

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO  
LEITE E DERIVADOS**

**JHONATAN FARIA DA COSTA**

**ATRIBUTOS DE QUALIDADE ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE  
PROTEÓLISE EM LEITE CRU GRANELIZADO**

**JUIZ DE FORA  
2014**

**JHONATAN FARIA DA COSTA**

**ATRIBUTOS DE QUALIDADE ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE  
PROTEÓLISE EM LEITE CRU GRANELIZADO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Juiz de  
Fora, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado Profissional em Ciência e  
Tecnologia do Leite e Derivados,  
para obtenção do título de “*Mestre*”.

**Orientador:** Prof. Marco Antônio Moreira Furtado

**Co-orientador:** Prof. Maurilio Lopes Martins

**JUIZ DE FORA  
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração  
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Jhonatan Faria da .

Atributos de qualidade associados à ocorrência de proteólise  
em leite cru granelizado / Jhonatan Faria da Costa. -- 2014.  
111 p. : il.

Orientador: Marco Antônio Moreira Furtado

Coorientador: Maurílio Lopes Martins

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal  
de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados,  
2014.

1. proteólise. 2. leite cru. 3. psicrotróficos. 4. tirosina.  
I. Furtado, Marco Antônio Moreira, orient. II. Martins,  
Maurílio Lopes, coorient. III. Título.

**JHONATAN FARIA DA COSTA**

**ATRIBUTOS DE QUALIDADE ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE  
PROTEÓLISE EM LEITE CRU GRANELIZADO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Juiz de  
Fora, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação  
Mestrado Profissional em Ciência e  
Tecnologia do Leite e Derivados,  
para obtenção do título de “*Mestre*”.

Aprovada em: 05 de Junho de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Marco Antônio Moreira Furtado (Orientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Maurilio Lopes Martins (Co-orientador)  
IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba

---

Claudia Lucia de Oliveira Pinto  
Epamig - UREZM

---

Marcio Roberto Silva  
Embrapa - CNPGL

Aos meus pais.  
Aos meus irmãos.  
Aos meus professores.  
Aos meus amigos.  
À Elisângela.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a DEUS, pois se não fosse Ele nada seríamos.

Ao meu pai e minha mãe, João e Gracinha, que não mediram esforços para que eu me dedicasse aos estudos, e por mostrarem a importância do mesmo para o meu futuro.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, especificamente ao Departamento de Farmácia, que por meio de seus professores e funcionários, dedicaram seu tempo e conhecimento para este projeto.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Gado de Leite) e seus colaboradores pelo apoio e colaboração na pesquisa.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que sempre foi uma referência importante no estudo e pesquisa na cadeia produtiva do leite e seus derivados.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Câmpus Rio Pomba, por proporcionar condições e o apoio necessários para os meus estudos.

Ao professor e orientador, Marco Antônio Moreira Furtado, por sua enorme colaboração e dedicação para realização deste projeto, sendo paciente e compreendendo a minha pouca disponibilidade de tempo.

Ao professor e co-orientador, Maurilio Lopes Martins, por ser um grande amigo e compartilhar seus conhecimentos para a conclusão desta pesquisa.

Aos meus grandes amigos de trabalho, estrada e estudos, Joaquim Mário Neiva Lamas e José Alcides Pereira, que proporcionaram e vão proporcionar ainda mais, muitos momentos de alegria e discussão dos conhecimentos adquiridos.

Aos companheiros do Departamento Acadêmico de Ciência e Tecnologia em Alimentos do IF Sudeste de MG – Câmpus Rio Pomba, que puderam compreender e respeitar em determinados momentos o meu comprometimento com os estudos e, principalmente, pelo incentivo e apoio.

Ao Rosélio e Renata, que por muitas vezes puderam suprir minha ausência nos laboratórios, sendo de suma importância para execução do projeto, além de serem companheiros dentro e fora do ambiente de trabalho.

À minha noiva, Elisângela, pelos momentos de companheirismo e apoio, compreendendo a dedicação aos meus estudos.

Ao professor Luiz Carlos do ILCT, que me recebeu de braços abertos em sua disciplina, pois a partir da mesma, pude dar início aos meus estudos no curso de mestrado.

À Solimar Gonçalves Machado, doutoranda do Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV, por sua enorme ajuda na resolução de alguns pontos chave na construção da curva padrão de tirosina, além de sempre estarem à disposição para esclarecimento de dúvidas.

À Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, pelas sugestões e participação da banca examinadora.

Ao professor Marcelo Otênio por disponibilizar a realização das análises composicionais do leite no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa.

À Rose e Marcela, Bolsistas de Iniciação Científica do Câmpus Rio Pomba, pelo companheirismo, colaboração e comprometimento na execução de algumas análises.

Aos meus colegas de mestrado, pois tornaram cada momento muito importante na minha vida, tanto nos estudos como nos encontros e “churrascos” ocorridos com a participação dos mestrandos e professores.

Ao Márcio Roberto Silva, pela disposição em me ajudar com a tabulação e interpretação de alguns dados obtidos nos experimentos e participação da banca examinadora.

## **BIOGRAFIA**

Jhonatan Faria da Costa é filho de João Elias da Costa e Maria das Graças Faria da Costa, nasceu no dia 22 de julho de 1984, natural de Rio Pomba, Minas Gerais, onde realizou os seus estudos básicos.

Em 2007, diplomou-se como Tecnólogo em Laticínios pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Pomba, atual Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Câmpus Rio Pomba.

Em 2008, foi admitido por meio de concurso público para ingressar no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Câmpus Rio Pomba, como Técnico em Laboratório – Área de Alimentos.

Em 2012, foi admitido no Programa do curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da UFJF, com a parceria da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite e o Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG, em Juiz de Fora, Minas Gerais, concluindo o curso em Junho de 2014.

*“Sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”*

*(Ayrton Senna)*

## RESUMO

A refrigeração e estocagem do leite cru na fonte de produção promoveram um avanço sob o crescimento microbiano, porém, o leite obtido em péssimas condições higiênicas, pode acarretar problemas tecnológicos, mediante à multiplicação da microbiota psicotrófica produtora de enzimas extracelulares deterioradoras, e por muita vezes, termorresistentes. Objetivou-se neste trabalho observar os atributos que demonstram a associação com ocorrência de proteólise indesejável no leite cru refrigerado do município de Rio Pomba-MG; relacionando esta ocorrência ao desenvolvimento dos psicotróficos contaminantes do leite, e além de desenvolver e adaptar um método que permita detectar de forma clara e rápida esta proteólise no leite. Observaram-se valores satisfatórios quanto as características físico-químicos, por outro lado, os valores relacionados a qualidade microbiológica e sanidade, não atendiam os limites estabelecidos pela legislação em sua maioria. No estudo sobre as correlações, foi concluído que ocorreu uma associação entre a contagem bacteriana total, de células somáticas e de psicotróficos no leite cru. E para os valores de contagem das células somáticas apresentaram uma correlação significativa com os percentuais de extrato seco desengordurado e soro-proteínas do leite. Os valores relacionados à proteólise no leite por meio da quantificação da tirosina apresentaram correlação significativa com os valores relativos ao índice de extensão da proteólise e a contagem bacteriana total. E os valores de tirosina por meio do kit de quantificação de mucoproteínas, foram observados a correlação com a contagem bacteriana total e de psicotróficos. No teste de avaliação da estabilidade do leite ao álcool 72% v/v., o estudo sobre as correlações, demonstrou um aumento no índice de instabilidade das amostras que apresentaram contagem bacteriana total acima de  $6,04 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ , e de tirosina acima de  $0,265 \text{ mg} \cdot 5\text{mL}^{-1}$ . Por meio destes resultados, o kit testado demonstrou ser um bom indicador quanto a proteólise ocorrida no leite, porém, à necessidade de estudos mais aprofundados sobre este método, principalmente sobre sua sensibilidade e especificidade, a fim de minimizar a influência de outros fatores aos seus resultados.

**Palavras-chave:** proteólise, leite cru, psicotróficos, tirosina.

## ABSTRACT

Refrigeration and storage of raw milk at the source of production promoted an improvement in microbial growth, however, the milk obtained in poor hygienic conditions, may cause technological problems through the multiplication of psychrotrophic microorganisms producing extracellular enzymes spoilage, and a lot of times, heat resistant. The objective of this work was to observe the attributes that demonstrate the association with the occurrence of unwanted proteolysis in refrigerated raw milk from Rio Pomba-MG; relating this incident to the development of psychrotrophic contaminants of milk, and beyond to develop and adapt a method capable of detecting light and fast this proteolysis in milk. Observed values as satisfactory physico-chemical characteristics, on the other hand, related to microbiological quality and health values, did not meet the limits set by the legislation mostly. In the study of the correlations, it was concluded that there was an association between total bacterial count, somatic cell count and psychrotrophic in raw milk. And for the values of somatic cell count showed a significant correlation with the percentage of dry extract solids and whey proteins in milk. The amounts related to proteolysis in milk by quantifying tyrosine were significantly correlated with the relative values of the index extension of proteolysis and total bacterial count. And the values of tyrosine by means of quantification kit mucoproteins were observed correlation to total bacterial count and psychrotrophic. In the evaluation test of stability of milk to alcohol 72% v/v. the study of the correlations showed an increase in the index of instability of the samples showed that total bacterial count above  $6.04 \log\text{CFU.mL}^{-1}$ , and tyrosine above  $0.265 \text{ mg.5mL}^{-1}$ . Through these results, the test kit proved to be a good indicator as proteolysis occurring in milk, however, the need for further studies on this method, especially on its sensitivity and specificity in order to minimize the influence of other factors to their results.

**Keywords:** proteolysis, raw milk, psychrotrophic, tyrosine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> a) Modelo das micelas de caseína proposto por Waugh (1958); b) Modelo das micelas de caseína proposto por Schmidt e Fox (1982); c) Modelo das micelas de caseína proposto por Walstra (1990) e novamente por Walstra (1999), sendo observada a mudança na escala e posição do fosfato de cálcio coloidal; d) Modelo proposto por Horne (2003), demonstrando a dupla ligação, e a interpretação do modelo de Schmidt e Fox descrito na revisão científica de Horne (2006); e) Modelo da micela de caseína proposto por De Kruif e Holt (2003), e com uma ilustração tridimensional sobre a estrutura micelar da caseína; f) Modelo da estrutura da micela de caseína proposto por Horne (2006) .....	13
<b>Figura 2:</b> Curva padrão utilizada na quantificação de tirosina ( $\text{mg}\cdot 5 \text{ mL}^{-1}$ ) do leite cru.....	45
<b>Figura 3:</b> Temperatura do leite cru no momento da coleta nos tanques de expansão e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b).....	50
<b>Figura 4:</b> Contagem de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º62 (BRASIL, 2011b) .....	53
<b>Figura 5:</b> Contagem total de bactérias ( $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º62 (BRASIL, 2011b) .....	55
<b>Figura 6:</b> Contagem de micro-organismos psicrotróficos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação da contagem máxima recomendada por Martins <i>et al.</i> (2004) e Pinto <i>et al.</i> (2006) .....	58
<b>Figura 7:</b> Contagem de micro-organismos psicrotróficos proteolíticos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação da contagem máxima recomendada por Martins <i>et al.</i> (2004) e Pinto <i>et al.</i> (2006) .....	59
<b>Figura 8:</b> Percentuais de gordura no leite cru e indicação do limite mínimo de 3,0 g/100g de leite estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b) .....	63
<b>Figura 9:</b> Percentuais de extrato seco desengordurado no leite cru e indicação do limite mínimo de 8,4% estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b).....	64
<b>Figura 10:</b> Percentuais de proteína no leite cru e indicação do limite mínimo de 2,9 g/100g estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b) .....	66
<b>Figura 11:</b> Percentuais de nitrogênio total (proteína total), nitrogênio caseínico (caseínas), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (soro-proteínas) e nitrogênio não-proteico (peptídeos e proteínas de menor peso molecular) das amostras de leite cru e indicação do limite mínimo de 2,9 g/100g estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b) .....	67

<b>Figura 12:</b> Percentuais dos índices de extensão (IEP) e profundidade (IPP) da proteólise no leite cru .....	75
<b>Figura 13:</b> Atividade proteolítica (UEP.h <sup>-1</sup> ) das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque .....	78
<b>Figura 14:</b> Valores de tirosina (mg.5mL <sup>-1</sup> ) das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque .....	80
<b>Figura 15:</b> Valores de tirosina mucoproteica (mg.5mL <sup>-1</sup> ) das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque .....	81
<b>Figura 16:</b> Correlação entre a contagem de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) e os percentuais de soro-proteínas no leite cru .....	83
<b>Figura 17:</b> Correlação entre a contagem de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) e o percentual de gordura no leite cru .....	84
<b>Figura 18:</b> Correlação entre a contagens de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) e o percentual de lactose do leite cru .....	85
<b>Figura 19:</b> Correlação entre as contagens bacteriana totais (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) e as contagens de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) do leite cru.....	86
<b>Figura 20:</b> Correlação entre as contagens bacteriana totais (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) e as contagens de micro-organismos psicotróficos (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) do leite cru .....	87
<b>Figura 21:</b> Correlação entre os percentuais de extensão da proteólise (IEP) e a contagem de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) do leite cru .....	88
<b>Figura 22:</b> Correlação entre os percentuais de extensão da proteólise (IEP) e os percentuais de extrato seco desengordurado (ESD) do leite cru ...	89
<b>Figura 23:</b> Correlação entre os percentuais de profundidade da proteólise (IPP) e as temperaturas do leite no momento da coleta (°C) .....	90
<b>Figura 24:</b> Correlação entre o grau de proteólise (mg de tirosina.5mL <sup>-1</sup> ) e os valores da contagem total de bactérias (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) no leite cru .....	91
<b>Figura 25:</b> Correlação entre o grau de proteólise (mg de tirosina.5mL <sup>-1</sup> ) e os percentuais de extensão da proteólise (IEP) .....	92
<b>Figura 26:</b> Correlação entre o grau de proteólise (mg.5mL <sup>-1</sup> em tirosina mucoproteica) e contagem total de bactérias (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) do leite cru...	93
<b>Figura 27:</b> Correlação entre o grau de proteólise (mg.5mL <sup>-1</sup> em tirosina mucoproteica) e contagem de micro-organismos psicotróficos (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) no leite cru .....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros mínimos e máximos estabelecidos pela Instrução Normativa n.º 62 de 29 de Dezembro de 2011, com suas respectivas regiões e suas datas para adequação as normas .....	6
<b>Tabela 2:</b> As proteínas do leite de bovino e de algumas das suas propriedades .....	11
<b>Tabela 3:</b> Problemas relacionados à presença de psicotróficos no leite cru .....	26
<b>Tabela 4:</b> Efeito do crescimento de micro-organismos psicotróficos no leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade dos produtos lácteos .....	27
<b>Tabela 5:</b> Valores médios (n=4) com desvio padrão da contagem de células somáticas, contagem total de bactérias, contagem de micro-organismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos do leite cru .....	52
<b>Tabela 6:</b> Valores médios (n=4) com desvio padrão dos percentuais de lactose, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteínas, proteínas solúveis em pH 4,6, proteínas solúveis em ácido tricloroacético 12% e caseínas das amostras de leite cru .....	62
<b>Tabela 7:</b> Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados pelos isolados psicotróficos proteolíticos, a 4°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação .....	69
<b>Tabela 8:</b> Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados pelos isolados psicotróficos proteolíticos, a 6,5°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação .....	70
<b>Tabela 9:</b> Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados pelos isolados psicotróficos proteolíticos, a 10°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação .....	71
<b>Tabela 10:</b> Valores diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados pelos isolados psicotróficos proteolíticos, a 25°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação .....	72
<b>Tabela 11:</b> Valores médios (n=4) com desvio padrão dos percentuais dos índices de extensão (IEP) e profundidade (IPP) da proteólise, atividade proteolítica empregando-se azocaseína como substrato (UEP/h <sup>-1</sup> ) e por meio da determinação de tirosina pelo método de Hull e utilizando kit para doseamento de mucoproteína no leite cru .....	74
<b>Tabela 12:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada entre todos os valores de contagem de células somáticas (Log <sub>10</sub> cel.mL <sup>-1</sup> ) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	82
<b>Tabela 13:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada entre todos os valores de contagem bacteriana total (Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup> ) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	85
<b>Tabela 14:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada	

entre todos os índices de extensão de proteólise (IEP) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	88
<b>Tabela 15:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada entre todos os índices de profundidade de proteólise (IPP) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	90
<b>Tabela 16:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada entre todos os valores de tirosina ( $\text{mg}\cdot\text{5mL}^{-1}$ ) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	91
<b>Tabela 17:</b> Correlação linear através da regressão linear multivariada entre todos os valores de tirosina ( $\text{mg}\cdot\text{5mL}^{-1}$ em tirosina mucoproteica) e as variáveis relacionadas à qualidade do leite .....	93
<b>Tabela 18:</b> Correlação categorizada ( $p < 0,05$ ) através da regressão logística univariada, entre as amostras avaliadas como instáveis ou estáveis ao álcool 72% v/v. em relação a contagem bacteriana total e grau de proteólise.....	95
<b>Apêndice 1 - Tabela 1:</b> Valores médios ( $n=4$ ), com o desvio padrão e seus valores mínimos e máximos, relativos às variáveis estudadas do leite cru.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\alpha$ -LA** -  $\alpha$ -Lactalbumina
- $\alpha$ s1-CN** -  $\alpha$ s1-Caseína
- $\alpha$ s2-CN** -  $\alpha$ s2-Caseína
- $\beta$ -CN** -  $\beta$ -Caseína
- $\beta$ -LG** -  $\beta$ -Lactoglobulina
- $\kappa$ -CN** -  $\kappa$ -Caseína
- a.C.** - Antes de Cristo
- ASB** - Albumina Sérica
- CCS** - Contagem de Células Somáticas
- CMP** - Caseinomacropéptido
- CBT** - Contagem Bacteriana Total
- CZE** - Eletroforese Capilar por Zona
- FPLC** - Cromatografia Líquida Rápida de Proteína
- FIA** - Espectrometria de Massa por Injeção em Fluxo
- GMP** - Glicomacropéptido
- HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HPLC-MS** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com a detecção por Espectrometria de Massa
- IEP** - Índice de Extensão da Proteólise
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgG1** - Imunoglobulina G1
- IgG2** - Imunoglobulina G2
- IgM** - Imunoglobulina M
- IN 51** - Instrução Normativa nº 51
- IN 62** - Instrução Normativa nº 62
- IPP** - Índice de Profundidade da Proteólise
- LDR 12%** - Leite desnatado reconstituído a 12%
- LF** - Lactoferrina
- Log<sub>10</sub>CCS** - Valor Logarítmico na base 10 da Contagem de Células Somáticas
- Log<sub>10</sub>CBT** - Valor Logarítmico na base 10 da Contagem Bacteriana Total
- Log<sub>10</sub>Psic** - Valor Logarítmico na base 10 da Contagem de Micro-organismos Psicotróficos

**Log<sub>10</sub>PsicProt** - Valor Logarítmico na base 10 da Contagem de Micro-organismos Psicrotróficos Proteolíticos

**MALDI-TOF-MS** - Espectrometria de Massa por Desorção a Laser

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MS** - Espectrometria de Massa

**NT** - Nitrogênio Total

**NS<sub>pH4,6</sub>** - Nitrogênio solúvel em pH 4,6

**NS<sub>TCA12%</sub>** - Nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12%

**PCA** - Ágar Padrão para Contagem de Bactérias

**RP-HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

**TCA** - Ácido Tricloroacético

**UAT** - Ultra Alta Temperatura

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo geral .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. A regulamentação do setor leiteiro.....	4
3.2. Definição e componentes do leite .....	6
3.3. Proteínas do leite. ....	9
3.4. Estabilidade das proteínas do leite .....	15
3.5. Micro-organismos psicotróficos contaminantes em leite.....	17
3.6. Proteases no leite.....	21
3.7 Problemas tecnológicos relacionados às proteases do leite. ....	24
3.8. Métodos quantitativos e qualitativos para determinação das proteínas do leite.....	27
3.8.1. Métodos fundamentados na degradação das proteínas por via química, por fixação de corantes e espectrométricos por absorção. ....	28
3.8.2. Métodos eletroforéticos e cromatográficos. ....	30
3.8.3. Métodos imunológicos. ....	33
3.9. Metodologias de avaliação da proteólise do leite.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
4.1. Coleta das amostras de leite cru granelizado. ....	40
4.2. Caracterização da qualidade microbiológica e composicional do leite cru granelizado. ....	41
4.3. Isolamento e seleção dos micro-organismos psicotróficos proteolíticos.....	41
4.4. Determinação da proteólise, atividade proteolítica e do grau de proteólise das amostras de leite cru granelizado. ....	42
4.4.1. Determinação da proteólise do leite cru granelizado. ....	42
4.4.2. Determinação da atividade proteolítica. ....	43
4.4.3. Determinação do grau de proteólise, pelo método descrito por Hull.....	44
4.4.4. Determinação do grau de proteólise pelo método de quantificação de tirosina em função de mucoproteínas.....	45
4.5. Teste de estabilidade do leite cru ao álcool. ....	46
4.6. Análise estatística. ....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Temperatura do leite cru no momento da coleta das amostras .....	48
5.2. Características microbiológicas e higiênico-sanitárias. ....	51

5.2.1. Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total.....	51
5.2.2. Contagem de micro-organismos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos.....	56
5.3. Características composicionais das amostras de leite cru.....	60
5.4. Produção de proteases dos micro-organismos psicrotróficos proteolíticos isolados do leite cru, em meio de cultura enriquecido com LDR 10%.....	68
5.5. Índices de extensão e profundidade da proteólise no leite cru.....	73
5.6. Atividade proteolítica no leite cru. ....	76
5.7. Grau de proteólise no leite cru. ....	79
5.8. Estabilidade do leite ao teste do álcool.. ....	82
5.9. Correlações entre os parâmetros de qualidade avaliados nas amostras de leite cru refrigerado granelizado.. ....	82
6. CONCLUSÕES. ....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
APÊNDICE 1 .....	112

## 1. INTRODUÇÃO

O leite está intimamente ligado à dieta dos brasileiros, portanto é considerado um alimento de enorme importância para a estrutura agroindustrial do país. Além disso, apresenta papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população, principalmente para a ligada a estrutura de agricultura familiar.

A partir de algumas intervenções legais (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011a; BRASIL, 2011b), com o intuito de promover o desenvolvimento do agronegócio do leite, alguns padrões de identidade e qualidade do leite cru foram revistos e incluídos na legislação. Entretanto, o setor não dispõe de infraestrutura e capacitação de corpo técnico suficiente, que possa corresponder em tempo hábil, às necessidades estabelecidas pelos padrões e normas para a produção de leite.

Um dos importantes pontos abordados nesta nova legislação, trata da melhoria da qualidade do leite cru na fazenda, pela manutenção do mesmo em tanques refrigerados e seu transporte em tanques iso-térmicos.

O processo de estocagem a frio proporciona a redução simultânea dos custos operacionais na produção e da atividade acidificante das bactérias mesofílicas, que proporcionam perdas industriais significativas (NÖRNBERG *et al.*, 2009). Por outro lado, este processo de conservação do leite cru obtido em más condições higiênicas, pode resultar no decréscimo da qualidade de alguns produtos lácteos, devido a multiplicação da microbiota psicrotrofica produtora de enzimas deterioradoras termorresistentes que causam vários problemas tecnológicos para a indústria de laticínios como: instabilidade do leite ao calor, perda de rendimento na produção de queijos (CARDOSO, 2006), alteração da viscosidade de iogurte, aparecimento de sabor e aroma indesejáveis nos derivados lácteos, problemas quanto à textura em queijos de médio e curto tempo de maturação (BARBOSA *et al.*, 2009), aumento dos teores de peptídeos e de aminoácidos livres no leite e geleificação do leite UAT (SAMARŽIJA *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2006; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

Entre os problemas citados, muitos são ocasionados pela atividade proteolítica das bactérias psicotróficas encontradas no leite cru. A proteólise de origem microbiana, de forma geral, contribui com a degradação das proteínas do leite, levando a consequências danosas sobre a vida de prateleira de seus derivados. Muitos estudos no Brasil evidenciaram altas contagens de bactérias psicotróficas em leite cru refrigerado (SOUZA *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2002; BRUM *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2013), mas pouco se conhece sobre a composição desta microbiota e atividade proteolítica, nem existe qualquer regulamentação específica quanto à qualidade microbiológica do leite cru destinado à fabricação de produtos lácteos específicos.

Neste processo avaliativo, os métodos considerados mais eficientes e sensíveis na avaliação da proteólise ocasionada por micro-organismos, estão associados a metodologias complexas e onerosas, por outro, os métodos mais acessíveis e de menor complexidade, apresentam certas limitações quanto aos seus resultados.

Portanto, é importante a realização de pesquisas e elaboração de procedimentos que proporcionem informações sobre estado real que se encontram as proteínas do leite, tornando o processo de seleção e encaminhamento da matéria-prima com menores dispêndios, em relação a possíveis problemas na linha de produção. As consequências tecnológicas desfavoráveis tanto para o processamento como para o produto final, podem ser reduzidas definindo-se de forma mais coerente a qualidade composicional das proteínas do leite que é entregue nas plataformas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os atributos composicionais e microbiológicos sobre a qualidade do leite cru refrigerado, o quanto estes fatores interferem na atividade proteolítica deste produto e sua consequência no processo produtivo.

### **2.2. Objetivos específicos**

Levantar dados sobre a qualidade microbiológica e composicional do leite cru granelizado do município de Rio Pomba, MG.

Avaliar o grau de proteólise e a atividade proteolítica das amostras de leite cru refrigerado.

Utilizar um método indicado para detecção de tirosina mucoproteica, como uma ferramenta de auxílio na avaliação e classificação da matéria-prima, sendo estabelecido o melhor destino, dentro da linha produtiva.

Correlacionar as diferentes variáveis e buscar conclusões sobre a influência de cada uma sobre a qualidade do leite. E através destas correlações, discutir sobre as consequências que as boas práticas de obtenção, estocagem e transporte do leite á frio proporcionam aos derivados lácteos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. A regulamentação do setor leiteiro

Com a globalização, o produtor de leite brasileiro passou a concorrer com produtores de todo o mundo em função da abertura de mercado. Portanto, a legislação para a produção e estocagem do leite cru precisou passar por modificações e adequações quanto aos seus padrões mínimo e máximo, tornando o leite brasileiro um produto com possibilidades de participar desta competição, por ser produzido com competência e qualidade (GALANTE e COSTA, 2008).

No entanto, o setor não dispunha de uma regulamentação bem estruturada para a cadeia produtiva do leite, com a necessidade de instituir padrões e normas para a produção de leite no país, para fins de mudar o posicionamento do setor primário no mercado, e tornam a produção de leite uma atividade integrada aos setores industriais, fazendo com que o produtor rural, deixasse de ser somente um provedor de alimentos *in natura* e consumidor de seus próprios produtos. Assim, foi proposto aos agentes que compõem a cadeia produtiva, um trabalho mais acentuado na produção e obtenção de leite e derivados lácteos com qualidade, para atender aos requisitos estabelecidos de segurança alimentar e de qualidade exigidos para os alimentos destinados ao consumo humano e assegurando um faturamento industrial satisfatório.

