sua capacidade deteriorante (RAATS et al., 2011; ARCURI et al., 2012; PINTO et al., 2015), onde se destacou apresentando ambas atividades. Embora a percentagem do gênero *Stenotrophomonas sp.* tenha sido baixa (1,16%), sua presença no leite cru é uma preocupação devido a sua resistência a antibióticos. Entre as espécies deste gênero a *Stenotrophomonas maltophilia* se destaca por ser um patógeno emergente que tem demonstrado resistência a diferentes antimicrobianos, além disso, esta bactéria também tem capacidade de formar biofilmes no ambiente industrial (NICODEMO et al., 2004; CLETO et al., 2012).

CONCLUSÃO

A baixa contagem de microrganismo mesófilos e a alta predominância de bactérias ácido lácticas, ressalta a boa qualidade da produção leiteira nessa região. Em relação a atividade deteriorante, a proteolítica foi predominante.

Os gêneros predominantes como constituintes da microbiota mesofílica deteriorante foram os *Lactococcus sp.* e os *Enterococcus sp.*, representando a microbiota desejável do leite. Já os gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*, conhecidos por serem os principais deteriorantes do leite cru foram encontrados em pequenas quantidades indicando que o leite é obtido em boas condições de higiene, e que, reflete o aumento da vida útil do leite pasteurizado e derivados lácteos de qualidade.

A utilização de ferramentas moleculares permitiu a identificação dos gêneros *Rothia sp.* e *Kurthia sp.*, novas espécies como microbiota mesofílica integrante do leite cru.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUILANTI, L., DELL'AQUILA, L., ZANNINI, E., ZOCCHETTI, A., CLEMENTI, F. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. **Letters in applied microbiology**, v.43, n.2, 161-167, 2006.
- ARCURI, E. F., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., PINTO, S. M., ÂNGELO, F. F., & SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ARCURI, E. F., SILVA, P. D., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., LANGE, C. C., & MAGALHÃES, M. D. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.
- BABALOLA, O. O. Molecular techniques: an overview of methods for the detection of bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.710–713, 2003.
- BEERENS, H., LUQUET, F.M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A. 141p. 1990.
- BRASIL. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 31 dez. 2011.
- BRAUN, P. e K. FEHLHABER. Combined effect of temperature, aw, and pH on enzymatic activity of spoilage causing bacteria. **Milchwissenschaft**, v.57, n.3, p.134-136, 2002.
- BUEHNER, K. P., ANAND, S., GARCIA, A. Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 midwest dairy farms. **Journal of Dairy Science** 97, 6777-6784, 2014.
- CASALTA, E., MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactococcus genus. **International journal of food microbiology**, v.126, n.3, p.271-273, 2008.
- CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In. ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. New York: Wiley-Interscience, 2002.
- CHOU, Y.J., CHOU, J.H., LIN, K.Y., LIN, M. C., WEI, Y.H., ARUN, A.B., YOUNG, C.C., CHEN, W.M. *Rothia terrae* sp. nov. isolated from soil in Taiwan. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.58, n.1., p.84–88, 2008.
- CLAESSON, M.J.; WANG, Q.; O’SULLIVAN, O.; GREENE-DINIZ, R.; COLE, J.R.; ROSS, R.P.; O’TOOLE, P.W. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 1-13, 2010.
- CLETO, S., MATOS, S., KLUSKENS, L., VIEIRA, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e40189, 2012.
- COPPOLA, S., BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D. Dairy products. In: Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.), **Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods**. Springer, New York, pp. 31–90, 2008.