Portanto, a partir de várias discussões em torno da melhoria da qualidade do leite, foi colocada como ponto de partida a implantação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite em 1997 e a criação da Instrução Normativa nº. 51 (BRASIL, 2002), esta publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em setembro de 2002. Nesta legislação foram estabelecidos os padrões e as normas de identidade e qualidade para a produção de leite no País, em especial quanto aos critérios de conservação, transporte e requisitos de qualidade do leite cru. A sua implantação feita de forma compulsória nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste em julho de 2005 (BRASIL, 2002).

Contudo, estas exigências não foram alcançadas por muitos produtores, com a alegação de que para muitos deles não havia tempo hábil, para constituição da estrutura de produção e que os mesmos não estavam totalmente preparados para atender as exigências estabelecidas, o que forçou o MAPA a voltar atrás em suas indicações e reestruturar a sua ação.

Tendo em vista a proporção do impasse no setor, foi aprovada a Instrução Normativa nº 32 (BRASIL, 2011a), que prorrogou por 06 (seis) meses o prazo para a adequação dos produtores aos novos limites microbiológicos e de células somáticas, que entrariam em vigor a partir de 1º de julho de 2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2011a).

Devido a difícil adequação aos parâmetros estabelecidos anteriormente, o MAPA aprovou no final do ano de 2011 um novo regulamento, a Instrução Normativa nº. 62 (BRASIL, 2011b), sendo esta publicada em dezembro de 2011, com uma nova perspectiva de adequação dos produtores rurais e indústrias, alterando, assim a Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002) e tentando relacionar o contexto da produção de leite com a realidade do país (Tabela 1) (BRASIL, 2011b).

Juntamente com essas modificações, a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b) também inclui à rotina de análises dos parâmetros de qualidade, a pesquisa de resíduos de antibióticos e/ou outros inibidores do crescimento microbiano, tendo em vista a preocupação quanto ao uso indiscriminado desses produtos no tratamento de enfermidades dos animais.

De acordo com Santos e Fonseca (2001), a eficiência da refrigeração do leite logo após a ordenha é maximizada se associada a outros fatores, como a adoção de práticas higiênicas durante a ordenha. A Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b) preconiza que no tempo máximo de 3 horas após a ordenha o leite seja refrigerado até temperatura igual ou inferior a 4 °C quando for utilizado o tanque de refrigeração por expansão direta e, no caso de tanques de refrigeração por imersão, o leite deve ser refrigerado até temperatura igual ou inferior a 7 °C.

**Tabela 1:** Parâmetros mínimos e máximos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62 de 29 de Dezembro de 2011, com suas respectivas regiões e suas datas para adequação as normas.

REGIÕES NORTE E NORDESTE	REGIÕES SUL, SUDESTE E CENTRO - OESTE	CBT	CCS	PARÂMETROS COMPOSICIONAIS
01/07/2010 a 31/12/2012	01/07/2008 a 31/12/2011	750.000 UFC.mL <sup>-1</sup>	750.000 células.mL <sup>-1</sup>	<u>Matéria Gorda:</u> Teor Original, com o mínimo de 3,0 g.100g <sup>-1</sup> . <u>Densidade relativa:</u> 1,028 a 1,034 g.mL <sup>-1</sup> a 15 <sup>o</sup> C. <u>Acidez titulável:</u> 0,14 a 0,18 g de ácido láctico.100mL <sup>-1</sup> . <u>Extrato seco</u> <u>desengordurado:</u> mínimo de 8,4 g.100g <sup>-1</sup> . <u>Índice Crioscópico:</u> -0,530 <sup>o</sup> H a -0,550 <sup>o</sup> H (equivalentes a -0,512 <sup>o</sup> C e a -0,531 <sup>o</sup> C). <u>Proteínas:</u> mínimo de 2,9g.100g <sup>-1</sup> .
01/01/2013 a 30/06/2015	01/01/2012 a 30/06/2014	600.000 UFC.mL <sup>-1</sup>	600.000 células.mL <sup>-1</sup>	
01/07/2015 a 30/06/2017	01/07/2014 a 30/06/2016	300.000 UFC.mL <sup>-1</sup>	500.000 células.mL <sup>-1</sup>	
A partir de 01/07/2017	A partir de 01/07/2016	100.000 UFC.mL <sup>-1</sup>	400.000 células.mL <sup>-1</sup>	

Fonte: BRASIL, 2011b.

### 3.2. Definição e componentes do leite

De acordo com o MAPA, o leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta de uma fêmea leiteira sadia, bem alimentada e descansada, que deve ser produzido em condições de higiene, isento de substâncias estranhas e de colostro (BRASIL, 2002). O leite é um fluido viscoso constituído de uma fase líquida e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração. É uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades e pode ser considerado o alimento mais completo da natureza e o único que satisfaz as necessidades nutricionais dos animais recém-nascidos (SGARBIERI, 1996).

A quantidade e a qualidade do leite produzido, juntamente com sua composição, podem variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos.

Dentre estes fatores destacam-se a raça, espécie, fisiologia, período de lactação, alimentação, saúde, período de cio, idade, características individuais, clima, espaço entre as ordenhas, estações do ano, doenças, fraudes e adulterações, dentre outros (VELOSO, 2001).

Os constantes estudos sobre a composição do leite tornaram-se determinantes para o estabelecimento e a adequação de sua qualidade nutricional, processamento e consumo. A biossíntese de muitos constituintes do leite relaciona-se a constituição sanguínea e as condições do epitélio da glândula mamária, e está sobre o controle hormonal do animal. É estimado que exista cerca de cem mil constituintes distintos relacionados ao leite, embora a maioria deles não tenha ainda sido identificada. A água é a maior fração presente no leite, na qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes. Sendo em sua maior parte encontrada como água livre, embora haja água ligada aos constituintes como proteínas, lactose e substâncias minerais (SILVA, 1997).

A estrutura lipídica presente no leite encontra-se em forma de pequenos glóbulos de gordura e contem, principalmente, triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoproteica. O leite de vaca possui, aproximadamente, 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oleico. Porém, a gordura é o constituinte que mais susceptíveis variações quantitativas e qualitativas, principalmente em razão da alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (SILVA, 1997). Além disso, esta fração lipídica pertencente ao leite, tem como propriedade a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (VALSECHI, 2001).

No leite também são encontrados muitos compostos nitrogenados, dentre esses, aproximadamente 95% são proteínas e 5% compostos nitrogenados não-proteicos. O nitrogênio proteico é a fração do leite, considerada mais importante do ponto de vista econômico, e é constituído de cerca de 80% de nitrogênio caseínico (caseínas) e de 20% de nitrogênio não-caseínico representado pelas proteínas do soro e outras frações peptídicas. Como para a fração lipídica, diversos são os fatores que podem influenciar na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, como temperatura, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições,

raça, alimentação e teor energético da alimentação. O leite contém também diversas enzimas endógenas, como as lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. Algumas destas enzimas são utilizadas no controle de qualidade do leite, a exemplo da fosfatase alcalina, que é um dos indicadores de eficiência da pasteurização do leite. Porém, o desenvolvimento, proposital ou não, de micro-organismos no leite contribui muito para o complexo enzimático e é influenciado, principalmente, pelas condições do meio, como temperatura, pH, acesso ao substrato, e conseqüentemente, sendo alterado pelo processamento tecnológico (SILVA, 1997).

O aumento da quantidade de enzimas no leite pode ter origem em um processo inflamatório da glândula mamária, associado a ação de micro-organismos sobre as paredes dos vasos sanguíneos, que ficam dilatadas e, conseqüentemente, diversas substâncias do sangue passam junto com os leucócitos para o leite (BRITO, 1999).

Por outro lado, algumas enzimas de origem microbiana, com características termoestáveis, podem acarretar problemas durante seu período de estocagem, como aumento dos compostos nitrogenados de baixo peso molecular, que atuam como nutrientes para os contaminantes pós-pasteurização, rancidez, sabor amargo, estufamento tardio em queijos, geleificação de leite UAT, entre outros (PINTO *et al.*, 2013).

Por outro lado, os glicídios ou açúcares do leite são constituídos pela lactose, que é formada a partir da associação entre glicose e galactose. Este glicídio pode ser modificado em sua estrutura, principalmente, por ação de tratamentos térmicos, o que ocasiona possíveis reações de escurecimento, em que ocorre uma diminuição do valor nutricional do leite, proporcional à intensidade e o tempo de aquecimento (SILVA, 1997). Dentre as principais propriedades nutricionais da lactose, destaca-se a ação benéfica sobre a microbiota intestinal de recém-nascidos, fonte de energia, acidificação do tubo digestivo e aumento na microbiota intestinal, além de contribuir com a síntese de outros elementos, como as proteínas e o colesterol (VALSECHI, 2001).

Dentre os sais minerais presentes no leite, aqueles que mais se destacam são os fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Desses, os mais

importantes nutricionalmente são os sais associados ao cálcio e ao fósforo, pois contribuem para formação e manutenção óssea. Por outro lado, esta composição pode ser influenciada pela raça e individualidade do animal, estágio de lactação, alimentação, ocorrência de um processo inflamatório das glândulas mamárias e a estação do ano (GAUCHERON, 2005; LUCEY e HORNE, 2009). As associações entre os sais e as proteínas do leite são determinantes para a estabilidade das caseínas frente a diferentes agentes desnaturantes, principalmente fosfato de cálcio que, particularmente, faz parte da estrutura das micelas de caseína e proporciona a estabilidade da fase coloidal (SILVA, 1997).

Associada a sua rica e variada composição, o leite é um produto facilmente perecível, tendo sua durabilidade limitada muitas vezes pela presença e multiplicação de micro-organismos, os quais causam modificações físico-químicas a este produto.

### **3.3. Proteínas do leite**

As proteínas do leite possuem um enorme valor e importância, pelas suas excelentes propriedades nutritivas, como tecnológicas e funcionais. Suas propriedades nutritivas e tecnológicas derivam da sua composição em aminoácidos que atendem à maioria das exigências fisiológicas do ser humano e de suas características físico-químicas. Paralelamente às propriedades funcionais das proteínas do leite, o estudo da sua solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos, tem se tornado de considerável interesse tecnológico e de constante pesquisa (VELOSO, 2001).

Segundo Fox (2003), estas proteínas encontram-se divididas entre o grupo das caseínas e o das soroproteínas. As caseínas são insolúveis em pH 4,6, enquanto as soroproteínas, se não desnaturadas, são solúveis sob as condições iônicas do leite neste valor de pH, embora menos do que no pH

normal do leite. Os estudos da precipitação isoelétrica das caseínas tem grande importância para o ciclo industrial, pois conduz a melhoria de rendimento na produção de caseínas e caseinatos, produtos lácteos fermentados e queijos produzidos por coagulação ácida.

Ao leite bovino, estão incluídos cerca de 30 a 36 g/L de proteína total de alta qualidade nutritiva e dentro deste grande grupo, existem basicamente seis produtos genéticos majoritários provenientes da glândula mamária, sendo denominadas  $\alpha_1$ -caseínas,  $\alpha_2$ -caseínas,  $\beta$ -caseínas,  $\kappa$ -caseínas,  $\beta$ -lactoglobulinas e  $\alpha$ -lactoalbuminas. Cada uma dessas proteínas exibe diferentes modelos de polimorfismo genético por serem produtos de genes codominantes, alelos e autossômicos (Tabela 2).

O leite também contém vários componentes protéicos que são grandes polipeptídios, resultantes da proteólise das proteínas lácteas por proteases endógenas como a plasmina, que é derivada do sangue dos animais. Desse modo, são formadas as  $\gamma$ -caseínas, que são peptídeos obtidos a partir da clivagem da  $\beta$ -caseína e a maior parte das proteose-peptonas, as quais estão presentes em maior parte no soro (FARRELL *et al.*, 2004).

A coagulação proteolítica é realizada por meio da desestabilização das caseínas por algumas enzimas específicas, enquanto que as soroproteínas não possuem a mesma susceptibilidade. Esta propriedade para as caseínas são estudadas e aperfeiçoadas no contexto da produção queijeira, em que, aproximadamente, 75% de todos os queijos são produzidos por este tipo de coagulação (FOX *et al.*, 2000).

As caseínas são divididas em subclasses,  $\alpha$ -s-caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína. As caseínas do leite estão contidas em um agregado de partículas, as micelas, e a estabilidade dessa micela deve-se, preferencialmente, à  $\beta$ -caseína e, em parte, ao fosfato de cálcio coloidal presente no meio (KOHLMANN *et al.*, 1991).

**Tabela 2:** As proteínas do leite bovino e algumas de suas propriedades

Proteína (abreviação sugerida)	Composição no leite desnatado (g/L)	Variantes genéticas	Peso molecular (Dáltons)	Ponto isoelétrico
$\alpha_1$ -Caseína ( $\alpha_1$ -CN)	12–15	B	23.615	4,44–4,76
		C	23.542	...
$\alpha_2$ -Caseína ( $\alpha_2$ -CN)	3–4	A	25.226	...
$\beta$ -Caseína ( $\beta$ -CN)	9–11	A <sup>1</sup>	24.023	...
		A <sup>2</sup>	23.983	4,83–5,07
		B	24.092	—
$\kappa$ -Caseína ( $\kappa$ -CN)	2–4	A	19.037	5,45–5,77
		B	19.006	5,3–5,8
$\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -LG)	2–4	A	18.363	5,13
		B	18.277	5,13
$\alpha$ -Lactalbumina ( $\alpha$ -LA)	0,6–1,7	B	14.178	4,2–4,5
Albumina Sérica (ASB)	0.4	A	66.399	4,7–4,9
Imunoglobulina G1 (IgG1)	0,3–0,6	...	161.000	5,5–6,8
Imunoglobulina G2 (IgG2)	0,05	...	150.000	7,5–8,3
Imunoglobulina A (IgA)	0,01	...	385.000–417.000	
Imunoglobulina M (IgM)	0.09	...	1.000.000	...
Elementos secretados	0,02–0,1	...	63.750	...
Lactoferrina (LF)	0,02–0,1	...	76.110	8,81

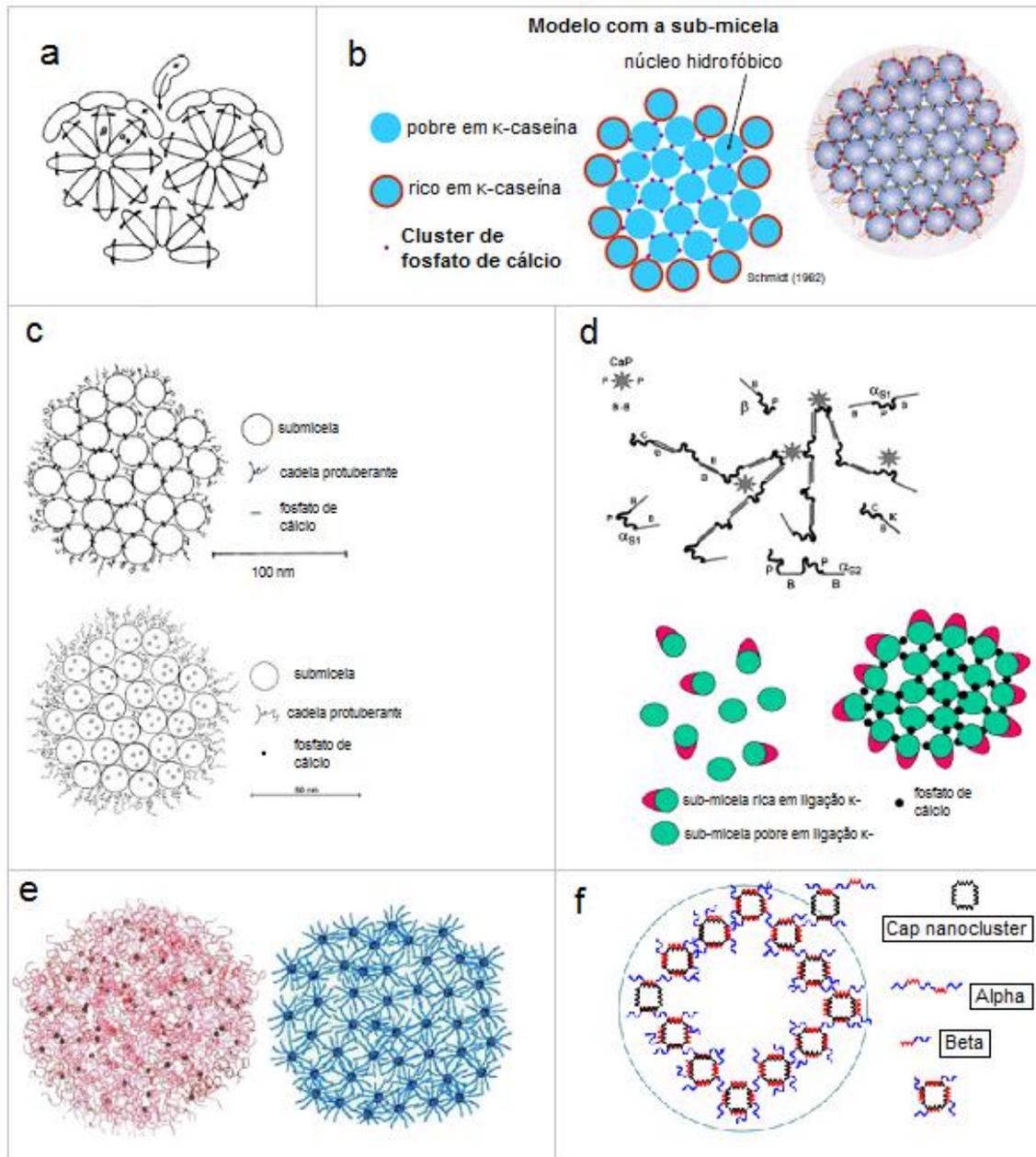
**Fonte:** Adaptado de FARRELL *et al.* (2004).

As caseínas apresentam uma alta estabilidade ao tratamento térmico, dado que o leite em pH 6,7 pode ser aquecido a 100°C, por 24 h sem coagulação, e o mesmo pode resistir ao aquecimento a 140°C, por 20 a 25 minutos. Esta estabilidade está relacionada a solução aquosa de caseinato de cálcio que é ainda mais estável e pode ser aquecida a 140°C, por muitas horas sem alterações aparentes. Por outro lado, a estabilidade térmica das soroproteínas é típica de proteínas globulares que são desnaturadas completamente pelo aquecimento a 90°C por 10 minutos. Associada a alta estabilidade térmica das caseínas, tornou-se muito habitual o processamento de alguns produtos lácteos empregando-se o tratamento térmico de esterilização comercial, com mudanças físicas e químicas relativamente pequenas durante o processamento e vida de prateleira dos derivados.

Segundo Souza (2013), a forma em que as soroproteínas encontram-se dispostas é um fator considerável na estrutura do leite. São encontradas na forma de monômeros em estruturas terciárias, porém para o caso das caseínas, elas estão dispostas como um amplo agregado coloidal conhecido como micela (Figura 1). A coloração branca do leite em grande parte é associada à dispersão da luz pelas micelas de caseínas.

As caseínas são constituídas de altas concentrações de prolina, a qual está consideravelmente presente nas estruturas  $\alpha$  e  $\beta$ , 17% do total de resíduos da  $\beta$ -CN. As micelas de caseínas contêm, aproximadamente, 0,8% de fósforo, mas o grau de fosforilação varia muito nas caseínas individualmente, e as porções de fosfato estão ligadas as caseínas como fosfo-monoésteres de serina (SOUZA, 2013).

A forma e o local onde ocorre a biossíntese das caseínas e as soroproteínas é outro fator de diferenciação entre elas. As caseínas são sintetizadas na glândula mamária para satisfazer as necessidades do recém-nascido. As principais soroproteínas são também sintetizadas na glândula e a maior parte possui funções biológicas. Porém, existem variadas formas de soroproteínas, principalmente as proteínas menores do leite, que são derivadas do sangue por transporte seletivo ou pela rota paracelular (FOX e McSWEENEY, 2003).



**Figura 1:** a) Modelo das micelas de caseína proposto por Waugh (1958); b) Modelo das micelas de caseína proposto por Schmidt e Fox (1982); c) Modelo das micelas de caseína proposto por Walstra (1990) e novamente por Walstra (1999), sendo observada a mudança na escala e posição do fosfato de cálcio coloidal; d) Modelo proposto por Horne (2003), demonstrando a dupla ligação, e a interpretação do modelo de Schmidt e Fox descrito em uma revisão científica de Horne (2006); e) Modelo da micela de caseína proposto por De Kruijff e Holt (2003), e com uma ilustração tridimensional sobre a estrutura micelar da caseína; f) Modelo da estrutura da micela de caseína proposto por Horne (2006).

Há uma ampla discussão sobre a verdadeira teoria relacionada à estrutura das micelas de caseínas e muitos modelos (Figura 1) já foram estudados, discutidos e propostos ao longo dos últimos 45 anos. Um destes propõe o denominando “núcleo-revestido”, para indicar que o interior da micela é composto por proteínas diferentes daquelas da parte mais externa, que seria formada por uma “estrutura de subunidades”, cujo termo é denominado como submicelas (FOX, McSWEENEY, 2003; DE KRUIF e HOLT, 2003; HORNE, 2009). Com base neste modelo, foi sugerido que as micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de várias moléculas de caseínas, que se mantêm unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. O fosfato de cálcio amorfo faz a ligação entre as submicelas, com participação de ésteres fosfatos. Dessa forma, quase todas as regiões nas moléculas de caseínas têm a mobilidade restrita.

Outros modelos consideram que a micela seja uma estrutura proteica de rede porosa de conformação com menor rigidez, na qual os “*nano clusters*” de fosfato de cálcio são responsáveis pelas ligações cruzadas entre proteínas, de forma a manter a rede estruturada (HOLT, 1992). No modelo proposto por Horne (1998) a associação entre as micelas de caseínas é organizada por meio de um equilíbrio entre as interações eletrostáticas e hidrofóbicas das moléculas de  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - e  $\beta$ -caseína, consistindo de distintas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas.

As estruturas e modelos sugerem que a porção carboxi-terminal da  $\kappa$ -caseína apresenta-se, predominantemente, como filamentos flexíveis e orientados para a fase externa da micela. A  $\kappa$ -caseína possui muitas regiões com capacidade hidrofílica em sua molécula, orientando-se para a parte externa da micela, enquanto que para as demais, tendem a orientar-se para o interior da micela.

A estrutura glicosilada a partir do ácido N-acetil-neuramínico, ácido glutâmico e ácido piroglutâmico, associada a sua solubilidade desta estrutura ao cálcio iônico, acrescido da repulsão espacial decorrente dos filamentos de  $\kappa$ -caseína e a repulsão dos grupamentos carboxilas com cargas negativas; contribuem para estabilização da micela. Na região terminal da  $\kappa$ -caseínas, a

partir do aminoácido 106, encontra-se a porção com maior capacidade hidrofílica, sendo a região inicial a mais hidrofóbica (PINTO, 2004).

Entre as soroproteínas, a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) é a soroproteína mais abundante no leite bovino. Representa, aproximadamente, 50% do total de soroproteínas e, aproximadamente, 12% do total de proteínas do leite. Sendo a  $\beta$ -LG, rica em aminoácidos sulfurados, os quais apresentam um alto valor biológico, tem duas pontes dissulfeto intramolecular e um mol de cisteína por monômero. A cisteína é importante durante a reação de desnaturação térmica, pois forma uma ponte dissulfeto intermolecular com a  $\kappa$ -CN, sendo também responsável pela alteração de sabor no leite tratado termicamente. A  $\alpha$ -lactoalbumina representa, aproximadamente, 20% das proteínas do soro de leite bovino (3,5% das proteínas totais do leite), é a principal proteína do leite humano, com um valor relativamente alto de triptofano e contém, aproximadamente, 1,9% de enxofre, os quais são responsáveis por quatro pontes dissulfeto intramoleculares por mol (FOX e McSWEENEY, 2003).

### **3.4. Estabilidade das proteínas do leite**

Segundo Fox e Brodorb (2008), a estabilidade coloidal do leite é, em muitos casos, a propriedade físico-química mais importante e, constantemente, tem-se estudado sobre suas particularidades e importância tecnológica na indústria laticinista. Para o leite de boa qualidade, as micelas de caseína encontram-se estáveis a todos os processos à que são normalmente submetidas. A forma micelar da caseína é observada no leite obtido de todas as espécies de mamíferos e, a essa característica estrutural, é atribuída à cor branca do leite. A distribuição generalizada ou universal de micelas no leite confere uma função fisiológica e nutricional importante às proteínas, pois o cálcio e fosfato são necessários para o desenvolvimento de ossos e dentes e para a taxa de crescimento. No entanto, o fosfato de cálcio tem uma baixa solubilidade no valor de pH do leite, assim encontra-se supersaturado no leite. Portanto, seria esperada a sua precipitação na glândula mamária, com a formação de pedras que bloqueariam os canais da glândula, o que causaria a morte do órgão e talvez do animal. Mas pela característica estrutural das

micelas de caseína, o fosfato de cálcio em excesso é mantido no estado coloidal estável. As micelas de caseína agem como um dispositivo que permite a secreção de leite com uma alta concentração de fosfato de cálcio sem que ocorra a sua precipitação.

As micelas são sintetizadas para serem absorvidas pelo recém-nascido. A sua hidrólise é feita por uma determinada protease de origem estomacal, a quimosina, processo que promove uma retenção na entrada de componentes do leite no intestino delgado, e assim proporciona uma melhor digestibilidade. Além disso, a formação deste coágulo faz com que ocorra um processo de digestão mais contínua, o que facilita processo nutricional em intervalos que podem ser longos (FOX e BRODKORB, 2008).

No processo de concentração do leite por evaporação, há redução na estabilidade do leite a partir da concentração da solução, do aumento na concentração de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , associado ao decréscimo do pH do meio e também pela precipitação do di-hidro-ortofosfato de cálcio ( $\text{CaH}_2\text{PO}_4$ ) e fosfato ácido de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) como tri-ortofosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) acompanhada pela liberação de íons  $\text{H}^+$ . Porém, no processo de desidratação, as alterações são pouco relevantes à estabilidade, devido, principalmente, ao tratamento com temperaturas relativamente mais baixas.

No processo de congelamento rápido, a estabilidade do leite é pouco afetada, mas em processos de congelamento lento e durante seu armazenamento, em uma faixa de temperatura entre  $-10^\circ\text{C}$  a  $-20^\circ\text{C}$ , ocorre a desestabilização da fase coloidal associado ao aumento na concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e um decréscimo no valor de pH devido a precipitação do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , acompanhados, principalmente, pela cristalização da lactose.

A homogeneização que é empregada normalmente no processamento de leite, de até 20 MPa, não proporciona um efeito considerável a estabilidade das micelas de caseína, mas em processos que proporcionem uma alta pressão, com cerca de 4200 MPa, pode ocasionar a dissociação da estrutura micelar.

Segundo Fox e Brodkorb (2008), descreveram que a estabilidade das micelas é pouco afetada o processo de pasteurização rápida ( $72^\circ\text{C}/15$  segundos), mas proporciona a desnaturação e interação das proteínas do soro

com as micelas de caseína, por meio de ligações dissulfeto intermoleculares, principalmente entre a  $\beta$ -LG e a  $\kappa$ -CN. Em decorrência dessa interação proteica, muitas propriedades das micelas são alteradas, como a estabilidade térmica e propriedades relacionadas à coagulação na fabricação de queijos. Por outro lado, o tratamento térmico muito rigoroso, proporciona problemas tecnológicos, por exemplo, para o leite concentrado, quando pode ocorrer o escurecimento pela reação de Maillard, diminuição do pH, a dissociação de  $\kappa$ -CN da estrutura micelar e, eventualmente, a coagulação.

As micelas de caseína são desestabilizadas muitos fatores, alguns deles são industrialmente importantes, como a hidrólise da  $\kappa$ -CN por proteases específicas e desejáveis (coalho), muito explorado na fabricação da maior parte das variedades de queijos. Existe também o uso da acidificação do leite para pH 4,6, o que é explorado para o processamento de alguns queijos, leites fermentados e produtos funcionais.

É utilizada também a desestabilização das micelas na produção de alguns caseinatos, avaliação da estabilidade térmica do leite com o teste do álcool, avaliação e pesquisa das estruturas proteicas utilizando diferentes detergentes aniônicos e alta pressão (FOX e BRODKORB, 2008).

### **3.5. Micro-organismos psicrotróficos contaminantes em leite**

O armazenamento do leite cru em temperaturas de refrigeração possibilita a redução de custos operacionais de produção. Entretanto, o armazenamento por períodos prolongados pode resultar em queda de qualidade dos produtos lácteos, associado a multiplicação e atividade enzimática de bactérias psicrotróficas (MARTINS *et al.*, 2005).

A refrigeração do leite a baixas temperaturas nas fazendas por longos períodos proporciona uma redução no processo de deterioração do leite pelos micro-organismos mesofílicas, entretanto, esse procedimento pode proporcionar alguns problemas tecnológicos associados à seleção de micro-organismos psicrotróficos. Portanto, o dimensionamento do tanque de expansão deve ser calculado de forma correta, por profissionais da área, correspondendo as necessidades da fazenda ou conjunto de produtores,

mediante a dados referentes ao número de ordenhas, refletindo sobre o volume a ser armazenado, e a melhor temperatura de armazenagem, a fim de propiciar um bom desempenho no armazenamento e conservação do leite (ARCURY *et al.*, 2006)

Espécies de micro-organismos psicrotróficos relevantes para indústria laticinista, incluem as espécies Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium*; e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. Dentre os micro-organismos resistentes ao processo de esterilização comercial do leite, destaca-se espécies do gênero *Bacillus*, sendo os mais predominantes *B. licheniformis* e *B. cereus* (PINTO *et al.*, 2013).

Os micro-organismos psicrotróficos não fazem parte da microbiota natural do úbere e, portanto, a sua presença no leite cru é exclusivamente procedente da contaminação do leite após a ordenha (GOUNOT, 1986; SUHREN, 1989; MUNSCH-ALATOSSAVA *et al.*, 2005).

As principais fontes de contaminação do leite cru com bactérias psicrotróficas Gram negativas são a água residual de ordenhadeiras, tubulações de leite ou tanques de resfriamento; no úbere e tetas mal higienizados; proveniente da limpeza inadequada da superfície de utensílios e equipamentos; inadequação no transporte e armazenamento do leite; e a formação de biofilme (SANTANA *et al.* 2004;. SIMÕES *et al.*, 2010).

A deterioração não é somente justificada pela presença destes micro-organismos no leite estocado, mas também é associada a produção de enzimas termorresistentes que podem reduzir a qualidade e a vida de prateleira do leite termicamente tratado e de produtos lácteos fabricados com esta matéria-prima contaminada.

As principais estirpes psicrotróficas do leite, incluem espécies de *Pseudomonas* que se caracterizam por apresentar um curto tempo de geração, entre 0 e 7°C (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Assim, são consideradas como os agentes mais importantes na deterioração do leite mantido sob refrigeração. Dentre as bactérias psicrotróficas contaminantes, a *Pseudomonas* constitui o gênero encontrado com maior frequência no leite e em derivados

mantidos em baixa temperatura, e representa em torno de 10% da microbiota total do leite recém obtido (MUIR, 1996).

Segundo Pinto *et al.* (2013), micro-organismos psicotróficos têm um mecanismo de adaptação a baixas temperaturas, caracterizado por modificações de sua estrutura lipídica e proteica, por meio da síntese e modificações no conteúdo dos ácidos graxos na membrana, relacionados aos mecanismos fisiológicos da célula. Ocorre então, a insaturação dos ácidos graxos, o que abaixa o ponto de fusão dos lipídeos e mantém a estrutura lipídica em seu estado líquido, mesmo quando a bactéria está em ambiente refrigerado, situação que não prejudica as funções da membrana.

Como descreve Jay (1996) em algumas espécies do gênero *Pseudomonas*, não é observado este fenômeno, já que na constituição de sua membrana contém entre 59% e 72% de lipídeos insaturados, o que confere uma maior versatilidade em temperaturas de refrigeração em relação à maioria dos micro-organismos. Essas alterações na estrutura celular, para a manutenção do fluxo fisiológico da membrana e da atividade enzimática, acompanham outros mecanismos importantes para o crescimento de bactérias a temperaturas baixas, como a síntese de solutos compatíveis e a manutenção da integridade estrutural de macromoléculas e de grupos de macromoléculas, incluindo os ribossomos e outros componentes que afetam a expressão gênica, participando conjuntamente na adaptação dessas células a temperaturas baixas.

Algumas estirpes de *Pseudomonas* spp. produzem simultaneamente, diferentes tipos de enzimas hidrolíticas, sendo as mais estudadas as proteases, lipases e fosfolipases. As diferenças individuais na atividade enzimática extracelular das estirpes são provavelmente relacionadas a um grupo genético em particular (ERCOLINI *et al.*, 2009).

As proteases de origem microbiana, em específico, aquelas provenientes do gênero *Pseudomonas* spp. são estáveis a altas temperaturas, assim resistem à tratamentos térmicos, como a pasteurização e até mesmo o tratamento UAT. A inativação de cerca 90% da atividade dessas proteases extracelulares, de *Pseudomonas* spp., pode ser alcançada pelo tratamento térmico a 72°C, por quatro a cinco horas ou, a 120°C, por sete minutos. Porém

estes processos são de enorme prejuízo para as propriedades sensoriais e físico-químicas do leite (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

As enzimas produzidas pelas *Pseudomonas*, durante o armazenamento do leite cru sob refrigeração, mantém sua atividade hidrolítica máxima. No entanto, várias destas enzimas possuem a capacidade de manter atividade hidrolítica entre 60 a 70% após a pasteurização, e 30 a 40% após o processo de esterilização comercial do leite (SAMARŽIJA *et al.*, 2012).

Segundo Mitchell *et al.* (1986), a termorresistência dessas proteases não pode ser associada apenas as sequências de aminoácidos da proteína, mas também a força de estabilização das interações entre os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e a proteína, o que confere uma proteção parcial contra a desnaturação da enzima, e conseqüentemente estabilização da conformação nativa da molécula.

No trabalho de Jensen *et al.* (1980) e, Gobbetii e Corsetti (1995), foram avaliados os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  sobre a atividade da protease de *Pseudomonas* MC60 a 45°C, porém apenas o íon  $\text{Ca}^{2+}$  proporcionou uma restauração do efeito de inativação a altas temperaturas. Os fatores que estabilizam as enzimas termorresistentes de bactérias psicotróficas, descritos por Sørhaug e Stepaniak (1997), também incluem pontes salinas, pontes de hidrogênio, sítios de ligações  $\text{Ca}^{2+}$  e a presença de um centro hidrofóbico expandido.

Foi constatado no trabalho de Gillis *et al.* (1985) que um índice de proteólise detectável no leite não requer uma população considerável de psicotróficos, sendo constatado um decréscimo de 10% a 20% na concentração de  $\kappa$ -caseína, após dois dias de estocagem a 5°C do leite contendo população de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Pseudomonas* spp. Cousin *et al.* (1977) apud Pinto (2004), constatou uma importante hidrólise das frações caseínicas a partir de leite que apresentava contagens superiores a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> de micro-organismos psicotróficos, com o comprometimento da produção de queijos, pela redução aproximada de 5% em sua produtividade.

Mesmo com diversos trabalhos que enfatizam a importância do estudo e quantificação dos psicotróficos no processamento de leite, as legislações vigentes ainda não contemplam qualquer parâmetro para a contagem do número de unidades formadoras de colônias destes micro-organismos. Portanto, no Brasil não existe uma regulamentação sobre a qualidade

microbiológica, relacionada à microbiota psicotrófica do leite *in natura* destinado à fabricação de produtos lácteos.

### 3.6. Proteases no leite

As proteases relacionadas ao leite propiciam de forma mais intensa a hidrólise das caseínas, principalmente por serem as maiores proteínas do leite, por outro lado, as proteínas consideradas como menores e pertencentes ao soro, como as  $\alpha$ -lactoalbuminas e  $\beta$ -globulinas, são pouco hidrolisadas por ação das enzimas. Dentre elas, as proteases são classificadas como naturais (endógenas) ou bacterianas (exógenas), atuando nas subunidades da caseína, o que afeta a qualidade do leite e seus respectivos derivados.

As enzimas endógenas mais importantes do leite pertencem especialmente aos grupos óxido-redutases e hidrolases. Destacam-se as sulfidiloxidasas, xantina oxidase, catalase, peroxidase, fosfatases (ácida ou alcalina), amilases, plasmina e lisosima. Além disso, algumas destas enzimas são utilizadas no controle de qualidade do leite, como exemplo, a fosfatase e a peroxidase que são indicadoras eficientes na avaliação do tratamento térmico aplicado ao leite (VALSECHI, 2001).

As proteases bacterianas atuam, principalmente, sobre a  $\kappa$  e  $\beta$ -caseína, sendo a  $\kappa$ -caseína a mais hidrolisada por estar mais exposta a ação das proteases, pelo seu posicionamento na periferia da micela. A  $\beta$ -caseína é também hidrolisada com o processo de resfriamento e armazenagem do leite, pois essa fração caseínica, dissocia-se e separa-se do interior da micela de caseína em temperaturas de refrigeração. Assim, o processo de armazenamento do leite refrigerado, pode tornar as frações de  $\beta$ -caseína mais susceptíveis à proteólise (SANTOS et al., 1999; CHEN *et al.*, 2003).

Esses problemas são mais graves no Brasil, considerando que atualmente, muitas propriedades onde a matéria-prima ainda não é obtida de forma higiênica, o que contribui para a sua baixa qualidade. Nesta indicação, os micro-organismos psicotróficos e suas enzimas prevalecem associados ao resfriamento do leite em tanques de expansão, o que pode gerar problemas relacionados à perda da estabilidade proteica (NETTO, 2012).

A redução da estabilidade do leite UAT a partir de certo período de estocagem deve-se à desestabilização, principalmente, da caseína do leite, que pode ocorrer naturalmente por desarranjos moleculares, ou por aceleração desses por proteases produzidas por micro-organismos psicrófilos e/ou pela plasmina gerada por ativadores de plasminogênio produzidos pelas células somáticas (CORASSIN *et al.*, 2013)

Um dos principais fatores que causam a proteólise do leite, além das proteases microbianas é a ação da plasmina, enzima que normalmente encontra-se associada à fração da caseína do leite. O plasminogênio, que também está presente no leite, pode ser prontamente ativado por ativadores de plasminogênio (RICHARDSON, 1983).

Segundo Vert e Bardano (1991), qualquer fator que converta o plasminogênio em plasmina, resulta na proteólise da caseína, e proporciona um impacto negativo na funcionalidade da proteína do leite. Os constituintes das células somáticas são capazes de realizar esta conversão. A ativação de plasminogênio no leite é promovida, principalmente, pela presença das células somáticas. Isto se confirma pelo fato de os leucócitos do sangue bovino e as enzimas bacterianas extracelulares não serem capazes de converter o plasminogênio em plasmina.

As concentrações de plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio no leite são relativamente baixos no início da lactação. Para o leite considerado normal, pode-se observar uma pequena taxa de ativação de plasminogênio para plasmina, no entanto esta taxa é mais observada em amostras de leites com altas contagens de células somáticas (DE RHAN e ANDREWS, 1982).

Fajardo-Lira e Nielsen (1998) verificaram que o sistema plasmina-plasminogênio do leite pode ser afetado pela hidrólise da micela de caseína por atividade de proteases de *Pseudomonas*, resultando na liberação de plasmina ligada à fração de caseína para o soro, comprometendo o processo de fabricação de queijos, considerando a importância da plasmina no desenvolvimento de características sensoriais no produto. Portanto, as proteases bacterianas atuam tanto diretamente como indiretamente com o sistema plasmina-plasminogênio sobre a qualidade do leite e derivados.

A gelificação do leite UAT pode ocorrer em baixa concentração de plasmina ( $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a qual age, preferencialmente, sobre a  $\alpha$  e  $\beta$ -caseína, durante o período de estocagem em temperatura ambiente (PINTO *et al.*, 2013).

O leite pasteurizado possui uma maior atividade do ativador de plasminogênio em relação ao leite cru, diferença esta atribuída à desnaturação de um inibidor do ativador de plasminogênio pela pasteurização. Os ativadores de plasminogênio se mantêm estáveis independentemente do pH e temperatura e estão predominantemente associados à fração de caseína no leite (POLITIS *et al.*, 2004).

Segundo Sgarbieri (2005), a plasmina tem sido extraída da caseína precipitada por ácidos e parece estar preferencialmente associada com a  $\kappa$ -caseína. Apresenta um amplo espectro de pH ótimo (pH 6,5 – 9,0), sendo a  $\beta$ -caseína a mais suscetível a ação hidrolítica desta enzima, seguida da  $\alpha_1$  e de  $\kappa$ -caseína. Provavelmente, esse é o mecanismo responsável pela formação de  $\gamma$ -caseínas, a partir de  $\beta$ -caseína. No seu estado livre, essa enzima é inativada pelo tratamento térmico de  $80^\circ\text{C}$ , por 10 minutos, porém no leite sua resistência térmica pode tornar-se maior. A sua prevalência durante o processamento do leite e na cura dos queijos pode ser de grande importância para a estabilidade e a qualidade do produto.

Segundo Law *et al.* (1977), a estocagem de leite cru por prolongados períodos antes do processamento aumenta a probabilidade do crescimento de bactérias psicrófilas, com consequente produção de enzimas termorresistentes capazes de causar deterioração de produtos lácteos. *P. fluorescens* AR11 produz proteases resistentes ao tratamento UAT, que provocam a gelificação em um período de tempo dependente da extensão do crescimento do micro-organismo antes do tratamento térmico. Na pesquisa conduzida pelos autores, a ação das proteases causou uma extensiva clivagem da  $\kappa$ -caseína em para- $\kappa$ -caseína de uma forma similar àquela da quimosina, e a  $\beta$ -caseína foi também quebrada rapidamente, enquanto a  $\alpha$ -caseína foi degradada lentamente.

Sørhaug e Stepaniak (1997) demonstraram que a estocagem do leite a frio suprime o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido, mas

proporciona a seleção de micro-organismos psicotróficos produtores de proteases, que afetam predominantemente a  $\kappa$ -caseína, enquanto que a  $\beta$ -caseína e a  $\alpha$ -s-caseína são menos susceptíveis. A pasteurização e/ou outros tratamentos subsequentes inativam a maioria destes micro-organismos, mas proteases e lipases extracelulares termorresistentes produzidas por eles representa um papel importante na deterioração do leite e alguns derivados durante o período de estocagem.

Nörnberg *et al.* (2010) isolaram bactérias psicotróficas do leite cru refrigerado coletado em tanques de expansão e caminhões granelizados com contagens entre 4,9 a 7,8 log UFC.mL<sup>-1</sup> e 5,3 a 7,2 log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Apesar de 90% das bactérias isoladas apresentarem baixa atividade proteolítica, algumas espécies como *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* e *Aeromonas* sp. mostraram-se altamente proteolíticas. As suas proteases se mantiveram ativas mesmo após o tratamento térmico para leite UAT, e causou a sua coagulação em apenas cinco dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Durante o período de armazenamento do leite UAT foi observado uma evolução do índice proteolítico e aumento da viscosidade aparente após 60 dias de estocagem, provavelmente relacionados à presença das proteases provenientes de bactérias psicotróficas do leite cru (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

### **3.7. Problemas tecnológicos relacionados às proteases do leite**

A atividade residual de algumas proteases bacterianas e da plasmina tem sido associada à ocorrência de sabores indesejáveis, a gelificação do leite UAT durante a estocagem e às perdas no rendimento de produção de queijo (DATTA e DEETH, 2003; BARBOSA *et al.*, 2009). Além disso, destacam-se aumento do conteúdo de água no coágulo; alterações negativas nas propriedades sensoriais; aumento do tempo para formação do coágulo; baixa taxa de enrijecimento do coágulo e defeitos de textura e elevada perda de sólidos no soro do queijo (VIEIRA, 2010).

A plasmina proporciona desestabilização da micela caseínica, o que ocasiona a associação entre essas, com aumento da viscosidade do leite e, de acordo com a sua intensidade, causa um problema considerável ao leite UAT, denominado de gelificação.

A alta contagem de micro-organismo psicotróficos também traz consequências imediatas ao leite e relaciona-se com perdas econômicas significativas e a problemas tecnológicos que comprometem a qualidade sensorial e a vida de prateleira dos derivados lácteos (Tabela 3). O controle do processo de resfriamento do leite na fazenda e a redução desses períodos prolongados de estocagem proporcionam um controle dos psicotróficos na matéria-prima, sendo até mesmo mais importantes do que os procedimentos realizados após o processamento (PINTO *et al.*, 2013).

Ferreira *et al.* (2012) inocularam uma estirpe de *P. fluorescens* 041 no leite que foi armazenamento a 4°C e posteriormente, processado para obtenção de Labneh. Foram constatadas alterações na consistência da coalhada e alta sinérese na massa do produto fermentado, que foi confirmada pela redução do teor de sólidos ao longo do tempo de incubação do leite inoculado, proporcionando, conseqüente, perda de rendimento do produto.

É inquestionável o impacto negativo que a microbiota psicotrófica pode ocasionar na qualidade do leite e de produtos lácteos. Portanto a sua presença constante no ambiente de produção e a boa capacidade de crescimento em baixa temperatura fazem deste grupo de micro-organismos uma das principais causas direta e/ou indireta da deterioração do leite e produtos lácteos.

Segundo Martins *et al.* (2005) e Pinto *et al.* (2006), o processo de gelificação de leite UHT constitui-se em um dos principais problemas que afetam a qualidade do leite fluído. Acredita-se que esta seria induzida, inicialmente, pela ação de proteases presentes naturalmente no leite e/ou provenientes de bactérias, principalmente do grupo dos psicotróficos. Estas enzimas apresentam a capacidade de degradar as caseínas e promover a agregação das micelas do leite. Portanto, seria inapropriado o processamento do leite que apresente contagem de psicotróficos tenha excedido a  $6,0 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ , pois, nesse caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares e termoresistentes (Tabela 4).

**Tabela 3.** Problemas relacionados à presença de psicrotróficos no leite cru

Produto	Defeito	Causa
Leite pasteurizado	Precipitação do leite adicionado a uma bebida quente	Atividade de fosfolipases e proteases de <i>Bacillus</i> spp., com a desestabilização dos glóbulos de gordura
	Gelificação	Proteases termorresistentes produzidas por bactérias psicrotróficas Gram-positivas e Gram-negativas ( $\sim 10^6$ - $10^8$ UFC.mL <sup>-1</sup> )
	Flavor de fruta	Síntese de ésteres por <i>P. fragi</i>
	Redução da vida de prateleira	Devido à presença de etanol de origem fermentativa no leite
	Coagulação doce	Hidrólise proteica
	Incrustação nos trocadores de calor	Ação das proteases proporciona a desestabilização térmica de proteínas
Leite esterilizado	Sabores indesejáveis, sabor amargo, sabor saponificado e rancidez	Alta concentração de ácidos graxos livres, devido à atividade de lipases termoestáveis; hidrólise de proteínas devido à atividade de proteases estáveis ao tratamento térmico
	Gelificação após uma semana de estocagem	Proteases termoestáveis de psicrotróficos Gram-positivos e Gram-negativos ( $\sim 10^8$ UFC.mL <sup>-1</sup> )
	Coagulação doce após 1-2 meses	Proteases termoestáveis de psicrotróficos Gram-positivos e Gram-negativos ( $\sim 10^4$ UFC.mL <sup>-1</sup> )
Creme e Manteiga	Sabores indesejáveis, como o sabor amargo, frutado, saponificado e rancidez	Alta concentração de lipases e proteases no leite/creme cru; contaminação pós-pasteurização ( <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus</i> spp.) Concentrações elevadas de ácidos graxos livres (C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> ; C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> )
	Sabores indesejáveis e rancidez	Atividade de lipases e proteases que permaneceram na coalhada causando alterações enzimáticas durante o período de maturação
Queijos	Baixo rendimento	Proteólise causada, principalmente, por enzimas provenientes de <i>Pseudomonas</i> spp.
	Menor tempo de coagulação	Maior concentração de aminoácidos livres (proteases bacterianas) que estimulam o crescimento da cultura <i>starter</i>
	Longo tempo de coagulação	Maior concentração de ácidos graxos livres que proporcionam a inibição das culturas <i>starter</i>

**Fonte:** Adaptado de CHAMPAGNE *et al.* (1994).

**Tabela 4:** Efeito do crescimento de psicotróficos no leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade dos produtos lácteos

Produto	Psicotróficos em leite cru (log UFC.mL <sup>-1</sup> )	Efeito sobre a qualidade
	5,9	Gelificação após 20 semanas
Leite UAT	6,9-7,2	Gelificação após 2-10 semanas com desenvolvimento gradual de sabores de sujo, amargo e envelhecido
Leite em pó	6,3-7,0	Redução da estabilidade térmica e aumento da capacidade de formar espuma em leite reconstituído
Leite pasteurizado	5,5	Sabor de qualidade inferior quando comparado com leite pasteurizado produzido com leite fresco
	6,5-7,5	Rancidez
Queijos duros	7,5-8,3	Alteração no sabor, principalmente rancidez e sabor de sabão. Redução do rendimento de fabricação
Cottage	5,0-7,8	Correlação significativa entre a contagem de psicotróficos no leite cru e sabor amargo

**Fonte:** Adaptado de SØRHAUG e STEPANIAK (1997)

### 3.8. Métodos quantitativos e qualitativos para determinação das proteínas do leite

Segundo Veloso (2001), com base na importância nutricional, funcional e a diversidade de proteínas presentes no leite, existe um alto interesse no estudo da composição desta fração. Nesse contexto, há um considerável desenvolvimento de metodologias analíticas que incluem técnicas que permitem não só a quantificação, como a separação e a identificação das proteínas e dos outros compostos nitrogenados do leite.

Várias são as metodologias utilizadas para o fracionamento das proteínas do leite, sendo empregadas metodologias para quantificação das proteínas totais, das caseínas e das proteínas do soro. No entanto, são

compostos com certa complexidade e de quantidade variável, o fracionamento é difícil e, muitas vezes, consegue-se apenas valores aproximados.

As principais metodologias são divididas em métodos que necessitam de degradação química das proteínas; métodos por fixação de corantes ou métodos colorimétricos; por espectrometria de absorção no infravermelho e ultravioleta; cromatográficos; eletroforéticos e imunológicos.

### *3.8.1. Métodos fundamentados na degradação das proteínas por via química, por fixação de corantes e espectrométricos por absorção*

Existem muitas metodologias fundamentadas na degradação das proteínas por elementos químicos, no entanto nem todos são bem aplicados de forma eficaz aos alimentos. Embora apresentem bom grau de confiabilidade e sensibilidade, estes métodos são pouco empregados, em função do tempo longo de análise e alto custo.

Com base neste princípio, o método de Kjeldahl foi publicado pela primeira vez em 1883, e continua a ser considerado um método de referência, para a determinação de nitrogênio e conseqüentemente, por meio de fatores de conversão, também de proteínas nos alimentos. É utilizado para análises de rotina, como na calibração de vários instrumentos. O princípio do método consiste, basicamente, em estimar o nitrogênio total presente no alimento, convertendo-o em protídeos, com base no fato de que todo o nitrogênio do alimento está sob a forma protéica (ESTEVEZ, 2006).

Os métodos de quantificação de proteínas com base na fixação de corantes fundamentam-se no princípio da formação de um complexo insolúvel entre um corante em quantidade conhecida e em excesso, com relação às proteínas contidas na amostra. O excesso de corante não adsorvido pela proteína, presente no sobrenadante, é quantificado espectrometricamente no comprimento de onda de absorção do corante utilizado, depois da eliminação do precipitado por centrifugação ou filtração. Portanto, quanto maior a quantidade de proteínas na amostra, menor é a densidade óptica do sobrenadante.

Na metodologia por absorção no ultravioleta (UV), o fracionamento baseia-se na propriedade dos aminoácidos aromáticos como a tirosina, o triptofano e menos significativamente a fenilalanina absorverem a luz na região do UV (280 nm), sendo muito utilizado no doseamento das proteínas do leite (VELOSO *et al.*, 2001). Esta propriedade deve-se, principalmente, ao grupamento fenol da tirosina e ao grupamento indol do triptofano e ao grupamento fenil da fenilalanina (ESTEVES, 2006).

Os métodos de detecção por fluorescência no ultravioleta também são metodologias já empregadas na quantificação de proteínas do leite, fundamentam-se na propriedade de certas substâncias possuírem grupamentos químicos capazes de apresentarem a propriedade da fluorescência. Existem dois tipos de métodos fluorimétricos no ultravioleta, sendo aqueles que se baseiam nas propriedades dos aminoácidos aromáticos das proteínas, como a tirosina e o triptofano, em absorverem a energia ultravioleta a um comprimento de onda de 278 nm e emití-las por fluorescência a 340 nm. E os que consistem na utilização de fluoróforos, que são moléculas orgânicas que emitem fluorescência a um comprimento de onda definido, fixando-se às proteínas. Nos dois métodos, a intensidade de fluorescência será sempre proporcional à concentração de proteínas da amostra estudada.

Os métodos espectrométricos de absorção no infravermelho são empregados, atualmente, como a técnica mais escolhida por laboratórios analíticos de leite cru. Sendo métodos de referência em normas analíticas internacionais, pois requerem apenas duas leituras, uma antes que um feixe de radiação passe através do meio que contém a amostra a ser analisada, e outra após, sendo relacionados com a razão entre a transmitância e a absorvância (ESTEVES, 2006).

Porém, quando tomamos como referência metodologias internacionalmente reconhecidas, devemos nos basear na mensuração do valor real, ou verdadeiro, da quantidade desta substância presente em uma matriz. A metodologia descrita por Kjeldahl, quando esta é corretamente executada, é considerada como o verdadeiro teor em nitrogênio do leite. Por outro lado, os métodos indiretos fazem uma leitura através de propriedades que são funcionalmente associadas a substância a ser quantificada, não

procede com a mensuração direta do componente, sendo então esperado para essas metodologias, a apresentação de uma correlação significativamente alta entre a propriedade quantificada e a substância alvo. Um exemplo é a leitura dos componentes do leite no infravermelho não calculam as concentrações direta e simultaneamente por meio das equações lineares pré estabelecidas, mas baseado em calibrações frequentes e necessárias, frente a métodos de referência (ESTEVES, 2006)

### 3.8.2. Métodos eletroforéticos e cromatográficos

A eletroforese tem uma aplicação importante no estudo das proteínas lácteas. É utilizada na investigação das suas variantes genéticas. A designação das caseínas derivou-se da sua análise por meio de eletroforese, sendo os componentes menores da caseína,  $\gamma^1$ ,  $\gamma^2$ ,  $\gamma^3$  e para- $\kappa$ -caseína descobertos por este método (STRANGE *et al.*, 1992).