- COUTINHO, H., OLIVEIRA, V. D., MANFIO, G., ROSADO, A. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 71, p. 491 – 503, 1999.
- DEEGAN, L. C, COTTER P. D, HILL C, ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, v.16, n.9, p.1058-1071, 2006.
- DELBÈS, C., ALI-MANDJEE, L., MONTEL, M. C. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and-independent 16S rRNA gene-based analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p.1882-1891, 2007.
- DI CAGNO, R., DE PASQUALE, I., DE ANGELIS, M., CALASSO, M.P., BUCHIN, S., GOBBETTI, M. Contribution of selected adjunct or attenuated non-starter lactobacilli to ripening of Italian caciotta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 65, n.3, p.189–191, 2010.
- EL-BARADEI, G., DELACROIX-BUCHET, A., OGIER, J.C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n. 4, p.1248–1255, 2007.
- FOLEY, S. L., LYNNE A. M., NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.4, p.430–440, 2009.
- FORTINA, M. G., RICCI, G., FOSCHINO, R., PICOZZI, C., DOLCI, P., ZEPPA, G., MANACHINI, P. L. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.2, p.445-453, 2007.
- FRANCIOSI, E., SETTANNI, L., CAVAZZA, A., POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.
- GANDRA, E. Á., GANDRA, T. K. V., DE MELLO, W. S., DA SILVA GODOI, H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2008.
- GIANNINO, M.L., MARZOTTO, M., DELLAGLIO, F., FELIGINI, M. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. **International journal of food microbiology**, v.130, n. 3, p.188–195, 2009.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, n.2, p.215–222, 2003.
- HANTSIS-ZACHAROV, E., HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, n. 22, p.7162-7168, 2007.
- HUI, Y. H. Handbook of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood, and Vegetables, 2007, pp. 1221.
- JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v.45, n.9, p.2761-2764, 2007.

- JUNQUEIRA, J., CARNEIRO, L. C. **Biologia Celular e Molecular** (9ª ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 302, 2012.
- LAFARGE, V., OGIER, J. C., GIRARD, V., MALADEN, V., LEVEAU, J. Y., GRUSS, A., DELACROIX-BUCHET, A. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5644-5650, 2004.
- MARIN, V. A. LEMOS, A. A. D., FREITAS, E. I. D. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.
- MASOUD, W., VOGENSEN, F. K., LILLEVANG, S., AL-SOUD, W. A., SØRENSEN, S. J., JAKOBSEN, M. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.1, p.192-202, 2012.
- MATTA, H., PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.2, p.59-62, 1999.
- MICHEL, V., A. HAUWUY, AND J. F. CHAMBA. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. **Le Lait**, v.81, n.5, p.575-592, 2001.
- MURPHY, P. M., LYNCH, D., KELLY, P. M. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.2, p.45-50, 1999.
- NICODEMO, A.C., ARAUJO, M.R.E., RUIZ, A.S., GALES, A.C. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.4, p.604-608, 2004
- OLIVE, D. M., BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.
- OSBORNE, C. A., GALIC, M., SANGWAN, P., JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**. v.248, p.183-187, 2005.
- PIN, C., BARANYI, J. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 59-72, 1998.
- PINTO, C. L. O., MACHADO, S. G., MARTINS, M. L., VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.70, n.2, p.105-116, 2015.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International journal of food microbiology**, v.150, n.2, p.81-94, 2011.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **FEMS microbiology reviews**, v.37, n.5, p.664-698, 2013.

- RAATS, D., OFFEK, M., MINZ, D., HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v.28, n.3, p.465-471, 2011.
- RANDAZZO, C.L., DE LUCA, S., TODARO, A., RESTUCCIA, C., LANZA, C.M., SPAGNA, G., CAGGIA, C.. Preliminary characterization of wild lactic acid bacteria and their abilities to produce flavour compounds in ripened model cheese system. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.2, p.427-435, 2007.
- REGINENSI, S. M., GONZÁLEZ, M. J., OLIVERA, J. A., SOSA, M., JULIANO, P., BERMÚDEZ, J. RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.148, n.1, p.36-41, 2011.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C., TAMANINI, R., SOARES, B. F., DE OLIVEIRA, A. M., DE GODOI SILVA, F., DA SILVA, F. F., AUGUSTO, N. A., BELOTI, V. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.22, n. 2, p. 145-154, 2001.
- SCHUKKEN, Y. H., ZURAKOWSKI, M. J., RAUCH, B. J., GROSS, B., TIKOFSKY, L. L., & WELCOME, F. L. Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. **Journal of dairy science**, v.96, n.10, 6763-6774, 2013.
- SPERBER, W. H., DOYLE, M. P. Compendium of the microbiological spoilage of food and beverages. New York, NY, USA: Springer, 2009. 374 pp.
- TÜRKYILMAZ, S., YILDIZÖ, O., KAYNARCA, S., & BOZDOĞAN, B. (2010). Molecular identification of bacteria isolated from dairy herds with mastitis. **The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas**, v.16, p.1025-1032, 2010.
- VERDIER-METZ, I., MICHEL, V., DELBES, C., MONTEL, M. C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? **Food Microbiology**, v.26, n.3, p.305-310, 2009.
- VILLANI, F., APONTE, M., BLAIOTTA, G., MAURIELLO, G., PEPE, O., MOSCHETTI, G. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, n.3, p.430-439, 2001.
- WALSH, C., MEADE, J., MCGILL, K., FANNING, S. The biodiversity of thermotolerant bacteria isolated from whey. **Journal of Food Safety**, v 32, n. 2, p.255-261, 2012.
- XIONG, Z.J., ZHANG, J.L., ZHANG, D.-F., ZHOU, Z.L., LIU, M.J., ZHU, W.Y., ZHAO, L.X., XU, L.H., LI, W.J. *Rothia endophytica* sp. nov., an actinobacterium isolated from *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n.11, p. 3964-3969, 2013.
- YOUNG, J. M., KUYKENDALL, L. D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A., SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie

et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2001.

YUAN, D. D., LIU, G. C., REN, D. Y., ZHANG, D., ZHAO, L., KAN, C. P., YANG, Y. Z., MA, W., LI, Y., ZHANG, L. B. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control** 25, 752-757, 2012.

ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, 2014.

ZHAO, X., LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of animal science**, v.86, n.13, p.57-65, 2008.

5. CONCLUSÃO

- A microbiota mesofílica do leite cru refrigerado apresentou baixas contagens e atividade proteolítica foi predominante.
- Houve predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* na microbiota mesofílica do leite cru refrigerado, sendo caracterizado por uma maior população de bactérias ácido lácticas.
- As principais bactérias deteriorantes identificadas, apresentaram baixos índices como constituinte da microbiota mesofílica, indicando que este leite sofrerá baixa deterioração.
- Houve diversidade de gêneros e de espécies na microbiota mesofílica que compõe o leite cru refrigerado, contemplando bactérias ainda não relatadas como deteriorantes do leite cru.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (\log_{10} UFC/mL) de 18 amostras de leite cru refrigerado coletados na região centro oriental paranaense, entre o período de novembro de 2013 a maio de 2014.

Amostra	Contagem (\log_{10}) total de aeróbios mesófilos
1	2,833
2	3,322
3	3,924
4	3,230
5	3,462
6	3,204
7	3,176
8	3,531
9	3,230
10	4,158
11	3,863
12	3,724
13	3,699
14	4,806
15	3,724
16	3,447
17	3,398
18	3,653
Média, UFC/mL	3,58
Mínimo, UFC/mL	2,83
Máximo, UFC/mL	4,81
C.V., %	12,04

APÊNDICE B

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE NOVOS MÉTODOS PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE

RESUMO

Frequentemente o leite tem sido alvo de notícias sobre fraudes. Os motivos das fraudes são diversos, mas o principal fator é o econômico, cujo objetivo é aumentar o volume e controlar as alterações provocadas pelos microrganismos. A adição substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil. O formol é altamente tóxico ao ser ingerido, pois promove mutação em células sadias transformando-as em carcinogênicas. A técnica oficial no Brasil para a detecção de formol no leite exige sua destilação, que é demorada e laboriosa, dificultando sua execução na recepção do leite. Oferecer às indústrias de laticínios, metodologia simples, rápida, sensível e barata para identificação de formol no leite tem sido um desafio. Diante disso, o presente trabalho descreve a invenção de novos processos para detecção de formol no leite, acompanhados de um Kit, que permitem triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução. Foram realizados simultaneamente quatro testes, entre eles o teste oficial de acordo com a IN 68, teste utilizando floroglucina e os dois novos métodos testados. Para a verificação da sensibilidade, foram utilizadas amostras de leite cru, adulteradas com as seguintes concentrações de formaldeído: 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1% e o controle negativo, sendo realizadas 7 repetições em triplicata, por 7 analistas distintos e em 3 laboratórios. Para a verificação da especificidade, foram realizadas adulterações com diversas substâncias conhecidas para este fim. E ainda foram testadas 120 amostras comerciais de leite pasteurizado para verificar a eficácia dos métodos testados. Os resultados revelaram alta sensibilidade, especificidade e confiabilidade dos novos métodos testados.