O estudo sobre a eletroforese em gel, parte do contexto de que este método é uma das principais ferramentas para a separação e caracterização de macromoléculas, com base no fato de que as moléculas, como as proteínas, possuem carga e, portanto, são capazes de mover-se quando submetidas a um campo elétrico. A velocidade de deslocamento da molécula torna-se proporcional ao campo elétrico e à carga líquida da molécula, e torna-se inversamente proporcional ao seu raio, à distância entre os dois eletrodos e à viscosidade do meio (SILVA JÚNIOR, 2001).

Muitos estudos relacionam essa metodologia a análise das caseínas em amostras de leite ou de caseína precipitada em pH 4,6. É realizada em faixa de pH alcalino e ácido, com uréia e um agente redutor que ganha elétrons, enquanto que a análise das proteínas do soro ou de soro ácido é feita em pH alcalino sem uréia e agente redutor. É uma metodologia que permite uma boa separação entre as variantes genéticas das caseínas e a detecção de diferentes graus de fosforilação das proteínas do leite (VELOSO *et al.*, 2001).

A eletroforese capilar é um método de separação fundamentada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Esta metodologia é estudada como uma perspectiva de avaliação dos

conceitos fundamentais sobre a migração eletroforética e eletrosmótica, além de haver um grande campo de estudo dos aspectos instrumentais referentes à introdução de amostras e de detecção.

A eletroforese capilar tem sido muito difundida como uma técnica eficiente na observação do comportamento das proteínas do leite em diferentes situações experimentais e na avaliação da qualidade dos produtos lácteos. Existem diversos trabalhos que descrevem a sua utilização na análise de polimorfismos das proteínas, na avaliação da extensão dos tratamentos térmicos, na detecção de adulterações e de peptídeos derivados das proteínas durante a proteólise no leite e seus derivados (RECIO *et al.*, 1997; VELOSO *et al.*, 2002; MIRALLES *et al.*, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2010; ).

Em muitas pesquisas e trabalhos tem sido utilizada esta metodologia para avaliação das proteínas em leite, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tem proporcionado inúmeras pesquisas e trabalhos com a observação da hidrólise das proteínas do leite. Albillos *et al.* (2007) utilizaram a metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), para avaliação da ação de uma protease obtida a partir de uma estirpe de *Bacillus subtilis* sobre as caseínas de origem bovina.

No trabalho de Ortega *et al.* (2003), foi proposto a aplicação de planejamento fatorial, com uma superfície de resposta para a otimização do método de detecção de caseínas do leite de vaca, em que foi destacado o trabalho com diferentes variantes, como o tampão de pH, a tensão de corrida e diferentes aditivos poliméricos utilizados. Como resultado foi obtido com êxito as separações de variadas frações de proteínas do leite, sendo destacada a identificação de pelo menos duas variantes genéticas de  $\beta$ -caseína ( $A^1$  e  $A^2$ ), dois estados de fosforilação da  $\alpha_{s1}$ -caseína e quatro estados de fosforilação do monômero de  $\alpha_{s2}$ -caseína.

Por outro lado, a cromatografia é, fundamentalmente, um processo de separação por migração diferencial entre duas fases, sendo estabelecidas interações entre os solutos (fase móvel) e a fase estacionária. Os estudos de Datta e Deeth (2003) demonstraram um diagnóstico sobre as possíveis causas que levavam a proteólise no leite UAT, sendo discutido a utilização da RP-HPLC e o método de análise pelo uso de fluorescamina, para quantificação dos

peptídeos solúveis em TCA e em pH 4,6. Os dados demonstraram que houve diferenciação entre os produtos de ação da plasmina e das proteases de origem microbiana sobre as proteínas do leite.

O uso da eletroforese capilar torna possível avaliar a severidade do tratamento térmico através do estudo da desnaturação das proteínas do soro. Por outro lado, a presença de peptídeos no leite recentemente produzido indica que este foi obtido a partir de leite cru de baixa qualidade, e a formação de peptídeos durante o armazenamento do leite UHT, pode ser uma indicação da presença de enzimas resistentes ao calor (VELOSO, 2001).

Em outro experimento, De Noni *et al.* (2007) adotaram uma metodologia fundamentada em eletroforese capilar por zona (CZE). Foi elaborado um estudo relacionado ao grau de profundidade da proteólise em amostras de leite pasteurizado, mantidas sob refrigeração e analisadas durante seis dias. Os pesquisadores constataram um índice considerável da ação proteolítica nas frações de  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$  e, principalmente, sobre as  $\beta$ -caseínas após o tempo de estocagem, ocasionadas pela ação de enzimas endógenas, e por enzimas exógenas ativas, mesmo após o tratamento térmico.

Portanto, a inclusão da eletroforese capilar no estudo e conhecimento da constituição proteica e a causa da proteólise indesejada no leite é uma ferramenta importante na pesquisa, por proporcionar conhecimentos dos diferentes fatores que propiciam este problema na indústria laticinista, e que se torna cada vez mais importante para a qualidade do produto.

O desenvolvimento e constante aperfeiçoamento destes métodos com maior rapidez abriu novas perspectivas para a redução dos tempos de análise. Desta forma, por meio da espectrometria de massa tem-se obtido resultados promissores e de relevância para pesquisa e estudo do perfil protéico do leite de diferentes espécies, e avaliação da qualidade do leite cru e da tecnologia a ser utilizada no seu processamento.

Assim, para os estudos de determinação da massa molecular das proteínas do leite de variadas espécies, tanto para a identificação de variantes genéticas, alterações na composição dos aminoácidos e alterações químicas, como fosforilação e glicosilação; tem-se empregado o método de espectrometria de massa (MS). Este método tem proporcionado informações

importantes para caracterização das proteínas do leite, principalmente da caseína, sendo associado à técnica de HPLC com a detecção por MS.

Trujillo *et al.* (2000) aplicaram igualmente a espectrometria de massa em combinação com HPLC para a separação em linha, detecção e estudo da composição das proteínas de leite de cabra e de ovelha. As proteínas do soro que não foram bem eluídas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com a detecção por Espectrometria de Massa (HPLC-MS), foram purificadas por Cromatografia Líquida Rápida de Proteína (FPLC) e analisadas por espectrometria de massa via análise por injeção em fluxo (FIA), obtendo-se uma melhor sensibilidade na caracterização da espécie originária a que pertence este leite, assim como o estudo de processos proteolíticos no leite na fazenda ou até mesmo durante sua vida de prateleira.

No trabalho desenvolvido por Krüger (2006), foram caracterizados os peptídeos obtidos por espectrometria de massa por desorção a laser (MALDI-TOF-MS), que se baseia no registro do tempo de deslocamento dos vários peptídeos que foram ionizados por um composto ionizador. Assim, os íons menores deslocam-se mais rapidamente do que os maiores, e esta razão permite determinar as massas de cada peptídeo. Os resultados obtidos pelo método foram bem resolvidos em relação ao levantamento do perfil aminoacídico das amostras analisadas, havendo a correlação entre os dados de composição química, análise de aminoácidos e técnicas de sequenciamento. Porém, em suas conclusões, foi observado que há necessidade do aperfeiçoamento da metodologia de MALDI-TOF-MS para a presença de peptídeos fosforilados.

### 3.8.3. Métodos imunológicos

Os ensaios imunológicos vêm sendo frequentemente aplicados na indústria alimentícia para detecções qualitativas e quantitativas de diversos componentes. A suas primeiras aplicações preconizavam a detecção de proteínas específicas em concentrações muito baixas, com base em ensaios radioimunológicos desenvolvidos no campo da medicina, não sendo

extensivamente utilizados pela necessidade de utilização de marcadores radioativos (VELOSO *et al.*, 2001).

O desenvolvimento, no início dos anos 70, de ensaios imunoenzimáticos, em que os marcadores radioativos foram substituídos por enzimas, eliminou os perigos associados a técnica anterior. Assim houve uma maior aceitação para estes ensaios aplicados a análises de alimentos.

Além disso, a simplicidade relativa dos ensaios enzimáticos e a alta sensibilidade, especificidade das reações “antígeno-anticorpo”, baixos custos e à utilização de equipamento com sofisticação mais acessível, dão a estes métodos um grande potencial. Porém estas técnicas particularmente requerem muito tempo ou necessitam de uma grande quantidade de anticorpos purificados e são qualitativas ou semi-quantitativas.

O desenvolvimento das técnicas imunoenzimáticas (ELISA) constituiu uma alternativa interessante, pois estas possuem boa reprodutibilidade e uma sensibilidade mais alta do que aos métodos imunológicos em gel. Os métodos ELISA são cada vez mais utilizados na análise de produtos alimentícios devido à sua sensibilidade, baixo custo e reduzido tempo de análise podendo vir a desempenhar um importante papel no controle da autenticidade dos produtos lácteos (VELOSO *et al.*, 2001)

### **3.9. Metodologias de avaliação da proteólise do leite**

As técnicas de separação e de quantificação das proteínas do leite podem fornecer informações importantes sobre as características físico-químicas de diferentes sistemas lácteos, o que auxilia ao aperfeiçoamento tecnológico da produção de derivados de melhor qualidade e de maior vida de prateleira (COSTA *et al.*, 2011).

Entretanto, é necessário o desenvolvimento de métodos que contribuam na determinação da atividade proteolítica no leite a fim de evitar possíveis perdas de produtividade, além de possibilitar a sua destinação adequada na linha de produção, com base em fundamentos técnico-científicos mais consistentes.

Pois alguns dados não são conclusivos sobre este processo de degradação das proteínas, como o diagnóstico da estabilidade do leite, utilizado nas plataformas industriais. A estimativa da contagem populacional pode fornecer dados importantes, porém a atividade proteolítica é diferente para cada estirpe. Além de que muitas vezes, a metodologia é aplicável, mas não fornece o resultado em tempo hábil para fluxo industrial, o que limita alguns métodos para avaliação da matéria-prima na chegada à indústria.

A avaliação do grau de hidrólise é um importante meio para comparar hidrolisados entre si e, é definido como a percentagem de ligações peptídicas clivadas em relação ao seu total na molécula (BIASUTTI, 2006). A hidrólise enzimática pode ser avaliada por meio de diferentes técnicas de separação, como a eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa (CREAMER, 1991; COSTA *et al.*, 2008).

Datta e Deeth (2003) observaram que as frações peptídicas liberadas pela hidrólise das proteínas do leite por ação de proteases microbianas com menor hidrofobicidade e eluem de forma mais rápida no sistema de RP-HPLC, enquanto os peptídeos produzidos pela ação da plasmina são mais hidrofóbicos e eluem de forma mais lenta. Estes autores observaram a partir da aplicação de precipitação ácida em pH 4,6 que os peptídeos na fração do soro, utilizando-se o método de fluorescamina, representava a proteólise por atividade da plasmina, e por proteases de bactérias, enquanto que os peptídeos solúveis em TCA 12% representavam a atividade proteolítica microbiana.

Le *et al.* (2006) procuraram desenvolver um método com melhor sensibilidade para avaliação da proteólise do leite, mais especificamente do leite UAT, associada a ação das proteases endógenas e exógenas. Os autores ressaltaram não existir metodologia aplicável industrialmente para qualificação e quantificação da hidrólise das proteínas do leite. Os autores obtiveram dois grupos de peptídeos distintos, separados pelo método de RP-HPLC e pelo método da fluorescamina e constataram também que os peptídeos mais hidrofóbicos e de maior peso molecular eram provenientes da ação das proteases endógenas, enquanto as frações peptídicas de menor peso e mais

hidrofílicas eram provenientes da ação das proteases microbianas. Pois as proteases endógenas, em sua maioria, e alguns coagulantes degradam as proteínas em peptídeos de alto peso molecular, enquanto que as proteases exógenas, em sua maioria, degradam os peptídeos de alto peso molecular em frações ainda menores, os peptídeos de baixo peso molecular.

Dentre as metodologias empregadas pelos autores, o método RP-HPLC apresentou resultados com maior reprodutibilidade e mais precisos comparado ao método da fluorescamina pelo fato de permitir quantificar a massa de peptídios, enquanto o método da fluorescamina permite quantificar moles de grupos amino primários. O método de RP-HPLC estudado pode também ser utilizado para determinar a atividade das proteases microbianas por meio da análise dos peptídeos produzidos, sendo utilizado conjuntamente uma solução de TCA a 4%, tornando-se mais sensível à obtenção da extensão proteolítica.

Recio *et al.* (2000) trabalharam com a fração peptídica produzida a partir da proteólise do leite, mais especificamente da  $\kappa$ -caseína, e analisaram sua degradação associada à ação da quimosina ou de proteases produzidas pela *P. fluorencens* B52. A identificação e fracionamento das moléculas foram determinados através da metodologia aplicada com RP-HPLC, acoplada a espectrometria de massa. Os autores encontram frações peptídicas idênticas as encontradas no leite UHT estocado por longas datas e deduziram que as proteases produzidas por micro-organismos psicotróficos também clivam a caseína na ligação 105-106, sendo menos específicas do que a quimosina, o que sugere que a presença de caseinomacropéptideo (CMP) não é um indicador exclusivo de fraude em leite com soro de queijo.

A proteólise do leite de natureza microbiana é um problema atual para as indústrias de laticínios no Brasil. Porém, os métodos empregados para mensuração da atividade proteolítica enzimática em leite e derivados são considerados de alta complexidade e morosos, o que torna o processo, muitas vezes, ineficaz para o contexto produtivo e industrial. Portanto, a ênfase na redução do tempo de análise e da complexidade na execução das mesmas torna-se necessárias para o desenvolvimento de metodologias que possam ser concluídas de forma clara e sem dificuldades, que permitam praticidade e eficiência na tomada de decisões no contexto produtivo.

Apesar de existirem metodologias que empreguem equipamentos sofisticados, reagentes de alto grau de pureza, alta sensibilidade e eficiência na mensuração da hidrólise das proteínas do leite, metodologias mais simples e de menor sensibilidade podem corresponder aos anseios do mercado e indústrias. Assim, pode-se citar o método espectrofotométrico, que torna a observação da atividade proteolítica menos complexa e com maior agilidade para obtenção de resultados, sendo facilmente realizado na indústria de laticínios, apesar de não demonstrar uma ótima sensibilidade para detecção de concentrações baixas de proteases no leite (HULL, 1947; CHEN *et al.*, 2003).

Segundo Chen *et al.* (2003), a atividade proteolítica no leite e em produtos lácteos é comumente associada a hidrólise das proteínas do leite, com posterior liberação do aminoácido tirosina. Assim, o índice de tirosina encontrado vem sendo usado como um indicador útil da qualidade geral do leite submetido ao armazenamento sob refrigeração por longos períodos. Existem indicadores de correlação entre as concentrações de tirosina e alguns problemas tecnológicos como gelificação do leite UHT, sabores indesejáveis característicos de proteólise, problemas na coagulação e maturação de queijos, entre outros (CHAMPAGNE *et al.*, 1994; PINTO, 2004)

No trabalho de Guven *et al.* (2005), as concentrações altas de tirosina correlacionaram com a degradação proteica em iogurte, como a presença de sabor amargo devido ao excesso de proteólise. O sabor amargo observado nas amostras ocasionou uma sobreposição ao sabor característico do iogurte, e mascarou a presença do acetaldeído, e conferiu problemas sensoriais ao produto.

A partir da inoculação de uma enzima purificada de *P. fluorescens* P26 em leite desnatado, previamente esterilizado, e mantido a 4°C, por 30 dias, foi observado o desenvolvimento de sabor desagradável, seguido por sabor amargo. A evidência de proteólise avançada foi constatada pela presença considerável de tirosina e triptofano livre no leite, estando diretamente relacionadas com a presença de sabor amargo (MAYERHOFER *et al.*, 1973). Os autores reportaram que 0,2 unidades da enzima adicionada a amostra de leite foi capaz de ocasionar problemas relacionados ao aroma e sabor do produto.

Pinto (2004) avaliou o grau de proteólise do leite, com base na determinação das concentrações de tirosina ( $\text{mg}\cdot\text{5mL}^{-1}$ ), em leite desnatado reconstituído 12%, sendo inoculado com duas diferentes estirpes de *P. fluorescens* (07A e 041). O autor constatou concentrações invariáveis até que a população bacteriana atingisse  $10^8$  UFC/mL, o que coincidiu com o início da fase estacionária de crescimento em diferentes temperaturas de refrigeração empregadas para as amostras. O mesmo autor observou que o menor valor de tirosina necessário para a perda da estabilidade térmica do leite foi de, aproximadamente  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{5mL}^{-1}$  de leite, sugerindo que este valor pode constituir em um parâmetro para o setor industrial, para indicar a qualidade no que se refere a propensão de perda de estabilidade térmica e alta população de psicrotróficos proteolíticos, superior a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Em busca de metodologias que apresentem resultados mais rápidos, com praticidade e baixo custo, a fim de facilitar a quantificação de tirosina em amostras de leite, propõe-se a avaliação de metodologias utilizadas na área clínica, para determinação de mucoproteínas em soro sanguíneo, com base na determinação de tirosina.

De acordo com Picheth *et al.* (2002), em processos inflamatórios agudos, decorrentes de infecções, danos teciduais ou de outros estímulos, causa o aumento da concentração de várias proteínas séricas no soro sanguíneo, designadas como proteínas da fase aguda. As mucoproteínas enquadram-se no grupo das glicoproteínas. A dosagem da sua concentração de tirosina sérica tem grande importância em patologia clínica, no diagnóstico diferencial de infecções, sobretudo como indicativa de atividade inflamatória.

As mucoproteínas são compostas de proteínas e carboidratos, presentes nas frações globulínicas do soro. São incluídas na sua constituição uma variável de hexosaminas (glicosilamina e galactosamina), em teores superiores a 4%, sendo de grande interesse clínico a alfa-1-glicoproteína e a alfa-2-macroglobulina (WINZLER *et al.*, 1948).

Winzler *et al.* (1955) desenvolveram um método que tornou-se amplamente utilizado para a quantificação de mucoproteínas em soro sanguíneo. A metodologia baseia-se na separação da mucoproteína por precipitação seletiva com ácido perclórico e posterior quantificação

colorimétrica, com base no quantitativo de tirosina presente na fração isolada. A técnica inclui na primeira fase, as proteínas séricas, exceto as mucoproteínas, precipitadas por meio do ácido perclórico e separadas por filtração. Na segunda fase, as mucoproteínas são precipitadas por ácido fosfotúngstico e separadas pelo processo de centrifugação. E na terceira fase é feita a determinação colorimétrica das mucoproteínas pela solubilização com o carbonato de sódio e o reagente de Folin-Ciocalteu.

O doseamento de mucoproteínas se assemelha com a metodologia descrita por Hull (1947), basendo-se na determinação colorimétrica de tirosina presente nas amostras, sendo observado o uso de alguns reagentes e procedimentos diferentes entre eles, como as soluções de precipitação e de solubilização.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Análises Físico-Químicas de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Câmpus Rio Pomba; e também no Laboratório de Qualidade do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa - Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora.

### **4.1. Coleta das amostras de leite cru granelizado**

Durante o período de 11 de março à 29 de agosto de 2013 foram coletadas amostras de leite cru de 17 tanques, localizados na comunidade do Bom Jardim, no município de Rio Pomba - MG, com 4 repetições.

As amostras foram coletadas em frascos esterelizados, de material plástico, com tampa rosqueável, contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para as destinadas à determinação composicional e contagem de células somáticas. Aos frascos das amostras destinadas à contagem total de bactérias foram incluídos o conservante azidiol (mistura de azida sódica e cloranfenicol), sendo os mesmos, fornecidos pelo Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa – Gado de Leite. Além disso, foram coletadas amostras de 250 mL de leite em frascos de vidro, tipo Schott<sup>®</sup>, para a contagem de psicotróficos e psicotróficos proteolíticos, avaliação da estabilidade ao teste do álcool, índices de proteólise e valores de tirosina no leite.

Durante as coletas, foi determinada a temperatura do leite com termômetro de mercúrio, além da medição do volume de leite contido no tanque com auxílio de régua específica para cada tanque.

Durante o transporte, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo reciclável, para que a temperatura das mesmas não ultrapasse 7°C (BRITO *et al.*, 2007). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Câmpus Rio Pomba, e para

o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite para análise posterior. Sendo executadas as análises em no máximo 48 horas após a coleta das amostras.

#### **4.2. Caracterização da qualidade higiênico-sanitária e composicional do leite cru granelizado**

A contagem de células somáticas e de bactérias totais foram realizadas de acordo com a metodologia de citometria de fluxo nos equipamentos SomaCount FCM (Id.: 82015) e BactoCount IBC (Id.: 1109), respectivamente de acordo com IDF (1995). As análises relativas à composição centesimal do leite (extrato seco total e desengordurado, gordura, lactose e proteína), foram realizadas por método de espectrometria de absorção no infravermelho médio, no equipamento Bentley FTS (Id.: 85015), de acordo com IDF (1996).

A população de micro-organismos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos foi determinada de acordo com FRANK *et al.* (1993), no laboratório do IF Sudeste MG – Câmpus Rio Pomba. Após a realização das diluições decimais das amostras do leite cru, essas foram plaqueadas em Agar para Contagem Padrão (PCA), acrescido de Leite em pó desnatado reconstituído à 10% (PCA+LDR 10%). As placas foram incubadas a  $6,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , por 10 dias.

#### **4.3. Isolamento e seleção dos micro-organismos psicrotróficos proteolíticos**

Para a obtenção da coleção de cultura dos isolados psicrotróficos proteolíticos, três a cinco colônias das maiores diluições das placas contendo bactérias psicrotróficas proteolíticas de cada amostra, foram selecionadas por meio da observação da presença de halo de clarificação e/ou de precipitação da caseína no meio de cultura PCA+LDR 10%. Os isolados obtidos foram conservados congelados em freezer a  $-16^{\circ}\text{C}$ , em Caldo Trypticaseína e Soja – TSB, adicionado de 20% de glicerol. Quando necessário, foi feita a ativação dos isolados em caldo TSB, com incubação a  $25^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas.

Após o isolamento das estirpes, procedeu-se a sua inoculação em PCA+LDR 10% e incubação a 4; 6,5; 10 e 25°C. Posteriormente, com o auxílio de um paquímetro, foram determinado o diâmetro do halo proporcionado pela proteólise para cada estirpe isolada, em diferentes tempos de incubação, 24; 48; 72; 96 e 120 horas.

#### **4.4. Determinação da proteólise, atividade proteolítica e do grau de proteólise das amostras de leite cru granelizado**

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Câmpus Rio Pomba.

##### *4.4.1. Determinação da proteólise do leite cru granelizado*

A avaliação da proteólise do leite foi realizada por meio da determinação do percentual de proteína total por meio da quantificação do nitrogênio total (NT); o percentual de proteínas relacionadas ao soro de leite, através do nitrogênio solúvel em pH 4,6 ( $NS_{pH4,6}$ ); o percentual de peptídeos e aminoácidos contidos no leite, pela mensuração do nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% ( $NS_{TCA12\%}$ ); e o percentual de caseína nas amostras, foi obtido pela diferença entre o percentual de nitrogênio total (NT) com o do nitrogênio solúvel em pH 4,6 ( $NS_{pH4,6}$ ). Sendo esta metodologia empregada, descrita pelo método primário de Kjeldahl (AOAC, 1995).

Para quantificação do NT, foi pesado cerca de 2 gramas do leite *in natura* em tubo de micro-Kjeldahl.

A determinação de  $NS_{pH4,6}$  foi realizada a partir do tratamento de 100 mL da amostra de leite cru com 10 mL de solução de ácido clorídrico ( $HCl$   $1,41mol.L^{-1}$ ). A mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Posteriormente procedeu-se a filtração através de algodão hidrófilo, e o filtrado foi reservado para o prosseguimento da análise.

A determinação do  $NS_{TCA12\%}$  foi realizada a partir do tratamento de 50 mL da amostra de leite cru com 50 mL de solução de TCA 24% S.R. A mistura

foi mantida em repouso por 15 minutos para, posteriormente proceder a filtração através de algodão hidrófilo. O filtrado foi também reservado para o prosseguimento da análise.

Os filtrados provenientes das suspensões foram usados para determinação de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). Pesou-se 5 gramas de cada filtrado para cada tubo. Por meio desta método, foram obtidos os percentuais de proteínas relacionadas ao soro de leite, e de peptídeos e aminoácidos contidos nas amostras. Para o cálculo dos índices de extensão e profundidade da proteólise do leite cru foi adaptado o método citado por DePeters e Cant (1992), que descreveram o índice de extensão da proteólise (IEP), que representa a relação entre a porcentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a porcentagem de nitrogênio total da amostra (Eq. 1) e o índice de profundidade da proteólise (IPP) que trata-se da relação entre a porcentagem de nitrogênio não protéico, solúvel em ácido tricloroacético 12% e a porcentagem de nitrogênio total da amostra (Eq. 2).

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\text{NS}_{\text{pH4,6}} (\%)}{\text{NT (\%)}} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

$$\text{IPP (\%)} = \frac{\text{NS}_{\text{TCA12\%}} (\%)}{\text{NT (\%)}} \times 100\% \quad \text{Eq. 2}$$

#### 4.4.2. Determinação da atividade proteolítica

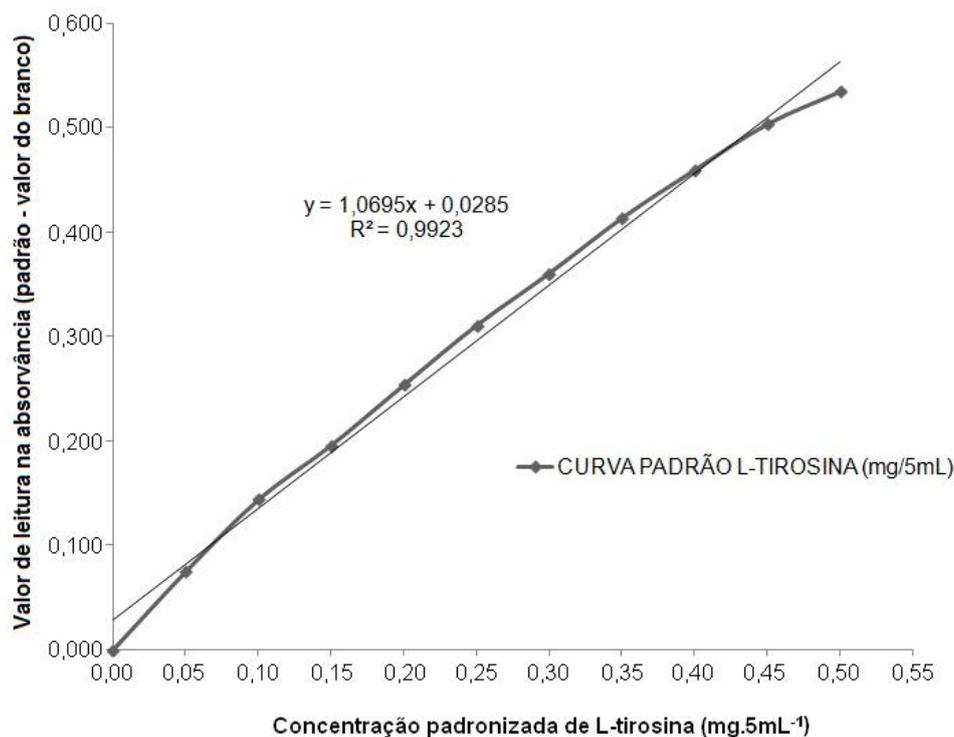
A atividade proteolítica foi determinada a partir de um substrato como indicador da reação de hidrólise proteica do leite, a azocaseína, como descrita por Nörnberg *et al.* (2010). Um volume de 100 µL do leite cru granelizado foi adicionado de 100 µL de solução tampão 0,1 g.mol<sup>-1</sup> de fosfato de sódio pH 7,0 e 100 µL de solução de azocaseína, com concentração de 10 mg/mL. As soluções juntamente com o leite, foram repassadas para um tubo e a mistura foi incubada a 37 °C por 60 minutos em banho-maria (Solab, modelo SL155/22), sendo a reação interrompida após esse período, pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético 30%. A solução foi centrifugada a 10.000 r.p.m. (rotações por minuto) por 05 minutos em centrífuga (Hettich Zentrifugen, modelo Mikro 220). Posteriormente, foram retirados 800 µL do sobrenadante da

solução centrifugada, o qual foi neutralizado com 200 µL de solução de hidróxido de sódio  $1,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro (Bioespectro, modelo SP-220), em comprimento de onda ajustado para 420 nm. Em paralelo, foi preparada amostras referentes ao “branco”, a qual continha todos os reagentes utilizados no procedimento, substituindo-se o volume da amostra a ser analisada pelo mesmo volume de água destilada. A leitura obtida na amostra considerada como “branco” e na amostra a ser analisada foram anotadas. O aumento na absorvância de 0,01 por hora, da amostra de leite em relação ao branco correspondeu a uma unidade enzimática proteolítica por hora (UEP.h<sup>-1</sup>) (NÖRNBERG *et al.*, 2010).

#### 4.4.3. Determinação do grau de proteólise pelo método descrito por Hull

O grau de proteólise foi determinado conforme Hull (1947). Uma alíquota de 10 mL de ácido tricloroacético  $0,72 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  foi adicionada a 5 mL de amostra de leite cru. Após a homogeneização, e posterior repouso por 10 minutos, foi realizada a filtração em papel de filtro qualitativo (Papel filtro Qualy, marca J.Prolab, gramatura de  $80\text{g}/\text{m}^2$ ). Cinco mililitros do filtrado foi adicionado em 10 mL de solução de carbonato de sódio e hexametáfosfato de sódio (solução preparada a partir de 75 gramas de carbonato de sódio e 10 gramas de hexametáfosfato de sódio, completando-se o volume em balão volumétrico para 500 mililitros) que foi mantida em banho-maria (Solab, modelo SL155/22), a 40°C. Após 10 minutos, foram adicionados 3 mL de reagente fenólico (reagente de Folin-Ciocalteu), sob constante agitação. Após cinco minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 650 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em seu equivalente de tirosina, empregando-se uma curva padrão, previamente preparada com soluções de concentrações conhecidas, tendo seus resultados expressos em miligramas de tirosina por 5 mL de leite (PINTO, 2004). A curva padrão (Figura 2) constituída com base na análise de soluções previamente preparadas de L-tirosina, de acordo com a metodologia descrita por Hull (1947).



**Figura 2:** Curva padrão utilizada na quantificação de tirosina ( $\text{mg}\cdot 5\text{mL}^{-1}$ ) do leite cru.

#### 4.4.4. Determinação do grau de proteólise, pelo método de quantificação de tirosina em função de mucoproteínas

A metodologia de quantificação de mucoproteínas seguiu a reação de determinação colorimétrica praticada por Winzler *et al.* (1948), que corresponde a um teste colorimétrico para dosagem de mucoproteínas em soro sanguíneo. Utilizou-se o kit comercial da empresa Laborclin, Teste para Mucoproteínas - Linha Bioliquid.

Esta técnica foi mantida de acordo com o fabricante, sendo dividida em três fases distintas, sendo que na primeira, as proteínas séricas, exceto as mucoproteínas, foram precipitadas, pela mistura de 1 mL de leite com 4 mL de solução desproteinizante (ácido perclórico  $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e com 2,5 mL de solução fisiológica em um tubo de ensaio. A solução foi homogeneizada e, posteriormente, foi mantida em repouso por 10 minutos, e filtrada em papel filtro qualitativo (Papel filtro Qualy, marca J.Prolab, gramatura de  $80\text{g}/\text{m}^2$ ).

Na segunda fase, 3 mL do filtrado foi transferido para outro tubo de ensaio, seguido da adição de 0,5 mL da solução precipitante (ácido

fosfotúngstico  $8,7\text{mmol.L}^{-1}$  em ácido clorídrico  $2,0\text{ mol.L}^{-1}$ ) e agitado, e mantido em repouso por 15 minutos. Em seguida foi realizada a centrifugação das amostras a 2.500 r.p.m., por 10 minutos, em microcentrifuga (Centribio, modelo 80-2B), com descarte do sobrenadante para retirada do excesso do líquido.

Na terceira fase foi feita a determinação colorimétrica das mucoproteínas, a partir da tirosina contida nas amostras. Primeiramente, foi adicionado 5 mL do solvente alcalino (solução de carbonato de sódio  $0,85\text{ mol.L}^{-1}$ ) ao tubo com o precipitado. Em seguida foi realizada a homogeneização entre o solvente e o precipitado. Posteriormente, foi adicionado 0,2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2N, e o tubo foi incubado em um banho-maria (Solab, modelo SL155/22) a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos. Para a amostra considerada como “branco”, foram adicionadas apenas a solução solvente e reagente de Folin-Ciocalteu nas mesmas quantidades indicadas para a amostra de leite. Para análise da amostra considerada como “padrão” conhecido (solução de L-tirosina a  $5\text{ mg.5mL}^{-1}$ ), foram adicionadas a mesma solução solvente e o reagente de Folin-Ciocalteu, nas mesmas quantidades indicadas para a amostra de leite e “branco”.

Posteriormente, foram feitas as leituras em espectrofotômetro (Bioespectro, modelo SP-220), em comprimento de onda, ajustado para 680 nm. A relação entre a leitura da amostra a ser analisada, o “branco” e o “padrão” fornecido pelo kit-teste forneceu o valor de miligrama de tirosina mucoproteica em 5 mililitros de amostra analisada (Eq. 3).

$\frac{5\text{ mg.5mL}^{-1}\text{ em tirosina mucoproteica}}{= \frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância "branco"} \times 0,25}{\text{Absorvância do "padrão"}}$	Eq. 3
--	-------

#### 4.5. Teste de estabilidade do leite cru ao álcool

Dois mililitros da amostra de leite cru foram homogeneizados com 2 mililitros da solução de álcool 72% v/v., em placas de Petri. A observação de grumos nas placas foi considerada como resultado “positivo” para o teste. As amostras foram avaliadas quanto a sua estabilidade ao álcool 72 °GL (v/v.), de

acordo com a metodologia sugerida pela Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006).

#### **4.6. Análise estatística**

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de forma aleatória em 17 tanques de expansão, em quatro momentos distintos. Cada coleta foi considerada como uma única repetição.

Os dados referentes aos índices composicionais do leite, extensão e profundidade da proteólise, tirosina, atividade proteolítica, volume e temperatura do leite no momento da coleta e algumas características microbiológicas (CBT, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos) e a CCS, foram tabulados e analisados em sistemas de computação estatística SPSS® (versão 20.0), Epi Info 3.5.3, sendo utilizado para elaboração de alguns gráficos e tabelas a Microsoft Excel 2007.

Inicialmente foram obtidas as médias com sua variação e seus valores de máximo e mínimo dentro de cada variável estudada. Em seguida foi feito um estudo da regressão univariada, observando as correlações entre estas variáveis. As correlações que apresentaram o nível de significância igual ou menor que 20% ( $p \leq 0,20$ ), foram selecionadas, para em outro momento, serem estudadas entre si.

O estudo sobre estas variáveis selecionadas, proporcionou um trabalho sobre a regressão multivariada, obtido pela correlação de *Pearson*. Os estudos da regressão linear, do modelo e do coeficiente linear foram avaliados pela significância estatística igual ou menor que 5% ( $p \leq 0,05$ ). O mesmo nível de significância foi também aceito para o estudo da correlação entre as variáveis explicativas sobre as variáveis estudadas, com o nível de significância igual ou menor que 5% ( $p \leq 0,05$ ).

A partir destas análises, foram obtidos modelos estatísticos multivariados, a fim de explicar as correlações entre as variáveis, sendo considerados o coeficiente de correlação e a regressão linear como resposta destas correlações, o que permitiu concluir sobre os principais fatores que influenciaram na resposta de cada variável.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Verificação da temperatura do leite cru no momento da coleta das amostras**

As amostras de leite cru apresentaram temperatura média de 8°C (Tabela 1 – Apêndice 1), o que indica sub-refrigeração do leite que pode ser associada a vários fatores como baixa eficiência de alguns tanques em proporcionar o resfriamento imediato do leite após a ordenha, falhas no dimensionamento e fabricação dos tanques, falta periódica de energia elétrica nas propriedades, desligamento dos tanques de expansão a fim de economizar energia, mistura de leite recém ordenhado com o leite gelado no tanque, dentre outros.

Um grande número de amostras, cerca de 81,1%, apresentaram temperaturas acima de 4 °C, o que não atende ao limite preconizado pela Instrução Normativa nº 62, que estabelece a refrigeração do leite cru a temperatura igual ou inferior a 4 °C, no período máximo de três horas após o término da ordenha, na propriedade rural e/ou tanque comunitário (BRASIL, 2011b).

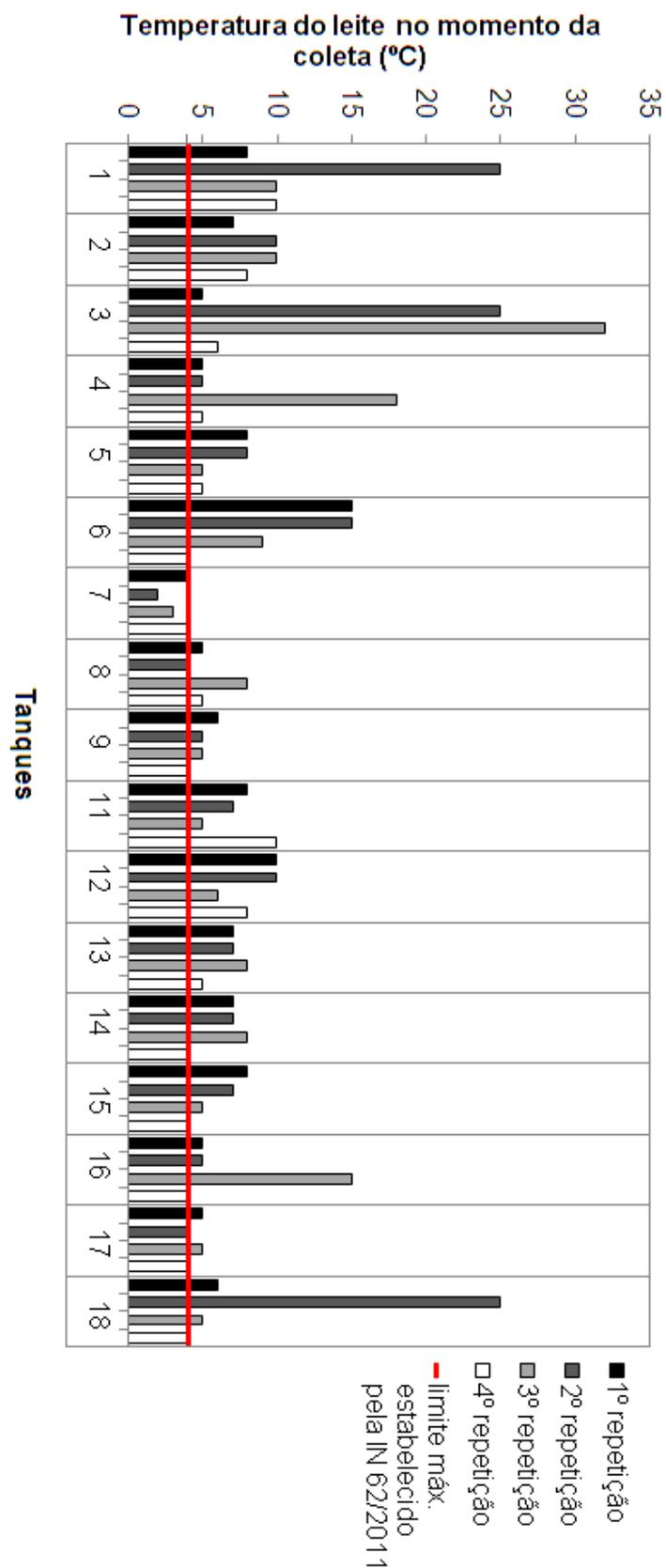
A morosidade no resfriamento do leite pelo tanque pode ocasionar a multiplicação de micro-organismos durante esse período, e acarretar prejuízos relacionados à perda de estabilidade, aceleração da acidificação do leite e aumento das contagem de micro-organismos no leite cru. Além disso, a sub-refrigeração do leite ocasiona a multiplicação intensa da microbiota psicrotrófica que irá predominar no leite cru refrigerado, produzir enzimas deterioradoras termorresistente e ocasionar vários problemas tecnológicos para a indústria de laticínios.

O processo de resfriamento do leite cru nas propriedades permite preservar seus aspectos composicionais e microbiológicos, além de minimizar as perdas econômicas relacionadas à atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Entretanto, permite a seleção de bactérias psicrotróficas (PINTO, 2004).

Segundo Arcuri *et al.* (2006), o tempo de permanência e a temperatura de refrigeração do leite cru refrigerado na propriedade rural não estão sendo observados pelas indústrias no momento da coleta a granel. Os produtores necessitam canalizar esforços para a melhoria das condições higiênicas durante a ordenha e armazenamento do leite *in natura* e na refrigeração rápida a temperatura de 4°C, para reduzir a contaminação microbiana.

Por outro lado, Izidoro *et al.* (2013), relataram que uma constância na atividade proteolítica em geral, para um mesmo micro-organismo, pode proporcionar quantidades diferentes de enzimas proteolíticas, conforme se altera o binômio tempo e temperatura de armazenamento.

Na Figura 3 apresenta-se as temperaturas do leite em cada tanque no momento da coleta e a indicação do limite máximo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2011b). Apenas o tanque 7 apresentou a temperatura de estocagem do leite igual ou inferior a 4 °C. Por outro lado, os tanques 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12 e 13 apresentaram valores acima do estabelecido pela legislação em todas as coletas. O armazenamento do leite cru em tanques de refrigeração deve ser associado permanentemente às boas práticas de manejo e higiene na ordenha, visto que por muitas vezes a coleta será feita a cada 48 horas (FONSECA e SANTOS, 1999).



**Figura 3:** Temperatura do leite cru no momento da coleta nos tanques de expansão e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b).

## 5.2. Características microbiológicas e higiênico-sanitárias do leite cru

### 5.2.1. Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total

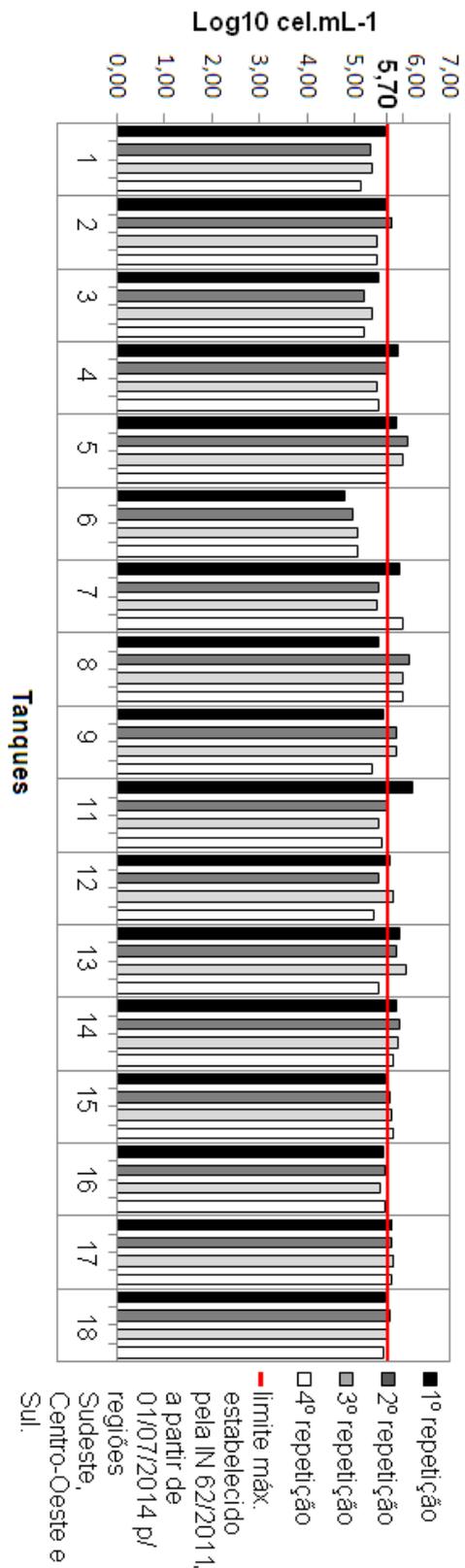
Dentro dos valores obtidos sobre a contagem de células somáticas, podemos observar um valor médio de  $5,65 \pm 0,29 \log_{10}$  células.mL<sup>-1</sup> (Tabela 5). O quantitativo de 45,6% das amostras de leite cru avaliadas, não atenderam ao limite máximo de 5,70 log células.mL<sup>-1</sup> estabelecidos pela legislação, a partir do dia 01 de Julho de 2014, para as regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul (BRASIL, 2011b), sendo elas procedentes dos tanques 2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 e 17. Por outro lado, a contagem de células somáticas dos tanques 1, 3, 6, e 16 não ultrapassou o limite estabelecido pela legislação em nenhuma das repetições (Figura 4).

Segundo Magalhães *et al.* (2006), altas contagens de células somáticas no leite não consistem em grande risco para a saúde do consumidor, devido a efetiva ação da pasteurização sobre a inativação dos patógenos. Por outro lado, algumas de suas enzimas são consideradas termorresistentes e permanecem ativas em alguns produtos lácteos. Um número considerável de células somáticas do leite é um forte indicio do aumento expressivo dos níveis de neutrófilos e macrófagos, apresentando grande variedade de enzimas proteolíticas, que são liberadas durante o mecanismo de morte intracelular de micro-organismos na mastite subclínica, e também podem contribuir de forma significativa para a proteólise no leite (SANTOS *et al.*, 2003).

Portanto, a questão econômica é a principal razão para o controle da mastite em rebanhos, tendo em vista, que para o produtor as altas contagens de células somáticas proporcionam uma redução no seu faturamento, em decorrência da redução na produção e do aumento com os gastos com medicamentos e tratamento dos animais. Por outro lado, a indústria também sofre com as altas contagens de células somáticas, que desencadeia problemas relativos ao processamento do leite e redução no rendimento, muitas vezes, em função da redução do percentual de caseína, gordura e lactose, resultando em derivados com baixa qualidade e com menor estabilidade (BRITO, 1999).

**Tabela 5:** Valores médios (n=4) com desvio padrão da contagem de células somáticas, contagem total de bactérias, contagem de micro-organismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos do leite cru

Amostras	Log CCS (células.mL <sup>-1</sup> )	Log CBT (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Log Psicotrófico (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Log Psicotrófico Proteolítico (UFC.mL <sup>-1</sup> )
n1	5,35 ± 0,22	6,02 ± 0,20	5,34 ± 0,49	3,21 ± 1,45
n2	5,61 ± 0,17	5,67 ± 0,52	5,12 ± 0,89	3,20 ± 1,38
n3	5,32 ± 0,14	5,21 ± 0,50	4,58 ± 0,36	3,79 ± 1,22
n4	5,63 ± 0,20	6,15 ± 0,22	5,42 ± 0,60	3,89 ± 1,38
n5	5,92 ± 0,19	6,05 ± 0,33	5,07 ± 0,71	2,38 ± 0,76
n6	4,98 ± 0,13	5,55 ± 0,10	5,04 ± 0,27	3,98 ± 1,35
n7	5,73 ± 0,27	5,90 ± 0,37	5,15 ± 0,40	3,79 ± 1,40
n8	5,92 ± 0,28	6,25 ± 0,31	5,57 ± 0,38	3,93 ± 1,48
n9	5,68 ± 0,24	5,72 ± 0,13	5,09 ± 0,14	3,90 ± 1,31
n11	5,75 ± 0,33	5,71 ± 0,43	4,35 ± 0,53	2,00 ± 0,00
n12	5,61 ± 0,19	5,73 ± 0,46	5,22 ± 0,21	2,75 ± 1,50
n13	5,86 ± 0,24	5,66 ± 0,68	4,88 ± 0,27	2,62 ± 1,23
n14	5,88 ± 0,05	6,43 ± 0,20	6,06 ± 0,26	3,01 ± 2,02
n15	5,75 ± 0,09	6,18 ± 0,32	5,30 ± 1,06	2,94 ± 1,88
n16	5,60 ± 0,04	6,40 ± 0,10	5,38 ± 0,69	3,56 ± 1,82
n17	5,77 ± 0,03	6,23 ± 0,16	4,52 ± 0,74	2,82 ± 1,65
n18	5,67 ± 0,06	6,48 ± 0,18	5,82 ± 0,58	2,00 ± 0,00
Média	5,65 ± 0,29	5,96 ± 0,46	5,17 ± 0,65	3,16 ± 1,38



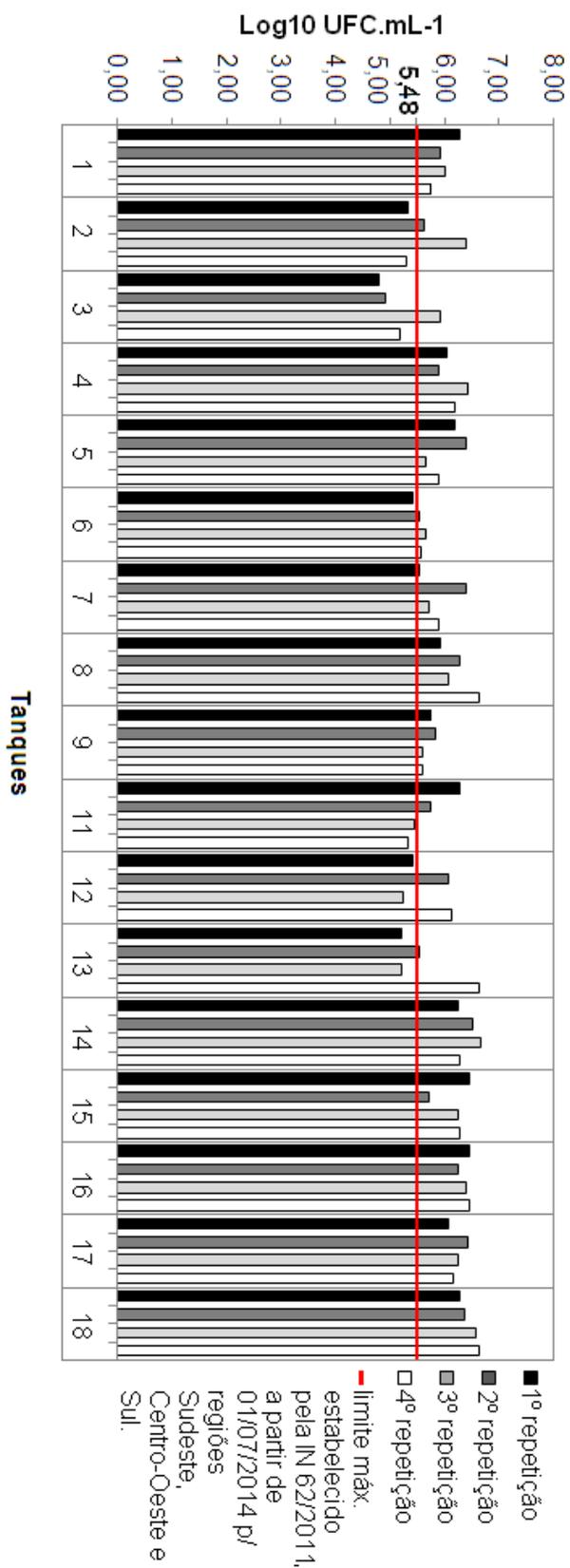
**Figura 4:** Contagem de células somáticas (Log<sub>10</sub>cel.mL<sup>-1</sup>) do leite cru e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º62 (BRASIL, 2011b).

A contagem de células somáticas, remete à saúde da glândula mamária do animal (SOUZA *et al.*, 2005). E de uma forma mais circunstancial o aumento da CCS nos meses mais quentes e úmidos se deve ao aumento da incidência de mastites subclínicas, pois a este período é atribuída uma maior dificuldade a pratica da ordenha higiênica, além do estresse térmico a que os animais são submetidos (SOUZA *et al.*, 2008).

Em relação à contagem total de bactérias das amostras de leite cru (Tabela 5), constatou-se que os resultados médios dos tanques 1, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 16, 17 e 18 não atenderam aos requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62, que estabelece o valor máximo de 5,78 log UFC.mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011b).

Foi constatada altas contagens de micro-organismos no leite, evidenciando as péssimas condições de higiene adotadas durante a obtenção e armazenamento do leite cru, bem como adoção de temperaturas de refrigeração não condizentes com as estabelecidas. Ressalta-se que durante a produção de leite de boa qualidade, devem ser tomadas todas as medidas higiênicas e de gestão possíveis na fonte de produção, desde o melhoramento genético, manejo nutricional, sanitário, na ordenha, resfriamento adequado do leite, e até o transporte rápido na temperatura adequada para as indústrias (NAKAMURA *et al.*, 2012).

Apenas 17,6% das amostras de leite cru analisadas, apresentaram valores que atendiam aos parâmetros da IN 62/2011, que estabelece o máximo de 5,48 log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>, a partir do dia 01 de Julho de 2014, para as regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul (BRASIL, 2011b). E nenhum dos tanques avaliados, apresentou resultados que atendiam o valor máximo de contagem de bactérias, em todas as repetições (Figura 5). Pinto *et al.* (2013) relatou, que do ponto de vista tecnológico, a obtenção de matéria-prima de qualidade é um dos maiores problemas no desenvolvimento da indústria laticinista brasileira.



**Figura 5:** Contagem Bacteriana Total ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação do limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa n.º62 (BRASIL, 2011b).

De uma forma geral, foi observado uma grande dispersão entre os valores de  $\text{Log}_{10}$  CBT (valor mínimo de  $4,80 \text{ log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$  ao valor máximo de  $6,23 \text{ log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) e  $\text{Log}_{10}$  CCS (valor mínimo de  $4,82 \text{ log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  ao valor máximo de  $6,67 \text{ log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) (Tabela 1 – Apêndice 1), devido principalmente, as diferentes situações que encontramos nas fazendas produtoras de leite, alguns produtores buscam melhorar a qualidade do leite e sanidade do rebanho, produzindo uma matéria prima de alta qualidade; por outro lado, ainda prevalece a falta de comprometimento, organização e vontade de alguns produtores, que não percebem a importância e os bons resultados que o trabalho bem executado durante o manejo, a ordenha e estocagem do leite, proporcionariam no contexto econômico da propriedade.

Portanto, o controle quanto aos possíveis contaminantes deve compreender todos os profissionais que compõem a cadeia produtiva do leite, tornando a responsabilidade pelos procedimentos durante a produção, transporte, industrialização, comercialização e mercado consumidor, comum a todos os profissionais da área. Considerando a produção primária, os autores ressaltam que é de fundamental importância o controle microbiológico do leite, das possíveis fontes de contaminação, dos principais micro-organismos contaminantes e dos problemas decorrentes dessa contaminação para o leite e derivados.