Palavras-chave: Formol, Leite adulterado, Conservantes, Método, Legislação.

ABSTRACT

Milk has been the target of news of fraud. The reasons to frauds milk are diverse, but the main factor is the economic one, whose objective is to increase the volume and control the alterations provoked by the microorganisms. The addition of preservative substances, such as formaldehyde, is a fraud whose main objective is the reduction or elimination of microorganisms present in milk, preventing the changes arising from its multiplication and increasing its shelf life. Formaldehyde is highly toxic when ingested, as it promotes mutation in healthy cells and turns them into carcinogens. The official technique in Brazil for the detection of formaldehyde in milk requires distillation, which is time consuming and laborious, making it difficult to perform in milk reception of the industry. Providing the dairy industry with a simple, rapid, sensitive and inexpensive method for identifying formaldehyde in milk has been a challenge. Therefore, the present work describes the invention of new techniques for detection of formaldehyde in milk, accompanied by a Kit, which allows to triage all the milk received by the industries, with low cost and ease in the execution. Four tests were performed simultaneously, among them the official test according to IN 68, test using floroglucine and the two new methods. To verify the sensitivity, samples of raw milk, adulterated with the following concentrations of formaldehyde were used: 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1% and negative control, with 7 replicates being performed in Triplicate, by 7 different analysts and in 3 laboratories. For the verification of specificity, adulterations with various substances known for this purpose were carried out. And 120 commercial samples of pasteurized milk were tested to verify de efficiency of the methods. The results revealed high sensitivity, specificity and reliability of the new methods tested.

Keywords: Formaldehyde, Adulterated milk, Preservatives, Method, Legislation

INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os cinco maiores produtores de leite do mundo, contribuindo com 6% da produção mundial. Porém, cerca de 30% do produto comercializado vem de produção não inspecionada, o que representa um dos problemas frente a segurança e a qualidade do leite (SIQUEIRA et al., 2013; IBGE, 2016).

Nos últimos anos, o leite tem sido alvo de notícias sobre fraudes. O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) considera fraudado o leite que: for adicionado de água, substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; sofrer subtração de qualquer dos seus componentes; estiver cru e for vendido como pasteurizado ou for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 1997).

O controle diário do leite recebido pela indústria deve contemplar a realização de análises físico-químicas, microbiológicas, pesquisa de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e de inibidores do crescimento microbiano (BRASIL, 2011). Contudo, a grande maioria das indústrias não realiza pesquisa específica de todas substâncias devido à demora e a dificuldade na realização de algumas provas.

A adição de substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil (BELOTI, 2015).

O formol é altamente tóxico ao ser ingerido, inalado ou em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea, pois promove mutação em células sadias transformando-as em carcinogênicas (INCA, 2015). Por este motivo, esta substância foi proibida em vários setores, como o de beleza, cosmético e alimentício. E, nos setores em que é ainda utilizada, existe um limite legal de exposição do formol, o qual se não obedecido pode levar a efeitos prejudiciais à saúde, além de multas às empresas (ANVISA, 2005; 2013).

A técnica oficial no Brasil para a detecção de formol no leite, descrita pela instrução normativa N°68 de 2006, exige a destilação do leite, que torna a técnica demorada e laboriosa, dificultando sua execução na recepção do leite (BRASIL, 2006). O tempo de destilação por amostra é de aproximadamente 2 horas, sem contar o tempo de limpeza e secagem das vidrarias do sistema destilador (SILVA, 2013).