### 5.2.2. Contagem de micro-organismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos

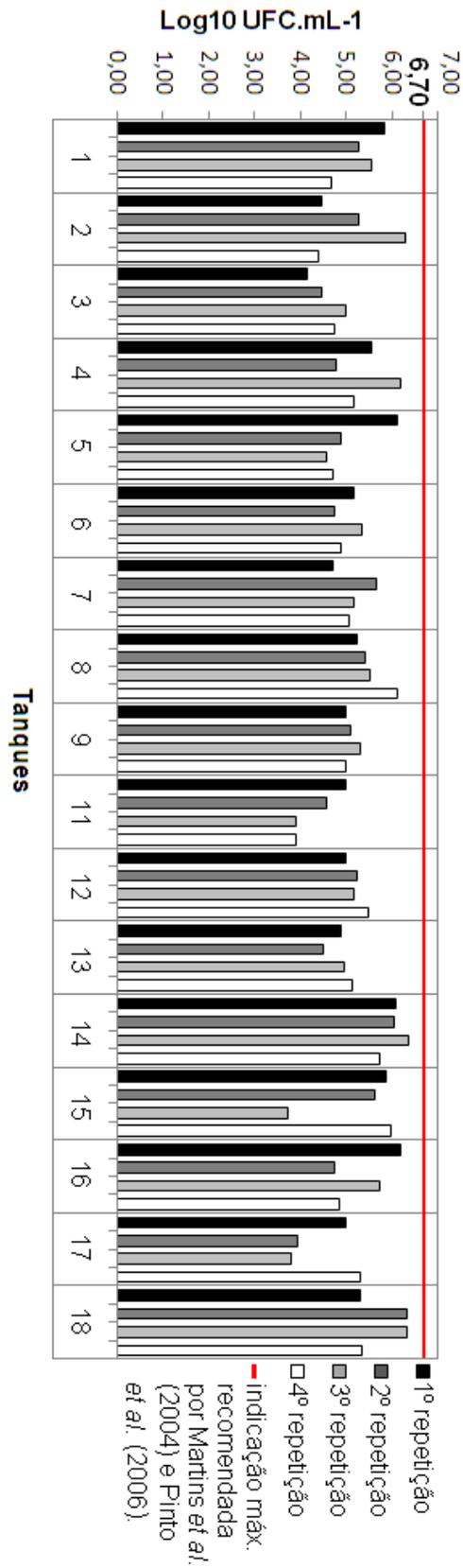
A Tabela 5 apresenta os resultados médios das contagens de micro-organismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos das amostras de leite cru, sendo que a contagem de micro-organismos psicotróficos variou de 3,73 a 6,38, enquanto a de psicotróficos proteolíticos variou de 2,00 a 6,04 (Tabela 1 – Apêndice 1).

Segundo Martins *et al.* (2004) e Pinto *et al.* (2006), seria imprudente o processamento de derivados lácteos a partir de leite cru com contagem de psicotróficos superior a  $6,70 \text{ log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$  (Figuras 6 e 7). Segundo Cousin

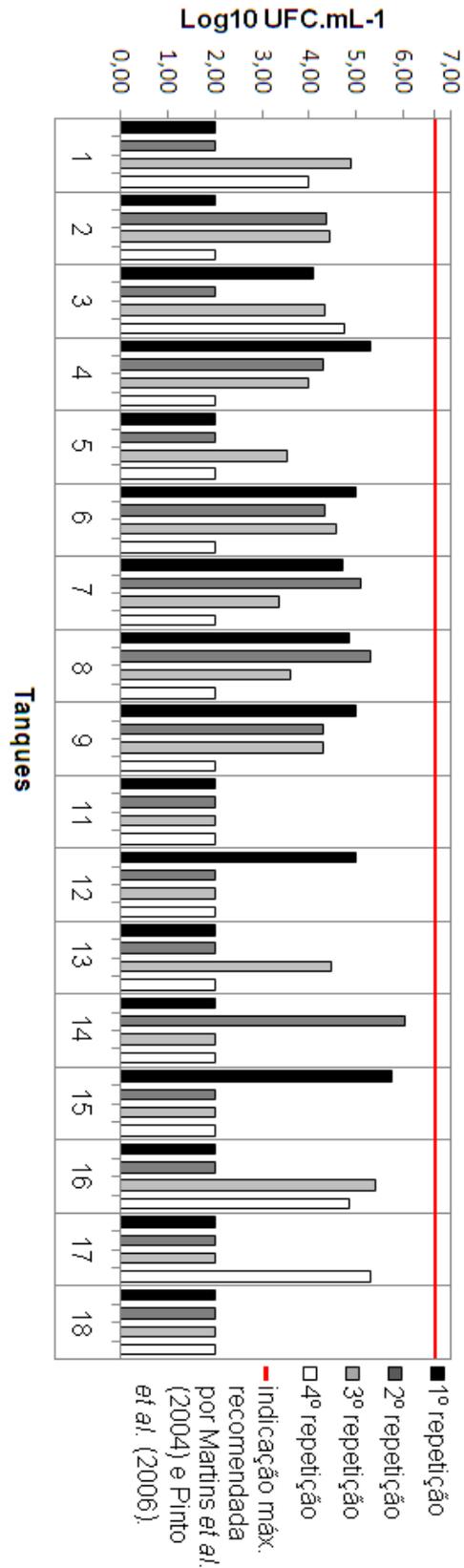
(1982), existe uma série de problemas para a indústria de laticínios associado à ação de proteases e lipases produzidas por esta microbiota como: perdas de qualidade em lácteos devido à alteração de sabor e odor, perda da consistência na formação do coágulo na fabricação de queijo e geleificação do leite longa vida. Entretanto, neste trabalho, nenhuma amostra apresentou resultado médio de contagem de micro-organismos psicrotróficos acima de  $6,70 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$  (Tabela 5).

Sørhaug e Stepaniak (1997) destacaram que as proteases de micro-organismos psicrotróficos permanecem ativas mesmo após o tratamento térmico do leite. Portanto, tornando-se importante a detecção e controle dessa classe de contaminantes, visto que muitas de suas enzimas extracelulares são termoresistentes e importantes no controle de qualidade na indústria laticinista.

Portanto, a enumeração deste tipo de micro-organismos presentes no leite, pode se tornar uma ferramenta com a proposta de controle e avaliação da ocorrência de proteólise indesejável no leite e seus derivados de uma maneira geral, devido a altas contagens de psicrotróficos estarem relacionadas a ação de proteases de origem microbiana sobre a qualidade dos lácteos.



**Figura 6:** Contagem de micro-organismos psicrotórficos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) do leite cru e indicação da contagem máxima recomendada por Martins *et al.* (2004) e Pinto *et al.* (2006)



**Figura 7:** Contagem de micro-organismos psicrotróficos proteolíticos (Log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup>) do leite cru e indicação da contagem máxima recomendada por Martins *et al.* (2004) e Pinto *et al.* (2006).

### 5.3. Características composicionais das amostras de leite cru

A Tabela 6 apresenta os valores médios dos percentuais de lactose, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, proteínas, proteínas solúveis em pH 4,6, proteínas solúveis em ácido tricloroacético 12% e caseínas das amostras de leite cru procedentes de cada tanque de expansão.

O teor de lactose das amostras de leite cru variou entre 4,03% a 4,69% (Tabela 6). Esta variação é relacionada, principalmente, ao período de lactação do animal. Fox e McSweeney (2003) relataram que a concentração de lactose no leite bovino pode variar ao redor de 4,8 g/100g de leite, com um possível aumento durante início da lactação, e conseqüente redução ao fim da lactação. Porém a observação destes valores abaixo da média sugerida, pode estar relacionada as diferentes os constantes variações genéticas do rebanho bovino, como também a subnutrição energética podem proporcionar índices menores de lactose.

A lactose é o principal carboidrato do leite, sendo também, um importante componente para o sistema regulador da pressão osmótica na glândula mamária, tendo uma influência direta na produtividade de cada animal. Segundo Bueno *et al.* (2005) e Noro *et al.* (2006), valores inferiores de lactose no leite estão relacionados à uma capacidade reduzida na síntese da lactose pelo epitélio mamário infeccionado por patógenos intramamários e também pela perda de lactose devido o aumento na permeabilidade de membrana, com a passagem da lactose presente no lúmen alveolar para a corrente sanguínea do animal, processos comuns na mastite.

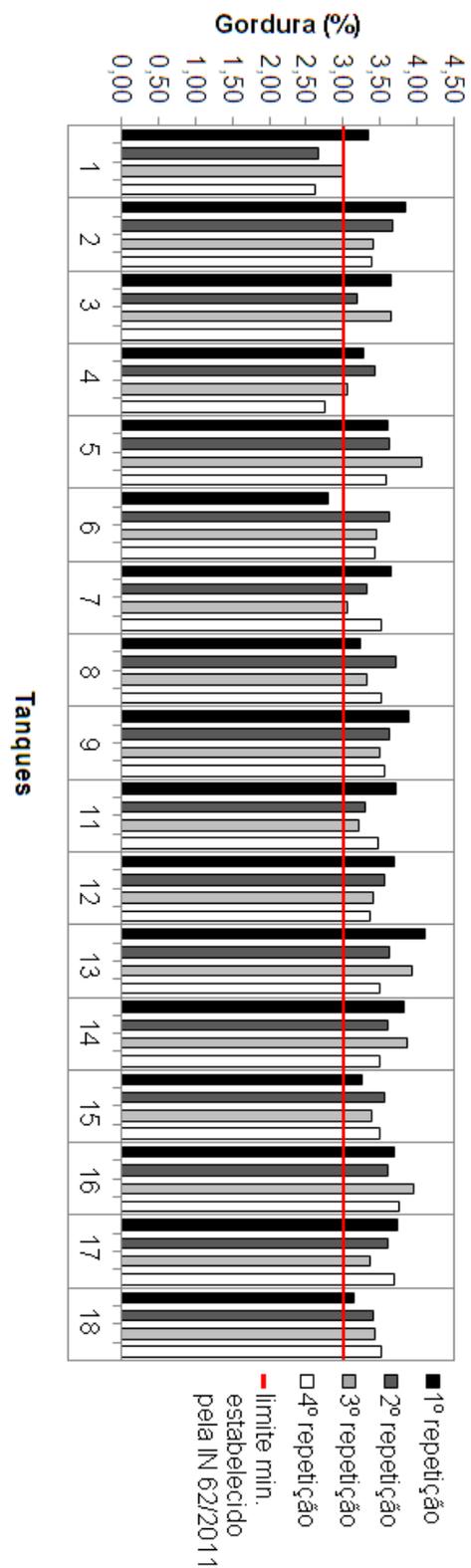
Em relação aos percentuais de gordura nas amostras de leite cru (Tabela 6), constatou-se que o resultado médio das amostras do tanque 1, não atendeu o requisito estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b), que estabelece o valor mínimo de 3,0 g/100g de leite. Observou-se também que, as amostras dos tanques 1 (segunda e quarta repetições), 4 (quarta repetição) e 6 (primeira repetição) não apresentaram (Figura 8) valores que atendiam o requisito estabelecido (BRASIL, 2011b).

Os valores médios de extrato seco total e desengordurado (Tabela 6) de todas as amostras de leite cru atenderam aos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2011b). Porém, as amostras (Figura 9) dos tanques 2 (terceira repetição), 4 (quarta repetição), 6 (primeira repetição), 11 (terceira repetição), 15 (primeira repetição) e 18 (primeira repetição) não atenderam aos requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b).

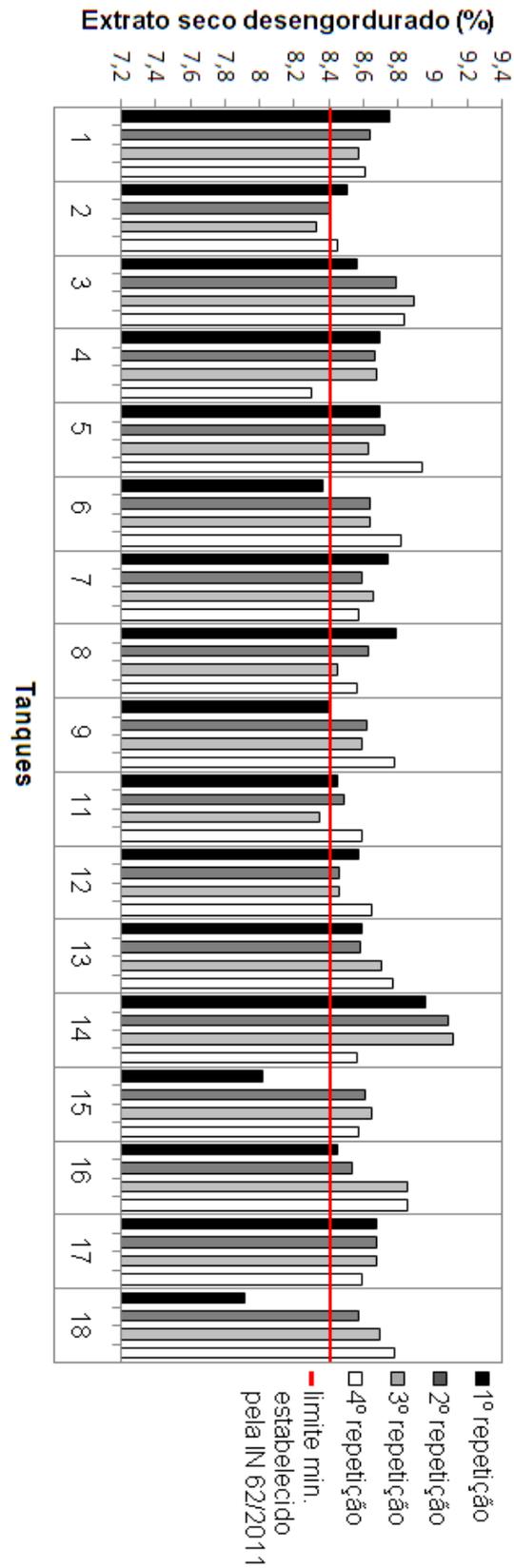
Segundo os estudos de Brito *et al.* (2009), os baixos valores de extrato seco desengordurado podem estar em concordância com aumentos do índice crioscópico e de CBT das amostras, pois a falta de higiene no processo de obtenção para alguns rebanhos, torna-se um risco para a deterioração do leite do conjunto, além de que a adição de água ao leite, proporciona a diluição de seus constituintes.

**Tabela 6:** Valores médios (n=4) com desvio padrão dos percentuais de lactose, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteínas, proteínas solúveis em pH 4,6, proteínas solúveis em ácido tricloroacético 12% e caseínas das amostras de leite cru

Amostras	Lactose (%)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Proteína (%)	Proteínas Solúveis em pH 4,6 (%)	Proteínas Solúveis em TCA 12% (%)	Caseínas (%)
n1	4,53 ± 0,06	2,91 ± 0,33	11,55 ± 0,39	8,64 ± 0,08	3,21 ± 0,16	1,02 ± 0,08	0,19 ± 0,03	2,02 ± 0,12
n2	4,49 ± 0,03	3,58 ± 0,23	12,01 ± 0,28	8,43 ± 0,08	3,04 ± 0,11	1,02 ± 0,10	0,17 ± 0,05	1,88 ± 0,10
n3	4,67 ± 0,03	3,38 ± 0,33	12,15 ± 0,30	8,77 ± 0,15	3,17 ± 0,09	1,09 ± 0,03	0,17 ± 0,04	1,91 ± 0,05
n4	4,42 ± 0,11	3,13 ± 0,29	11,72 ± 0,47	8,59 ± 0,19	3,25 ± 0,15	1,05 ± 0,07	0,13 ± 0,03	2,11 ± 0,21
n5	4,42 ± 0,10	3,73 ± 0,23	12,48 ± 0,18	8,75 ± 0,14	3,40 ± 0,06	1,15 ± 0,06	0,16 ± 0,02	2,01 ± 0,11
n6	4,63 ± 0,01	3,33 ± 0,37	11,95 ± 0,53	8,62 ± 0,19	3,08 ± 0,12	1,04 ± 0,05	0,15 ± 0,01	1,91 ± 0,18
n7	4,52 ± 0,05	3,39 ± 0,25	12,03 ± 0,28	8,64 ± 0,08	3,20 ± 0,09	1,08 ± 0,08	0,14 ± 0,01	2,01 ± 0,17
n8	4,51 ± 0,07	3,45 ± 0,21	12,06 ± 0,23	8,61 ± 0,14	3,18 ± 0,11	1,06 ± 0,13	0,17 ± 0,02	2,02 ± 0,30
n9	4,50 ± 0,09	3,65 ± 0,17	12,24 ± 0,11	8,60 ± 0,16	3,19 ± 0,07	1,07 ± 0,10	0,12 ± 0,01	2,03 ± 0,13
n11	4,41 ± 0,16	3,43 ± 0,23	11,90 ± 0,28	8,87 ± 0,10	3,16 ± 0,18	1,03 ± 0,09	0,12 ± 0,02	2,01 ± 0,14
n12	4,45 ± 0,05	3,51 ± 0,15	12,04 ± 0,16	8,54 ± 0,09	3,18 ± 0,07	1,12 ± 0,06	0,17 ± 0,02	1,94 ± 0,15
n13	4,53 ± 0,07	3,80 ± 0,28	12,46 ± 0,25	8,66 ± 0,09	3,22 ± 0,04	1,09 ± 0,14	0,16 ± 0,03	1,96 ± 0,15
n14	4,54 ± 0,06	3,71 ± 0,18	12,64 ± 0,40	8,93 ± 0,26	3,45 ± 0,23	1,15 ± 0,08	0,16 ± 0,01	2,03 ± 0,15
n15	4,34 ± 0,21	3,43 ± 0,13	11,89 ± 0,40	8,46 ± 0,30	3,22 ± 0,10	1,06 ± 0,13	0,16 ± 0,04	1,96 ± 0,12
n16	4,42 ± 0,10	3,76 ± 0,15	12,43 ± 0,34	8,67 ± 0,21	3,34 ± 0,07	1,10 ± 0,12	0,17 ± 0,02	2,01 ± 0,11
n17	4,44 ± 0,06	3,60 ± 0,16	12,26 ± 0,15	8,66 ± 0,04	3,30 ± 0,12	1,06 ± 0,12	0,15 ± 0,01	2,06 ± 0,17
n18	4,43 ± 0,24	3,39 ± 0,16	11,87 ± 0,55	8,49 ± 0,39	3,16 ± 0,10	1,06 ± 0,06	0,16 ± 0,02	2,02 ± 0,02
Médias	4,48 ± 0,12	3,48 ± 0,31	12,10 ± 0,41	8,62 ± 0,20	3,22 ± 0,15	1,07 ± 0,09	0,155 ± 0,029	1,99 ± 0,14



**Figura 8:** Percentuais de gordura no leite cru e indicação do limite mínimo de 3,0 g/100g de leite estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b).

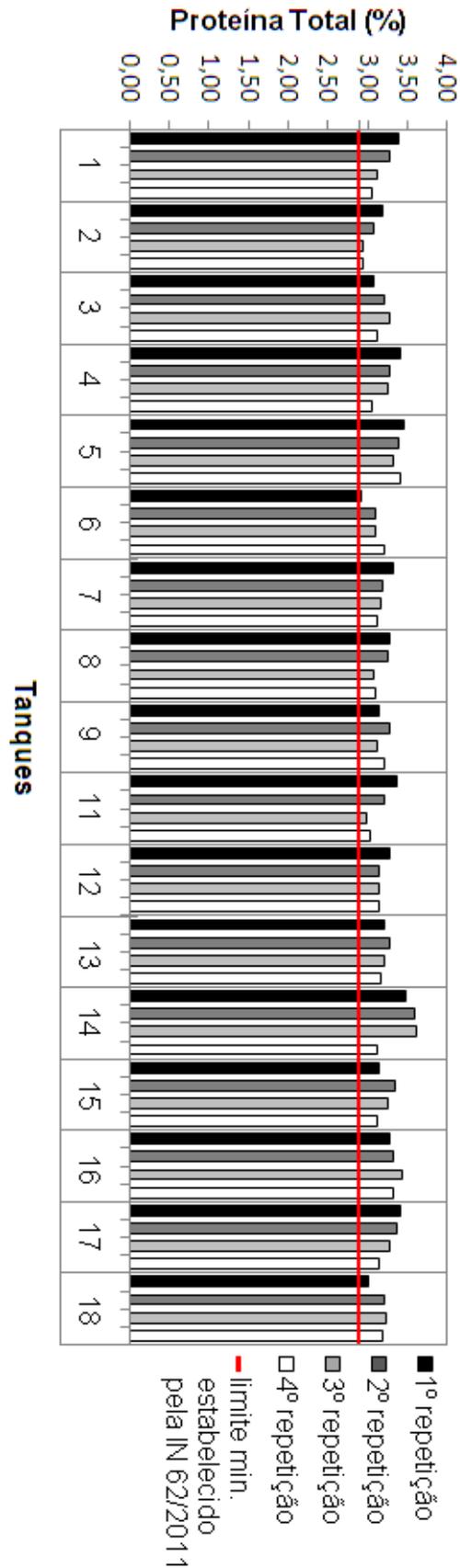


**Figura 9:** Percentuais de extrato seco desengordurado no leite cru e indicação do limite mínimo de 8,4% estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b).

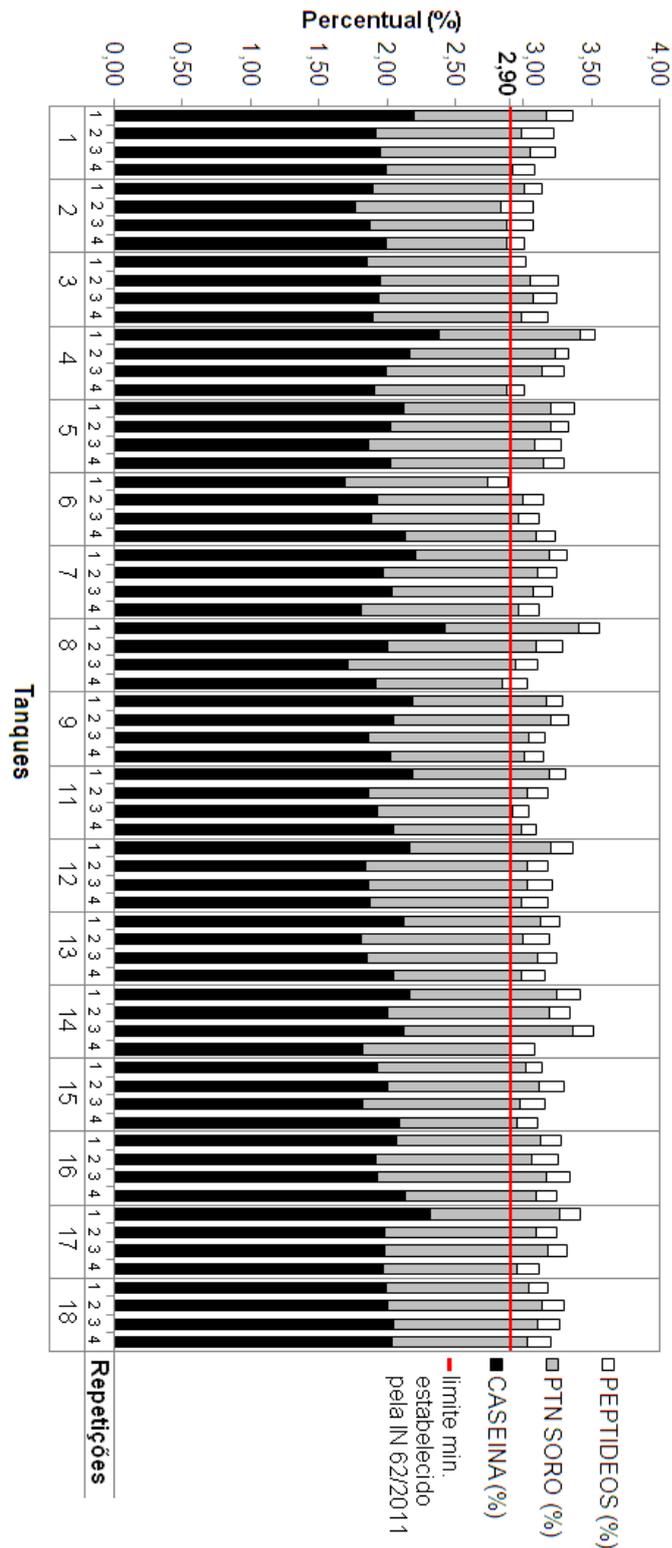
As médias percentuais de proteína total (nitrogênio proteico) das amostras de leite (Tabela 6) atenderam ao parâmetro estabelecido pela Instrução Normativa nº 62, que preconiza a ausência de qualquer tipo de padronização e o mínimo de 2,9 g/100g de leite analisado (BRASIL, 2011b).

Todas as amostras avaliadas também atenderam ao teor mínimo de proteínas estabelecido pela IN 62/2011 (Figura 10).

Os percentuais de nitrogênio total (proteína total) e os índices de nitrogênio caseínico (caseínas), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (soro proteínas) e nitrogênio solúvel em TCA 12% (peptídeos e proteínas de menor peso molecular), foram incluídos no percentual de proteína total para cada amostra, como esta demonstrado na Figura 11.



**Figura 10:** Percentuais de proteína no leite cru e indicação do limite mínimo de 2,9 g/100g estabelecido pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011b).



**Figura 11:** Percentuais de nitrogênio total (proteína total), nitrogênio caseínico (caseínas), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (soro proteínas) e nitrogênio não-proteico (peptídeos e proteínas de menor peso molecular) das amostras de leite cru e indicação do limite mínimo de 2,9 g/100g estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011b).

#### **5.4. Produção de proteases dos micro-organismos psicrotróficos proteolíticos isolados do leite cru, em meio de cultura enriquecido com LDR 10%.**

Constatou-se que diferentes isolados apresentaram diferença na intensidade de produção de próteses, de acordo com a temperatura de incubação (Tabelas 7, 8, 9 e 10). Algumas estirpes apresentaram considerável evolução na formação de halos de clarificação no meio de cultura quando incubadas a 4°C, sendo este o limite máximo de temperatura de refrigeração para conservação do leite estabelecido na legislação (BRASIL, 2011b). Portanto, mesmo no leite mantido a 4°C há desenvolvimento de algumas estirpes psicrotróficas com características proteolíticas consideráveis.

Assim, há necessidade eminente de intensificar as boas práticas agropecuárias e de manejo nas propriedades a fim de limitar o acesso desta microbiota ao leite cru.

O aumento na temperatura de incubação para 6,5; 10 e 25°C (Tabelas 8, 9 e 10) proporcionou uma evolução acentuada na formação dos halos de clarificação (proteólise), sendo observado um comportamento variado para as estirpes em relação às temperaturas de incubação. Assim, o resfriamento imediato do leite cru a temperaturas abaixo de 4°C é essencial para minimizar as possíveis consequências da ação proteolítica destes micro-organismos sobre as proteínas do leite.

Porém, alguns isolados apresentaram comportamento distinto em diferentes temperaturas de incubação, como a cultura 4.0, que apresentou um halo de clarificação maior, com 15 milímetros de diâmetro, quando foi incubado a 4°C, por outro lado, quando este mesmo isolado foi incubado à 6,5°C, o halo de clarificação apresentou um diâmetro de 9 milímetros. Portanto, a partir dos estudos de Nörnberg *et al.* (2009), pode-se confirmar que existe a ocorrência na variação da capacidade proteolítica em algumas linhagens de bactérias psicrotróficas, em diferentes faixas de temperatura.

**Tabela 7:** Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados por isolados psicrotróficos proteolíticos, a 4°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação

CULTURAS	4°C				
	24h	48h	72h	96h	120h
4.0	3	7	9	12	15
3.5	3	6	10	13	15
5.5	0	3	7	12	14
7.5	0	4	7	11	14
3.6	0	5	8	12	14
1.4	0	3	7	10	13
6.4	0	0	5	10	13
1.5	0	0	6	10	13
2.5	0	4	7	11	13
8.5	0	2	6	10	13
16.6	0	4	7	10	13
8.3	0	2	5	10	12
2.4	0	0	5	8	12
6.5	0	0	4	8	12
9.5	0	3	6	9	12
16.5	0	2	5	9	12
7.4	0	4	6	8	11
4.5	0	3	4	8	11
5.0	0	0	4	7	10
17.1	4	6	7	10	10
7.3	0	3	5	8	10
17.6	0	0	3	7	10
3.0	0	0	0	4	8
13.1	3	5	6	7	8
6.0	0	0	0	3	7
8.0	0	0	0	5	7
14.1	2	3	4	5	7
15.1	0	2	4	5	6
7.0	0	0	0	2	4
9.0	0	0	2	3	4
18.0	0	0	0	3	4
11.1	0	0	0	0	4
4.4	0	0	2	3	4
11.0	0	0	0	2	3
4.3	0	0	0	2	3
16.1	0	0	0	1	2
9.3	0	0	0	1	2
12.4	0	0	0	2	2
2.0	0	0	0	0	0
14.0	0	0	0	0	0
20.0	0	0	0	0	0
15.3	0	0	0	0	0
8.4	0	0	0	0	0
9.4	0	0	0	0	0
14.4	0	0	0	0	0
1.6	0	0	0	0	0

**Tabela 8:** Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados por isolados psicotróficos proteolíticos, a 6,5°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação

CULTURAS	6,5°C				
	24h	48h	72h	96h	120h
8.5	4	9	12	17	20
16.5	0	8	12	16	19
7.5	0	4	9	12	16
3.5	2	5	8	11	14
3.6	0	4	8	11	14
7.3	0	6	9	11	13
1.5	0	0	7	10	13
5.5	0	4	7	10	13
6.5	0	4	8	10	13
1.4	0	4	6	10	12
9.5	0	3	6	9	12
16.6	0	3	6	9	12
17.6	0	2	5	9	12
6.4	0	0	6	9	11
2.5	0	2	5	8	11
8.0	0	0	5	8	10
8.3	0	0	0	7	10
7.4	0	2	4	7	10
3.0	0	0	0	5	9
4.0	0	2	4	6	9
17.1	3	4	5	7	9
2.4	0	2	4	7	9
4.5	0	0	4	7	9
5.0	0	0	0	5	8
6.0	0	0	2	5	8
13.1	3	4	5	7	8
14.1	2	3	4	5	6
15.1	2	3	4	5	6
7.0	0	0	0	2	5
9.0	0	2	2	3	4
11.0	0	0	0	0	3
16.1	0	2	2	3	3
4.3	0	0	0	2	3
9.3	0	0	0	3	3
4.4	0	0	0	2	3
14.4	0	0	0	0	3
15.3	0	0	0	0	2
8.4	0	0	0	0	2
9.4	0	0	0	0	2
12.4	0	0	0	2	2
2.0	0	0	0	0	0
14.0	0	0	0	0	0
18.0	0	0	0	0	0
20.0	0	0	0	0	0
11.1	0	0	0	0	0
1.6	0	0	0	0	0

**Tabela 9:** Valores do diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados por isolados psicrotróficos proteolíticos, a 10°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação

CULTURAS	10°C				
	24h	48h	72h	96h	120h
5.5	4	10	15	19	23
8.5	4	10	15	19	23
3.6	5	10	16	19	23
7.5	3	9	13	18	22
9.5	4	9	14	18	22
17.6	3	9	14	18	22
3.5	3	8	12	17	21
3.0	0	6	12	15	20
6.0	5	10	14	16	20
8.3	2	8	12	16	20
1.4	3	8	14	17	20
4.5	4	7	12	15	20
6.5	3	8	13	16	20
16.5	2	8	13	17	20
16.6	3	8	12	16	20
4.0	5	10	13	17	19
17.1	2	8	12	15	19
6.4	0	6	11	15	19
8.0	0	5	10	14	18
14.0	2	7	12	15	18
7.3	2	6	11	14	18
2.4	0	7	10	14	18
18.0	3	7	11	14	17
1.5	0	7	10	14	17
2.5	0	6	10	14	17
20.0	0	5	8	12	16
11.1	0	5	9	13	16
5.0	0	3	7	11	15
7.4	3	6	9	12	15
7.0	0	2	5	9	13
13.1	4	6	8	10	11
14.1	3	5	6	8	9
15.1	2	4	6	7	8
4.3	0	2	4	6	7
4.4	2	4	5	6	7
9.0	2	4	4	6	6
16.1	1	2	3	5	6
9.3	0	3	4	5	6
12.4	0	3	4	5	6
14.4	0	2	4	5	6
11.0	1	2	4	4	5
8.4	0	2	3	4	5
9.4	0	2	3	4	5
15.3	0	0	2	3	4
2.0	0	0	0	0	0
1.6	0	0	0	0	0

**Tabela 10:** Valores diâmetro dos halos de clarificação, em milímetros, ocasionados por isolados psicrotróficos proteolíticos, a 25°C, em PCA+LDR 10% ao longo do tempo de incubação

CULTURAS	25°C				
	24h	48h	72h	96h	120h
4.5	8	20	28	36	46
11.1	11	20	27	34	40
17.1	11	20	28	35	40
14.0	11	20	26	34	39
3.0	6	16	25	33	38
9.5	8	17	25	32	37
16.5	10	18	24	35	37
18.0	10	18	25	31	36
20.0	10	19	25	31	36
7.3	10	17	24	30	36
1.5	11	18	25	31	36
8.5	8	17	23	31	36
3.6	7	15	22	29	36
7.5	9	18	24	31	35
17.6	7	15	21	29	35
8.0	6	15	22	28	34
3.5	9	17	25	32	34
6.5	7	15	21	28	34
16.6	6	14	22	30	34
8.3	5	13	21	27	33
5.5	10	17	25	31	33
1.4	7	15	20	27	32
6.4	6	17	21	28	32
5.0	4	12	19	25	31
7.4	7	16	20	27	31
7.0	4	11	18	24	29
2.4	5	11	18	23	29
4.0	5	11	16	22	26
6.0	5	10	16	21	25
2.5	0	5	10	15	17
16.1	6	9	11	13	15
9.0	6	8	10	13	14
11.0	5	7	10	11	13
4.4	5	7	9	11	12
13.1	6	7	9	10	11
14.1	5	6	8	8	9
15.1	4	5	7	7	8
4.3	3	5	7	8	8
8.4	3	5	7	8	8
9.3	1	3	4	5	6
12.4	2	3	4	5	6
15.3	1	2	3	4	5
14.4	2	3	4	5	5
9.4	1	3	3	4	4
2.0	0	0	0	0	0
1.6	0	0	0	0	0

Portanto, mesmo com a implementação do processo de refrigeração do leite cru por meio do uso de tanques de expansão, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, podem comprometer a qualidade do produto final, sendo considerada a grande possibilidade de que micro-organismos psicotróficos proteolíticos possam se desenvolver e promover a hidrólise das proteínas do leite.

Segundo Pinto *et al.*(2006), dados referentes ao desenvolvimento de micro-organismos sob refrigeração, reforça a necessidade de investimentos contínuos em boas práticas para prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite, principalmente durante sua obtenção, a fim de reduzir problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios, devido a proteases de micro-organismos psicotróficos.

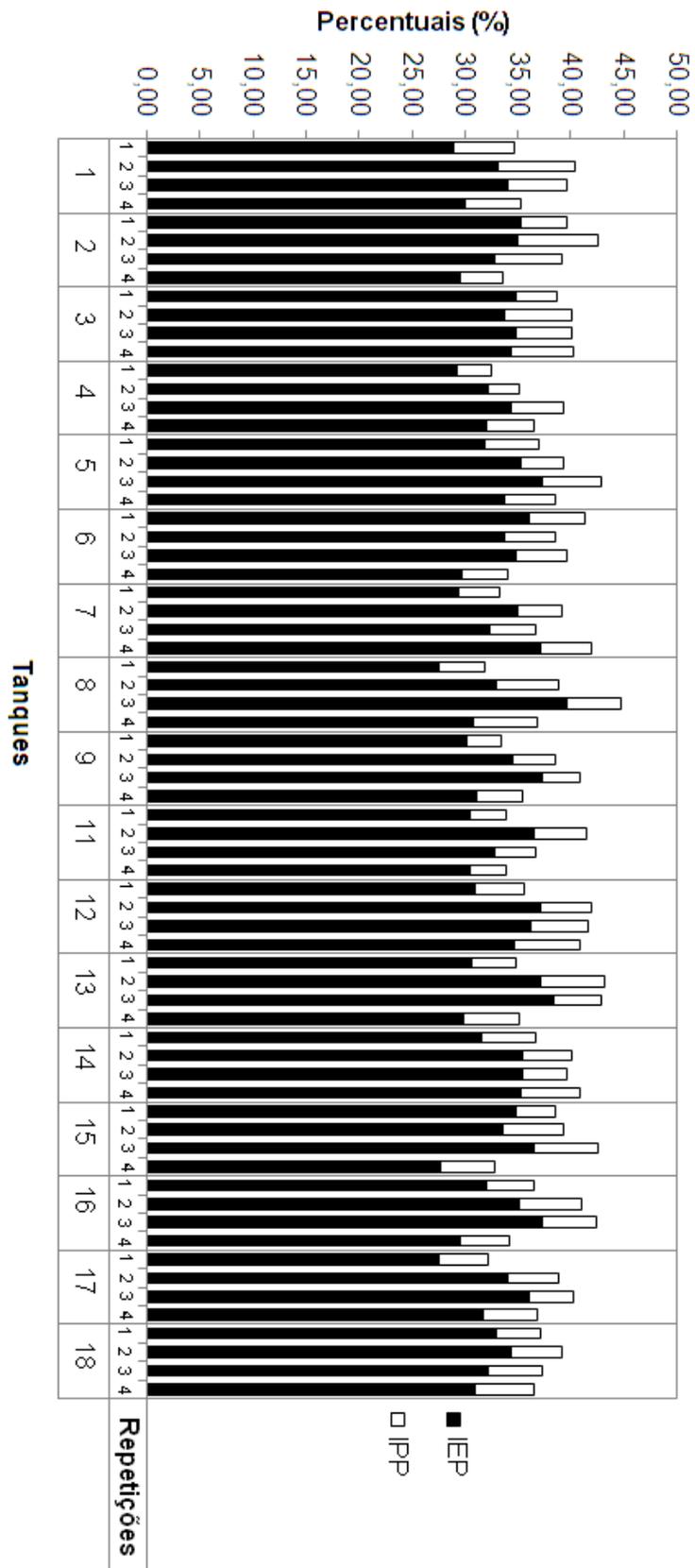
### **5.5. Índices de extensão e profundidade da proteólise do leite cru**

Este trabalho procurou adaptar as metodologias descritas por Wolfschoon-Pombo e Lima (1989) a fim de mensurar por meio dos percentuais de soro proteínas e peptídeos no leite, e conseqüentemente através da razão entre estes índices com o percentual de proteína total, são obtidos os índices de extensão e profundidade da proteólise ocorrida nas amostras de leite cru refrigerado da cidade de Rio Pomba, MG.

Os valores calculados sobre os percentuais dos índices de extensão (IEP) e profundidade (IPP) da proteólise, e em razão dos percentuais de caseínas, soro-proteínas e frações menores de peptídeos e aminoácidos, estão especificados e demonstrados na Tabela 11 e Figura 12. Sendo encontrado um valor médio de IEP em  $33,3 \pm 2,81\%$ , com uma variação de 27,5 – 39,62% entre todas as amostras. Por outro lado, os valores de IPP apresentaram uma média de  $4,87 \pm 0,92\%$ , com uma variação de 2,91 – 7,56%.

**Tabela 11:** Valores médios (n=4) com desvio padrão dos percentuais dos índices de extensão (IEP) e profundidade (IPP) da proteólise, atividade proteolítica empregando-se azocaseína como substrato (UEP/h<sup>-1</sup>) e por meio da determinação de tirosina pelo método de Hull e utilizando kit para doseamento de mucoproteína no leite cru

Tanques	Índice Extensão de Proteólise (%)	Índice de Profundidade de Proteólise (%)	Atividade Proteolítica com azocaseína (UEP/h <sup>-1</sup> )	Tirosina método de Hull (mg.5mL <sup>-1</sup> )	Kit de Mucoproteína Tirosina (mg.5mL <sup>-1</sup> )
n1	31,54 ± 2,46	5,95 ± 0,92	3,73 ± 0,70	0,251 ± 0,038	0,749 ± 0,071
n2	33,13 ± 2,62	5,57 ± 1,66	2,93 ± 0,74	0,267 ± 0,051	0,668 ± 0,041
n3	34,43 ± 0,50	5,39 ± 1,08	3,79 ± 1,45	0,245 ± 0,044	0,668 ± 0,040
n4	31,98 ± 2,10	3,88 ± 0,94	2,45 ± 0,84	0,223 ± 0,017	0,708 ± 0,070
n5	34,56 ± 2,28	4,87 ± 0,66	2,33 ± 0,47	0,219 ± 0,024	0,731 ± 0,100
n6	33,57 ± 2,69	4,82 ± 0,44	2,34 ± 1,02	0,245 ± 0,035	0,733 ± 0,112
n7	33,49 ± 3,32	4,26 ± 0,40	2,81 ± 0,58	0,235 ± 0,056	0,671 ± 0,039
n8	32,69 ± 5,13	5,38 ± 0,82	1,59 ± 0,86	0,278 ± 0,042	0,734 ± 0,017
n9	33,25 ± 3,29	3,82 ± 0,46	1,85 ± 0,91	0,229 ± 0,045	0,670 ± 0,073
n11	32,58 ± 2,84	3,94 ± 0,69	1,58 ± 0,90	0,235 ± 0,004	0,732 ± 0,052
n12	34,76 ± 2,70	5,29 ± 0,69	1,43 ± 1,12	0,254 ± 0,037	0,705 ± 0,026
n13	34,01 ± 4,35	4,98 ± 0,85	2,00 ± 0,96	0,222 ± 0,056	0,674 ± 0,035
n14	34,45 ± 1,90	4,83 ± 0,57	2,20 ± 1,07	0,276 ± 0,046	0,713 ± 0,058
n15	33,20 ± 3,84	5,13 ± 1,03	2,15 ± 0,48	0,265 ± 0,021	0,731 ± 0,068
n16	33,52 ± 3,41	5,08 ± 0,60	1,98 ± 0,70	0,253 ± 0,024	0,754 ± 0,055
n17	32,37 ± 3,64	4,65 ± 0,39	2,05 ± 0,51	0,270 ± 0,055	0,699 ± 0,040
n18	32,63 ± 1,46	4,88 ± 0,60	1,71 ± 0,69	0,258 ± 0,062	0,720 ± 0,027
Médias	33,30 ± 2,81	4,87 ± 0,92	2,29 ± 1,01	0,248 ± 0,041	0,709 ± 0,060



**Figura 12:** Percentuais dos índices de extensão (IEP) e profundidade (IPP) da proteólise no leite cru.

O índice de extensão está fundamentalmente relacionado com as proteases naturais do leite e de algum possível agente coagulante, no caso na fabricação de queijos, as quais degradam a proteína em peptídeos de alto peso molecular. Por outro lado, o índice de profundidade da proteólise está relacionado, principalmente, com a atividade das enzimas endógenas e exógenas provenientes do uso de culturas lácticas, no caso em derivados lácteos fermentados, e de possíveis contaminantes, como os micro-organismos com caráter proteolítico, que degradam os peptídeos de alto peso molecular a peptídeos de baixo peso molecular, porém não há um limite exato de onde começa um índice e termina o outro (NARIMATSU *et al.*, 2003).

A observação de um índice maior de variância nos valores de IPP em relação ao IEP, mediante seus valores médios percentuais, confirma a ação mais acentuada de proteases exógenas sobre as proteínas do leite, em relação a presença de proteases naturais no leite. Pois esta maior variação se deve a atividade proteolítica diferenciada presente no leite.

## **5.6. Atividade proteolítica do leite cru**

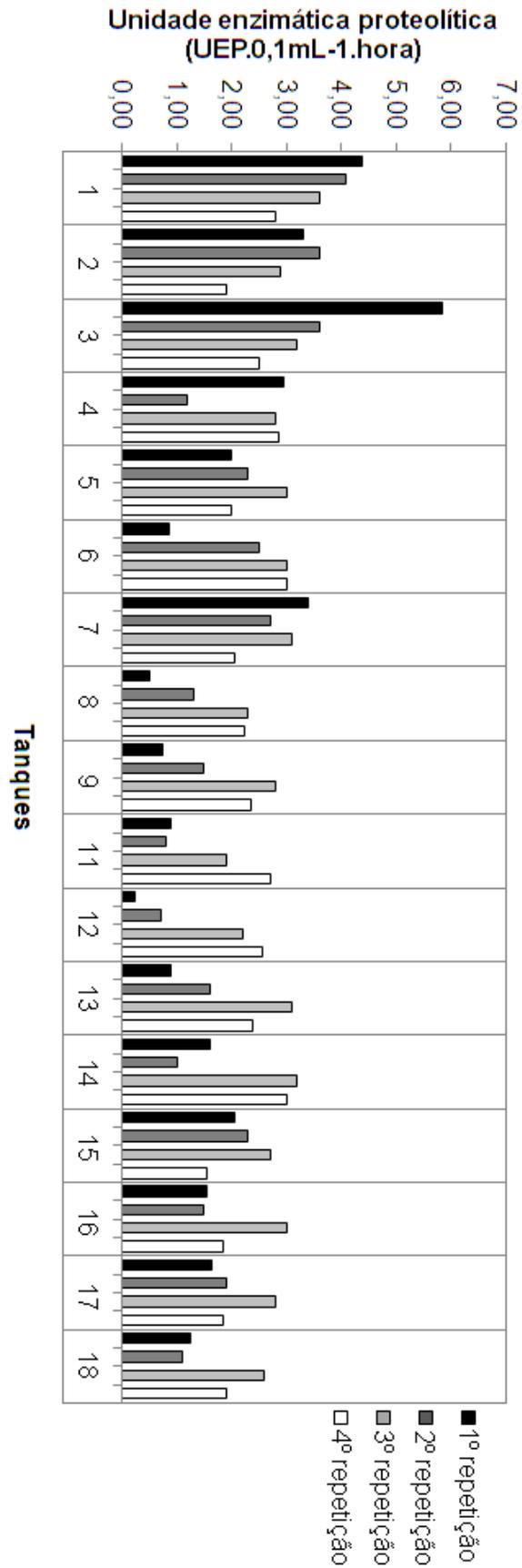
A atividade proteolítica (Tabela 11 e Figura 13) apresentou desvio padrão alto (média geral de  $2,29 \pm 1,01\%$ , com uma variação entre os valores de 0,25 a 5,85 UEP). Segundo Nörnberg *et al.* (2009), há uma grande variabilidade na atividade proteolítica entre diversos micro-organismos, em especial aos psicrotóxicos e em seu estudo, algumas estirpes apresentaram alta atividade e outras apresentaram atividade muito baixa, tornando claro que diferentes estirpes de uma mesma espécie podem apresentar comportamentos variados, sendo que algumas apresentam maior atividade proteolítica em uma determinada temperatura, enquanto que outras parecem não sofrer influência dessa variação de temperatura na produção de enzimas proteolíticas.

Oliveira *et al.* (2009), apresentaram resultados referentes a atividade proteolítica de três isolados de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250, por meio do uso da azocaseína como substrato na avaliação da proteólise, no decorrer de 2 e 5 dias de incubação a 7 °C, após tratamento térmico do leite a 100 °C, por 5 minutos. Os dados relacionados à *P. aeruginosa*

não apresentou diferença significativa entre a atividade proteolítica nos diferentes tempos de incubação, por outro lado, não possível obter uma margem significativa ao estudo sobre o tempo de incubação da *P. fluorescens* P88 e *P. fluorescens* P250. Confirmando que existe a ocorrência de alta variabilidade na atividade proteolítica entre os micro-organismo, e até mesmo em isolados da mesma espécie.

No experimento de Nörnberg *et al.* (2010), foram isolados alguns micro-organismos psicrotróficos que apresentaram uma proteólise considerável, medida a partir da evolução do halo de proteólise, observados em meio de cultura enriquecido com leite. Estas culturas foram inoculadas e incubadas em um meio apropriado. Posteriormente, foi avaliada sua atividade proteolítica usando-se a azocaseína como substrato. Como resultado, a maioria das amostras inoculadas com diferentes estirpes, apresentou atividade proteolítica inferior a 10 UEP.h<sup>-1</sup>, porém algumas apresentaram valores superiores a 20 UEP.h<sup>-1</sup>, sendo estas pertencentes as espécies de *Burkholderia cepacia* 1A4, *Klebsiella oxytoca* 8B3, *Burkholderia cepacia* 2A7, *Aeromonas* sp.10B7 e *Klebsiella oxytoca* 1A5.

Izidoro *et al.* (2013) analisaram o índice de atividade proteolítica em relação a quantidade de micro-organismos por meio de sua capacidade hidrolítica pela quantificação de glicomacropéptido (GMP) livre no leite. Os autores constataram que a ação proteolítica de cada estirpe de micro-organismo se apresenta de forma singular.



**Figura 13:** Atividade proteolítica (UEP/h<sup>-1</sup>) das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque.

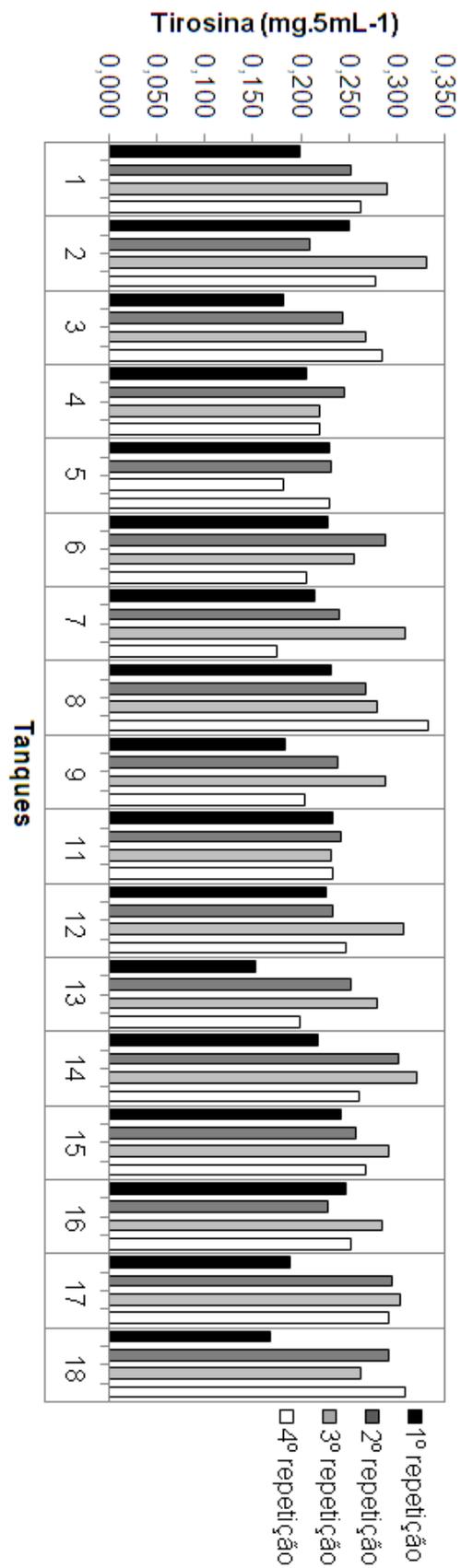
## 5.7. Grau de proteólise do leite cru

A pesquisa dos valores de tirosina em leite com o intuito de esclarecer quantitativamente o grau de proteólise ocorrido está fundamentada na hipótese de que a atividade proteolítica, proveniente da ação de diversas enzimas endógenas e exógenas, está relacionada com a liberação de tirosina no meio, tornando a leitura dos índices de tirosina, um importante indicador da qualidade do leite (CHEN et al., 2003). Os valores de tirosina obtidos neste trabalho estão apresentados nas Figura 13 e 14.

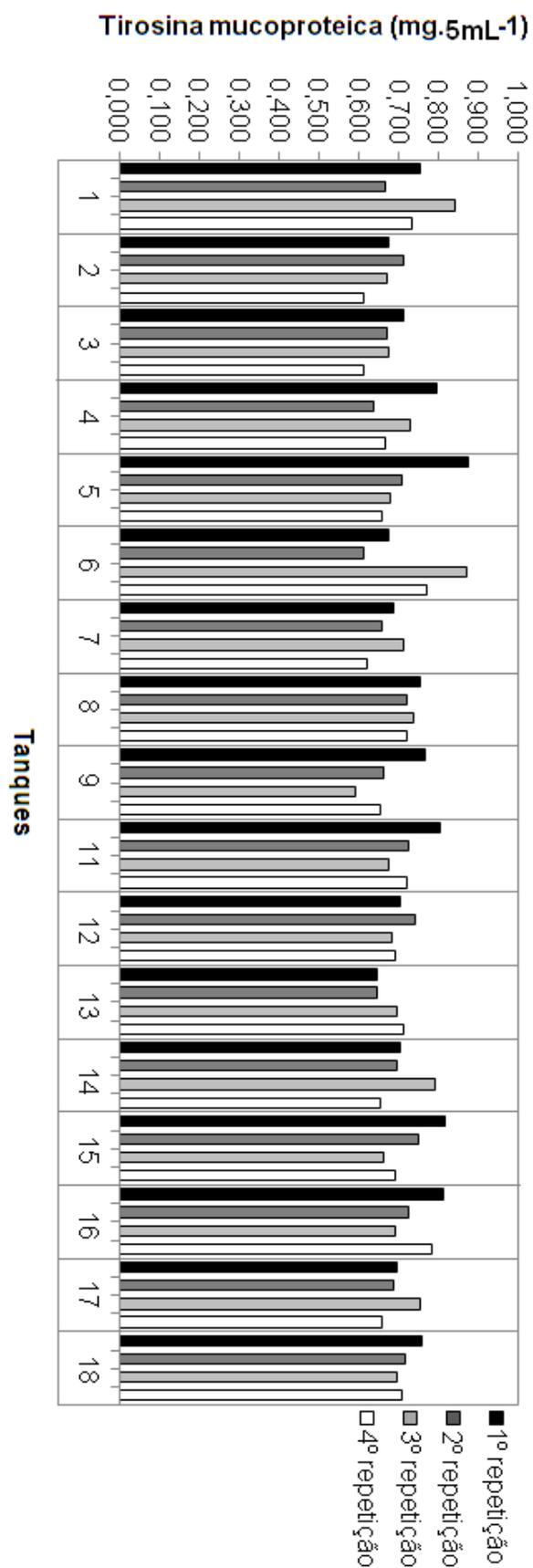
Dentre os valores obtidos sobre a metodologia descrita por Hull (1947), foi observado um valor médio de  $0,248 \pm 0,041 \text{ mg.5mL}^{-1}$ , com uma variação de  $0,154 - 0,333 \text{ mg.5mL}^{-1}$  entre todos os resultados. A partir dos estudos de Pinto (2004), seria importante considerar como valor mínimo de tirosina, de aproximadamente  $0,3 \text{ mg.5mL}^{-1}$ , pois à este nível as amostras estariam sujeitas à perda da estabilidade térmica, pois estariam com uma população de psicrotóxicos proteolíticos superior a  $7,0 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

Em relação aos valores de tirosina, obtida pelo kit de doseamento de mucoproteínas para soro sanguíneo, mas neste trabalho foi aplicado para o leite cru, foi obtido um valor médio de  $0,709 \pm 0,060 \text{ mg.5mL}^{-1}$ , com uma variação de  $0,590 - 0,878 \text{ mg.5mL}^{-1}$  entre todos os resultados.