Oferecer às indústrias de laticínios, metodologia simples, rápida, sensível e barata para identificação de formol no leite tem sido um desafio. Diante disso, o presente estudo descreve um processo para detecção de formol no leite, acompanhado de um Kit, que permite triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução. Assim, é possível

que a indústria de laticínios tenha provas que permitam a detecção de resíduos de formol com maior facilidade, velocidade e menor custo, permitindo o rastreamento de todo o leite recebido pela indústria

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas análises simultâneas e comparativas entre três métodos que detectam qualitativamente formaldeído no leite, sendo dois deles testes já sabidamente utilizados para este fim, como o método oficial de acordo com a Instrução Normativa N°68 (BRASIL, 2006) e o método da floroglucina (BRASIL, 1981) e um terceiro teste resultante de estudos envolvendo um novo reagente para a detecção rápida e com alta sensibilidade do formaldeído no leite.

Os testes de sensibilidade e efeito residual foram desenvolvidos no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), com a participação do Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA) e do Laboratório de Toxicologia Animal (TOXIVET), ambos na Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná.

Para a verificação da sensibilidade de cada teste foram utilizadas amostras de leite cru refrigerado, obtidas no setor de bovinocultura leiteira da Fazenda Escola da UEL, isento de substâncias estranhas e dentro dos parâmetros estabelecidos para a Instrução Normativa N°62.

Utilizou-se cinco alíquotas de 600 mL e cada uma fraudada com as seguintes concentrações de formol: 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% e 0,1% e uma alíquota de 600 mL sem adição de formol, para controle negativo. O volume de formol adicionado ao leite foi obtido por meio da fórmula: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, onde: C_1 = concentração inicial, V_1 = volume inicial, C_2 = concentração final e V_2 = volume final.

Para cada diluição realizou-se análises em triplicata, e visando avaliar o poder residual do formaldeído também foram realizados os testes após 24 horas e 48 horas da mesma amostra acondicionada e refrigerada a 7°C. Realizou-se 7 repetições do mesmo procedimento, executadas por 7 laboratoristas distintos nos laboratórios LIPOA, DIA e TOXIVET da Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Para verificar a eficiência da prova em amostras comerciais, utilizou-se 120 amostras de leite pasteurizado que chegaram para análise de rotina do laboratório LIPOA, sendo realizados os três testes comparativos em todas as amostras.

Ainda foi testada a especificidade do método, adicionando diversas substâncias mais¹comumente utilizadas como adulterantes do leite, como: sal, açúcar, amido, ureia, álcool, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, para descartar a possibilidade de interferência ou reações cruzadas. Todas as substâncias foram testadas nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 1,0%.

MÉTODO OFICIAL (BRASIL, 2006)

Utilizou-se 100 mL de leite, em balão próprio para a destilação, 100 mL de água destilada e 2 mL de ácido fosfórico P. A. Destilou-se, por aproximadamente 1 hora, até o produto destilado chegar a 50 mL. Em um tubo de ensaio adicionou-se 5 mL da solução de ácido cromotrópico a 0,5% em solução de ácido sulfúrico a 72% e 1 mL do destilado e aguardava-se 15 minutos em banho maria. Coloração roxa indicava resultado positivo.

MÉTODO UTILIZANDO REAGENTE FLOROGLUCINA (BRASIL, 1981)

Adicionou-se 10 mL de leite, 1 mL da solução de floroglucina 1% e 2 mL da solução de NaOH 10% e em seguida homogeneizou-se. Obtêm-se resultado positivo pela formação da coloração alaranjada.

NOVO MÉTODO 1 (UTILIZANDO UM REAGENTE) *

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da amostra de leite juntamente com 1 mL do reagente C. Homogeneizou-se a amostra, aguardando aproximadamente 5 minutos. Rações positivas observa-se a coloração amarela e para negativas a coloração branca (do leite).

NOVO MÉTODO 2 (UTILIZANDO DOIS REAGENTES) *

Em um béquer a amostra de leite a ser analisada foi diluída no reagente A na proporção 1:4. Foi adicionado ao tubo de ensaio 1 ml do reagente B, e em seguida, despejou-se lentamente 1 mL da amostra diluída no reagente A. Aguardou-se aproximadamente 5 min, se necessário pode-se homogeneizar cuidadosamente. Para reações positivas obtém-se a coloração roxa e para negativas a coloração marrom/amarelo.

* Os novos métodos testados obtiveram o pedido de depósito de patente aceito pelo INPI, com o número do processo: BR 10 2016 018864 4 e BR 10 2016 018975 6, devido a este fato, os nomes dos reagentes utilizados não foram divulgados nesta publicação.

RESULTADOS

Os resultados da avaliação da sensibilidade dos métodos, com repetições realizadas por 7 laboratoristas e 3 laboratórios distintos, estão apresentados na tabela 1, demonstrando altíssima sensibilidade do novo método testado. Os resultados obtidos pelos 7 laboratoristas foram os mesmos

Tabela 2. Avaliação da sensibilidade do método oficial, método utilizando reagente floroglucina, novo método 1 e novo método 2 em diferentes concentrações de formol em leite.

Concentração Formol (%)	Oficial IN 68 ¹			Floroglucina ²			Novo Método 1			Novo Método 2		
	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₀	T ₄₈	T ₂₄
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,001%	*	*	*	*	*	*	+	+	+	+	+	+
0,005%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Não houve definição de cor perceptível a olho nu; - negativo; + positivo; T₀ 0 horas; T₂₄ após 24 horas; T₄₈ após 48 horas
¹Conforme a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006) e ²BRASIL, 1981

Os novos métodos apresentaram alta especificidade, visto que nenhuma substância utilizada demonstrou interferência nos resultados, tanto positivos quanto negativos. Os resultados obtidos nas 120 amostras de leite pasteurizado, entre os quatro testes comparados foram negativos para a presença de formaldeído, mostrando concordância entre os métodos testados.

Outros estudos também demonstram os mesmos resultados obtidos, onde Mareze et al. em 2015, avaliaram 80 amostras de leite pasteurizado no estado do Paraná e nenhuma apresentou resultado positivo para a presença do conservante em questão utilizando o teste oficial pela instrução normativa N°68. Silva et al. (2013), também pesquisando a presença de formol pelo método oficial (BRASIL, 2006) não encontrou formol em nenhuma das 100 amostras de leite pasteurizado testadas.

CONCLUSÃO

Os novos métodos contemplados com as patentes A e B demonstraram alta sensibilidade e especificidade. Além de apresentarem vantagens por serem rápidos, fáceis e confiáveis, permitem sua utilização como testes de triagem na plataforma de laticínios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA avalia risco da presença de formol e ureia no leite. Informe técnico n° 53. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Escova progressiva, alisantes e formol. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/alisantes/alisante_formol.htm>. Publicação: 18 jul. 2005. Acesso em: 10 dez. 2016.

BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p.6, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n 30.691 de 29 de março de 1952. Alterado pelo Decreto 2244 de 04 de junho de 1997. Altera o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n.105, p. 11555, 05 jun.1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 239, p.8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria n° 01, de 07 de outubro de 1981. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: Métodos Físicos e Químicos. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 13 de outubro de 1981.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Estatística da Pecuária de Produção. 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601_publ_completa.pdf>. Acesso em: 13 de setembro de 2016.

INCA. Formol ou Formaldeído. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Acesso em: 10 dez. 2016.

MAREZE, J., MARIOTO, L. R. M., GONZAGA, N., DANIEL, G. C., TAMANINI, R., BELOTI, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.36, n.1, p.283-290, 2015.

SILVA, L. C. C. **Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A. V.; ALMEIDA, M. F.; SOUZA R. C. S. N. P. O. (2013). Mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/industria-leitera/artigos/mercado-lacteo-brasileiro-contexto-t1392/472-p0.htm>>. Acesso em: 7 mai. 2016.

**PEDIDO PATENTE A**

16/08/2016 870160044161

14:40



00.000.2.2.16.0605881.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 018864 4

DADOS DO DEPOSITANTE (71)

DEPOSITANTE 1 DE 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 78640489000153
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO
Cidade: Londrina
Estado: PR
CEP: 86055-900
País: Brasil
Telefone: (043) 3371-5812
Fax: (043) 3371-5812
Email: aintecpi@uel.br

DEPOSITANTE 2 DE 2

Nome ou Razão Social: LONDRILAB COMÉRCIO DE PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS LTDA - EPP
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 19946793000164
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei
Endereço: Av. Inglaterra, 385, Loja 22
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 3064-0471
Email: trainotti@sercomtel.com.br

DADOS DO PEDIDO

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): **PROCESSO E KIT PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE UTILIZANDO UM REAGENTE**

Resumo: Campo de aplicação: indústrias de laticínios e de alimentos. A adição substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil. A presente invenção descreve um processo para detecção de formol no leite, através de um reagente, acompanhado de um Kit que permite triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução.

DADOS DO INVENTOR (72)

INVENTOR 1 DE 6

Nome: VANERLI BELOTI
CPF: 53098382953
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Quatá, 778
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 3371-5812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 2 DE 6

Nome: JULIANA MAREZE
CPF: 04406993983
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista
Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 3371-5812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 3 DE 6

Nome: LYCIO SHINJI WATANABE
CPF: 36142261829
Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Rua Pedro Marcos Prado, 320

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 3371-5812

Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 4 DE 6

Nome: NATALIA GONZAGA

CPF: 07299241900

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 3371-5812

Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 5 DE 6

Nome: RONALDO TAMANINI

CPF: 05222032990

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista

Endereço: Rua Silvio Bussador, 139

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 3371-5812

Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 6 DE 6

Nome: SUZANA LUCY NIXDORF

CPF: 53564014934

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Voluntários da Pátria, 900

Cidade: Londrina Estado: PR

País: BRASIL

Telefone: (43) 3371-5812

Email: aintecpi@uel.br

PEDIDO PATENTE B

17/08/2016 870160044503

11:10



00.000.2.2.16.0606026.5

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição
de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 018975 6

DADOS DO DEPOSITANTE (71)

DEPOSITANTE 1 DE 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371-5812

Fax: (043) 3371-5812

Email: aintecpi@uel.br

DEPOSITANTE 2 DE 2

Nome ou Razão Social: LONDRILAB COMÉRCIO DE PRODUTOS MICROBIOLÓGICOS LTDA -
EPP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 19946793000164

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Empresa de Pequeno Porte assim definidas em lei

Endereço: Av. Inglaterra, 385, Loja 22

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86046-000

País: BRASIL

Telefone: (43) 3064-0471

Email: trainotti@sercomtel.com.br

DADOS DO PEDIDO

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): **PROCESSO E KIT PARA A DETECÇÃO RÁPIDA DE FORMALDEÍDO EM LEITE UTILIZANDO 2 REAGENTES**

Resumo: Campo de aplicação: indústrias de laticínios e de alimentos. A adição substâncias conservantes, como o formol, é uma fraude que tem como objetivo principal a redução ou eliminação de microrganismos presentes no leite, prevenindo as alterações decorrentes de sua multiplicação e aumentando sua vida útil. A presente invenção descreve um processo para detecção de formol no leite, através de ácido sulfúrico, sem a utilização de solução de cloreto férrico e sem a necessidade de aquecimento, acompanhado de um Kit que permite triar todo o leite recebido pelas indústrias, com baixo custo e facilidade na execução.

DADOS DO INVENTOR (72)

INVENTOR 1 DE 6

Nome: VANERLI BELOTI
CPF: 53098382953
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Quatá, 778
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 2 DE 6

Nome: JULIANA MAREZE
CPF: 04406993983
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista
Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 3 DE 6

Nome: NATALIA GONZAGA

CPF: 07299241900
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista
Endereço: Rua Reverendo João Batista Ribeira Neto, 75
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 4 DE 6

Nome: RONALDO TAMANINI
CPF: 05222032990
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Veterinário, patologista (veterinário) e zootecnista
Endereço: Rua Silvio Bussador, 139
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 5 DE 6

Nome: SUZANA LUCY NIXDORF
CPF: 53564014934
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Avenida Voluntários da Pátria, 600
Cidade: Londrina Estado: PR
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br

INVENTOR 6 DE 6

Nome: YURI RENAN BOVOLENTA
CPF: 37561675852
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins
Endereço: Rua Albertino Rorato, 285
Cidade: Cândido Mota Estado: SP
País: BRASIL
Telefone: (43) 337 15812
Email: aintecpi@uel.br