A grande diferença entre os valores médios encontrados entre as duas metodologias se deve principalmente a metodologia aplicada para quantificação de tirosina por meio do kit, pois as mucoproteínas são compostos de proteínas e carboidratos, e além de entrarem em sua constituição, instáveis quantidades de hexosaminas (glicosilamina e galactosamina), em teores superiores a 4%. A partir desta confirmação os valores de tirosina são superestimados, em relação ao método descrito por Hull (1947).



**Figura 14:** Valores de tirosina (mg.5mL<sup>-1</sup>) das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque.



**Figura 15:** Valores de tirosina mucoproteica (mg.5mL<sup>-1</sup>) obtidas das amostras de leite cru refrigerado de cada tanque.

## 5.8. Estabilidade do leite ao teste do álcool

Quanto a estabilidade ao teste ao álcool, constatou-se que 19,1% das amostras (13 amostras) de leite cru apresentaram coagulação quando misturadas ao álcool 72% v/v.

Este método de avaliação da estabilidade ao álcool é muito empregado em propriedades rurais e na plataforma de recebimento das indústrias, pelo seu baixo custo e confiabilidade. Esta metodologia é utilizada como uma estimativa da estabilidade térmica do leite, sendo considerada a amostra que apresentar precipitação instável (FISCHER *et al.*, 2012).

Segundo SILVA *et al.* (2004), a estabilidade térmica do leite pode diminuir associado a uma alta da atividade do cálcio, uma baixa atividade de fosfatos e citratos e também devido a tratamentos térmicos, com a possibilidade de que ocorra um resultado positivo no teste do álcool ou do alizarol, sem que a amostra de leite tenha caráter ácido, mas algum desequilíbrio salino.

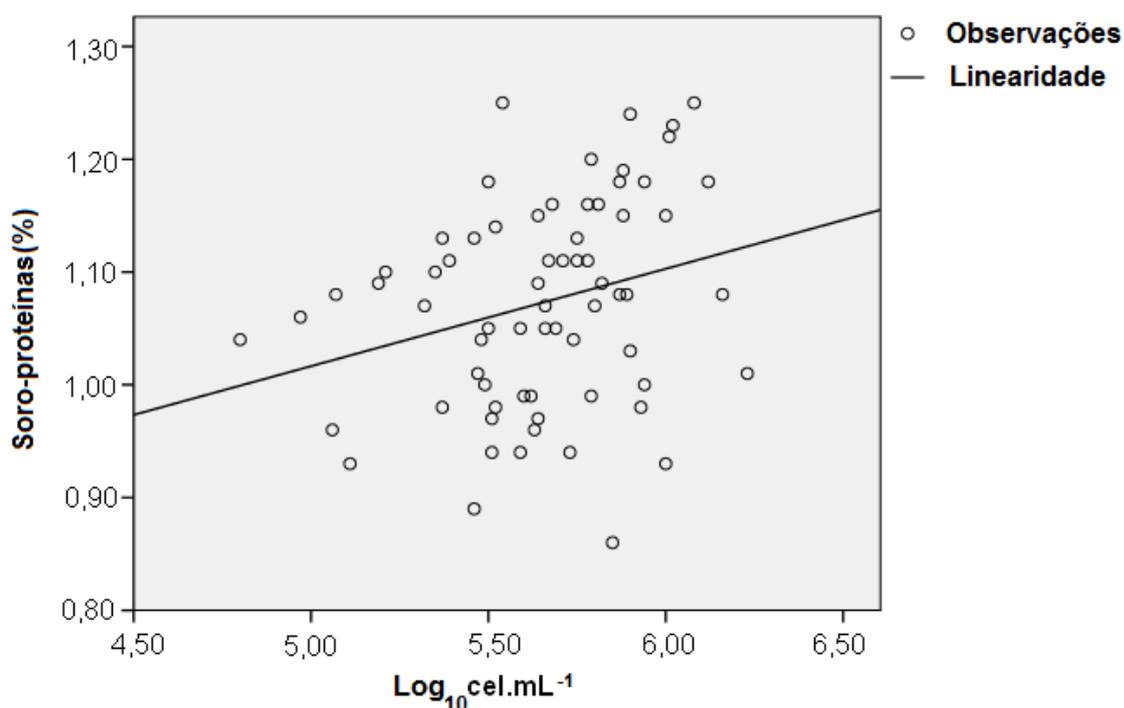
## 5.9. Correlações entre os atributos de qualidade avaliados nas amostras de leite cru refrigerado granelizado

Houve correlações positivas e significativas entre a contagem de células somáticas e os percentuais de soro-proteínas e gordura das amostras (Tabela 12, Figuras 16 e 17, respectivamente) e correlação negativa da CCS com os percentuais de lactose das amostras de leite cru (Tabela 12).

**Tabela 12:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores de contagem de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variáveis	Correlação	r	Prob > F	Equação da regressão
Soro-proteínas (%)	Positiva	0,226	0,016	$y = 0,585 + 0,086x$
Gordura (%)	Positiva	0,425	0,000	$y = 0,228 + 0,576x$
Lactose (%)	Negativa	-0,355	0,000	$y = 5,537 - 0,186x$

A correlação de CCS e soro-proteínas (Figura 16) pode estar relacionada a atividade da plasmina e ao aumento da passagem destas proteínas do plasma sanguíneo para o leite (PINTO *et al.*, 2013). E consequentemente, á um aumento de diversas substâncias e enzimas que aceleram o processo de hidrólise de proteínas e lipídeos que constituem o leite.

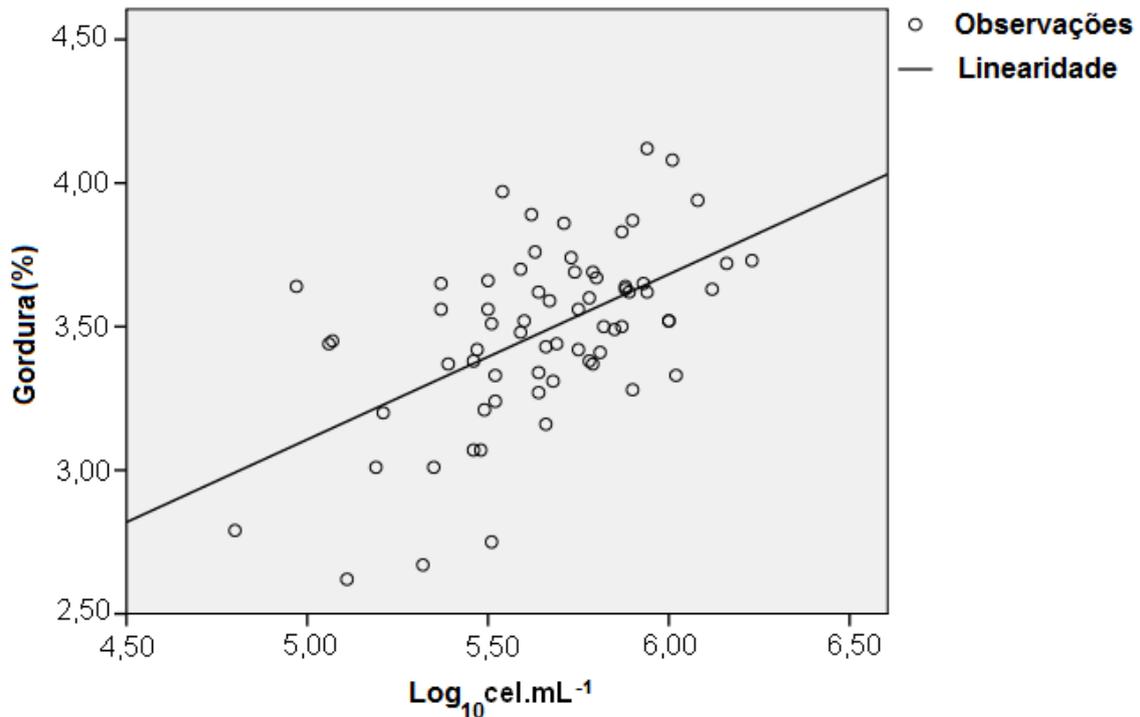


**Figura 16:** Correlação entre a contagem de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) e os percentuais de soro-proteínas no leite cru.

Por outro lado, a correlação positiva entre CCS e teor de gordura (Figura 17) pode estar relacionada a homogeneização do leite no momento da coleta, pois os glóbulos de gordura carregam para a superfície um número considerável de células somáticas e micro-organismos, caso o leite não seja homogeneizado corretamente.

Entretanto, em pesquisas relacionadas a possíveis correlações entre estas variáveis relatam-se que o aumento de células somáticas promove a redução dos percentuais de gordura, associado principalmente, à redução da sua biossíntese e a lipólise ocorrida por ação de enzimas provenientes do plasma sanguíneo (PINTO *et al.*, 2013). Por outro lado, existem referencias que relatam a ocorrência de uma grande redução na produção de leite

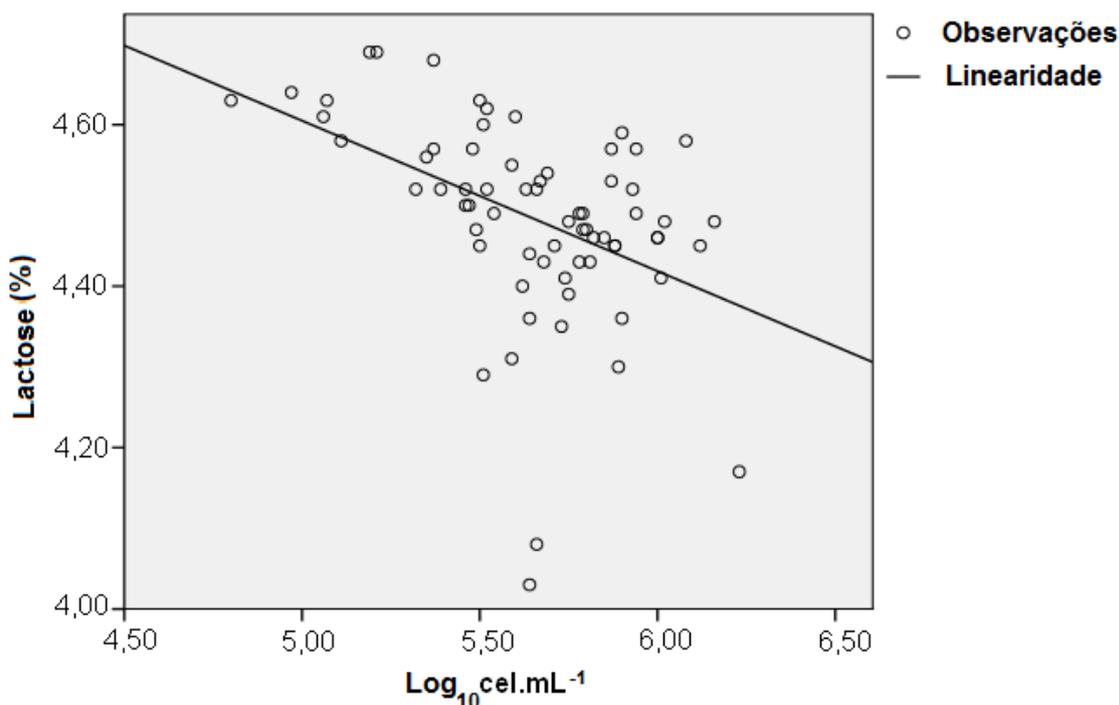
proporcionando o aumento na porcentagem de gordura em amostras com altas contagens de células somáticas, associado ao efeito de concentração deste constituinte no leite (VENTURA, *et al.*, 2006; RANGEL, *et al.*, 2009).



**Figura 17:** Correlação entre a contagem de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) e o percentual de gordura no leite cru.

O aumento de células somáticas no leite cru está relacionado com a redução dos índices de lactose (Figura 18). Segundo Prada *et al.* (2000), Rajčević *et al.* (2003) e Ventura *et al.* (2006), durante o processo inflamatório das glândulas, ocorre redução na concentração de lactose no leite secretado, principalmente, em consequência da perda de lactose da glândula mamária para a corrente sanguínea, devido ao aumento na permeabilidade e destruição da membrana que separa as células alveolares do fluxo sanguíneo, e também ao uso da lactose como substrato pelos patógenos intramamários.

Este desequilíbrio proporciona perdas substanciais na constituição do leite, principalmente na porcentagem do seu extrato seco e no importante equilíbrio entre os sais minerais e a lactose presentes no meio.

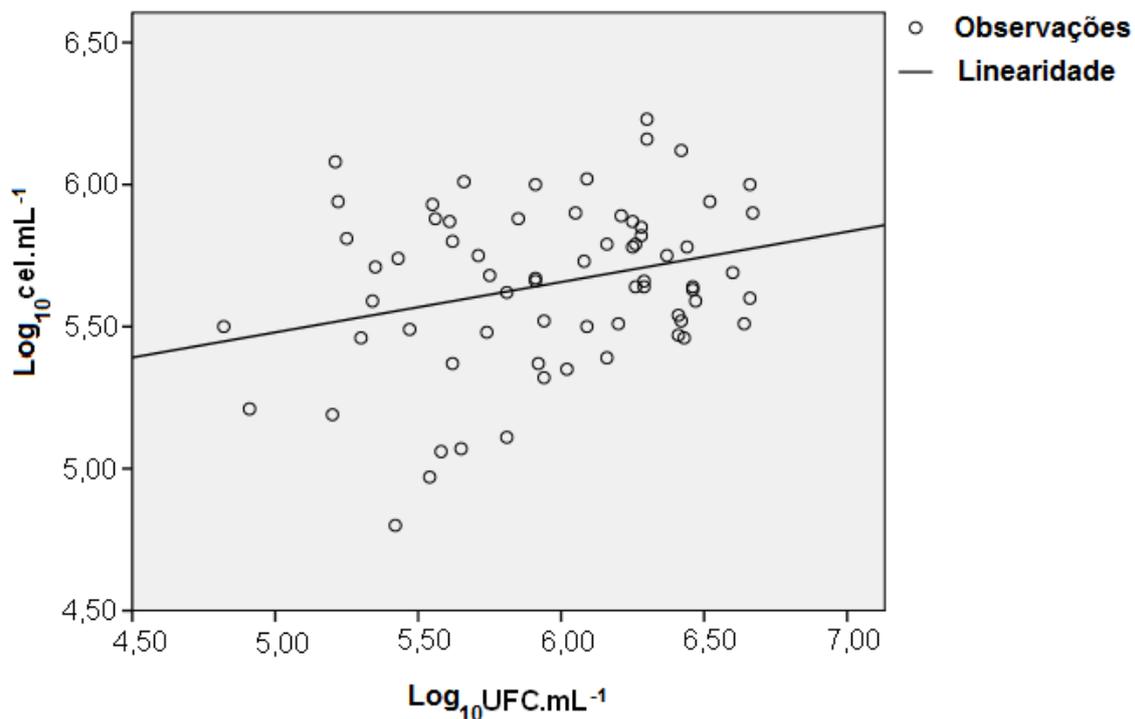


**Figura 18:** Correlação entre a contagens de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) e o percentual de lactose do leite cru.

A partir das correlações entre as variáveis em relação aos valores da contagem total de bactérias, constatou-se que esta correlaciona de forma positiva (Tabela 13, Figuras 19 e 20) com a contagem de células somáticas e de micro-organismos psicrotróficos. De acordo com Lopes Júnior *et al.* (2012), o número de células somáticas presente no leite é um forte indicativo de que houve uma disseminação de micro-organismos presentes na glândula mamária.

**Tabela 13:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores de contagem bacteriana total ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variáveis	Correlação	r	Prob > F	Equação da regressão
$\text{Log}_{10}\text{CCS}$	Positiva	0,215	0,035	$y = 4,594 + 0,177x$
$\text{Log}_{10}\text{Psic}$	Positiva	0,537	0,000	$y = 0,402 + 0,800x$



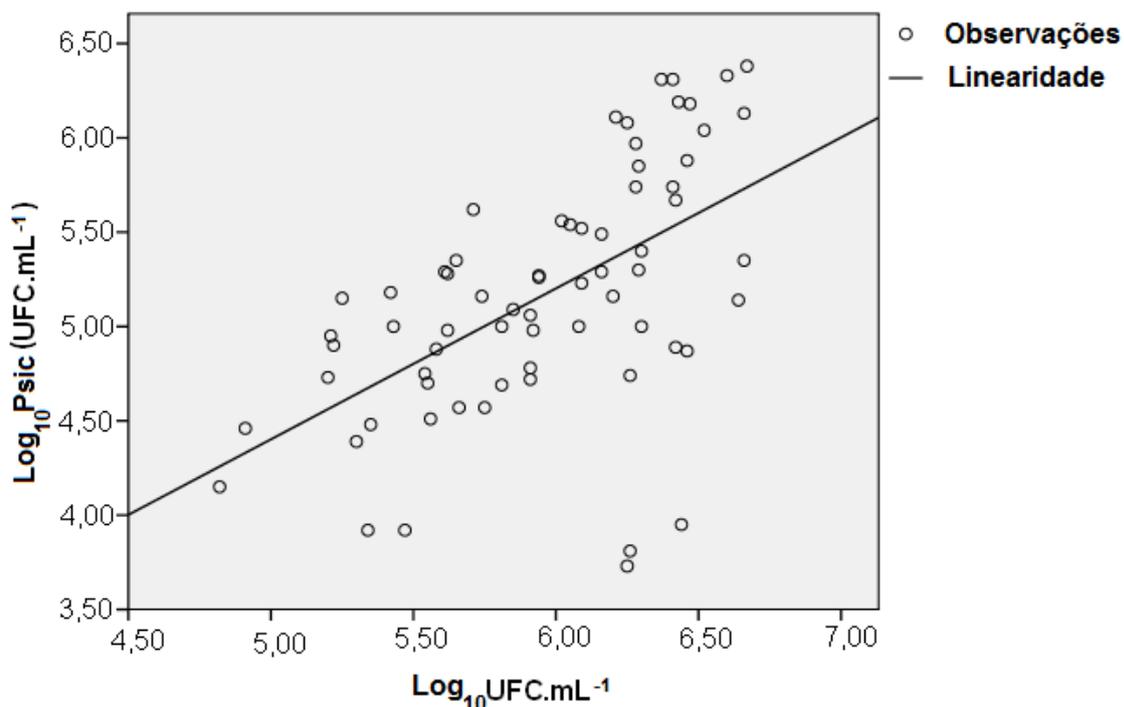
**Figura 19:** Correlação entre as contagens bacteriana totais ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) e as contagens de células somáticas ( $\text{Log}_{10}\text{cel.mL}^{-1}$ ) do leite cru.

A correlação entre a contagem total de bactérias e a contagem de micro-organismos psicotróficos evidencia a relação descrita por Sørhaug e Stepaniak (1997), de que os micro-organismos psicotróficos representam cerca de 10% da microbiota presente no leite cru mantido sob refrigeração, sendo que espécies de *Pseudomonas* constituem o gênero encontrado com maior frequência no leite cru refrigerado.

Neste trabalho, não foi constatada correlação entre as contagens de micro-organismos psicotróficos proteolíticos e as demais variáveis avaliadas nos experimentos. Devido ocorrência de placas com contagem de micro-organismos elevada, e que tornou inviável a observação do número de colônias que apresentavam o halo de clarificação sobre o meio de cultura. Portanto algumas contagens foram consideradas como estimadas e com número mínimo possível

A contagem de micro-organismos psicotróficos tem relação direta com as condições higiênicas na produção de leite. Segundo Nørnberg *et al.* (2009), cerca de 10% de toda microbiota presente no leite obtido em boas condições sanitárias e higiênicas, é constituída por micro-organismos psicotróficos, e

quando as contagens são altas, se torna um fator preocupante na linha de processo do leite pelas indústrias, pois embora a grande maioria seja eliminada por tratamentos térmicos convencionalmente utilizados pela indústria, muitas enzimas lipolíticas e proteolíticas produzidas por esta microbiota são termorresistentes, mantendo atividade hidrolítica mesmos após a pasteurização ou mesmo após o tratamento por UAT.



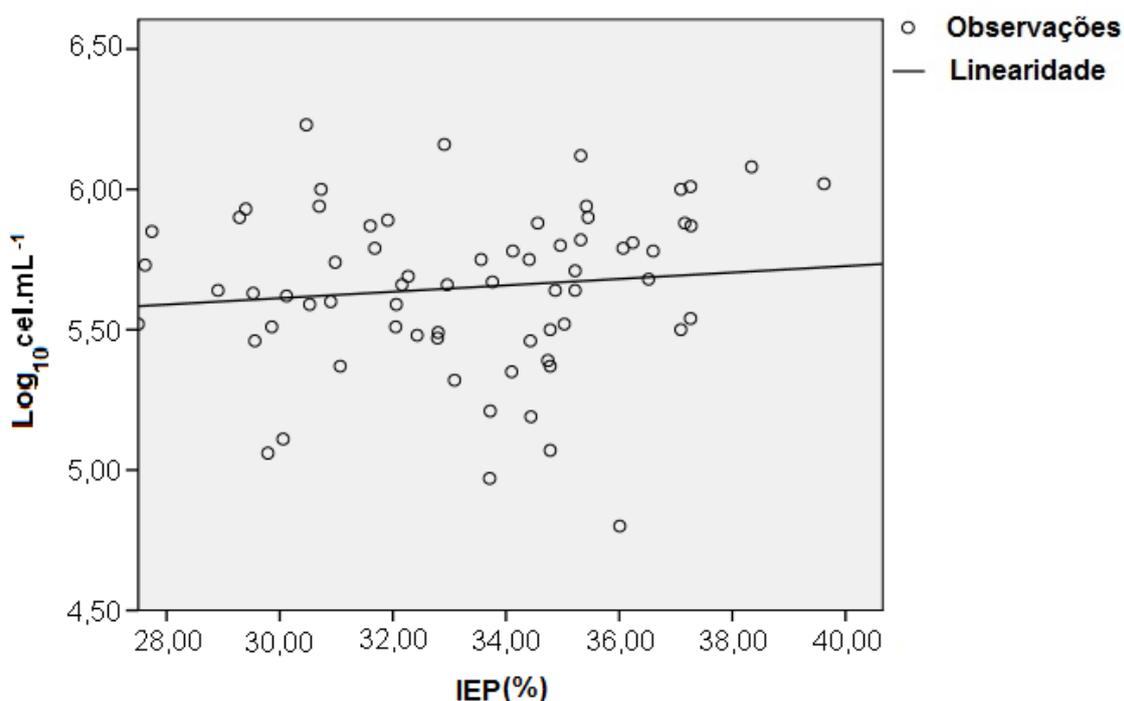
**Figura 20:** Correlação entre as contagens bacteriana totais ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) e as contagens de micro-organismos psicrotróficos ( $\text{Log}_{10}\text{UFC.mL}^{-1}$ ) do leite cru.

Entretanto, verifica-se a correlação positiva do índice de extensão da proteólise (Tabela 14, Figura 21) com a contagem de células somáticas e negativa para os percentuais de extrato seco desengordurado nas amostras observadas (Tabela 14, Figura 22).

**Tabela 14:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores relacionados aos índices de extensão de proteólise (IEP) e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variáveis	Correlação	R	Prob > F	Equação da regressão
Log <sub>10</sub> CCS	Positiva	0,321	0,032	$y = 5,270 + 0,011x$
ESD (%)	Negativa	-0,360	0,040	$y = 8,829 - 0,006x$

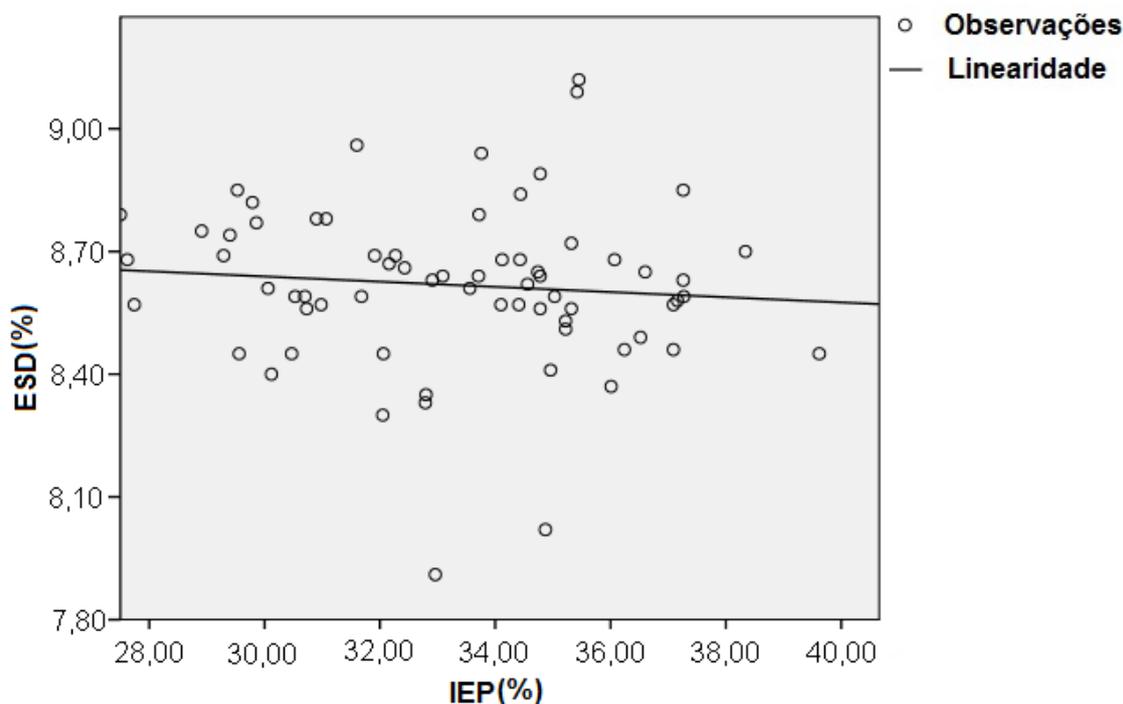
Santos et al. (2006) observaram que amostras com altos valores na contagem de células somáticas, aproximadamente 1.000.000 células.mL<sup>-1</sup>, apresentaram uma taxa de proteólise maior durante o período de armazenamento do leite, em relação à amostras que possuíam baixas contagens de células somáticas, aproximadamente 100.000 células.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 21:** Correlação entre os percentuais de extensão da proteólise (IEP) e a contagem de células somáticas (Log<sub>10</sub>cel.mL<sup>-1</sup>) do leite cru.

Neste mesmo contexto, o aumento índice de extensão da proteólise esteve correlacionado com o aumento dos valores de contagem de células somáticas, e por meio de um processo inflamatório das glândulas mamárias, à uma redução de alguns componentes no leite, como a lactose e a gordura, por meio do aumento na permeabilidade e destruição da membrana que separa as

células alveolares do fluxo sanguíneo (PRADA *et al.*, 2000; RAJČEVIČ *et al.*, 2000; VENTURA *et al.*, 2006).



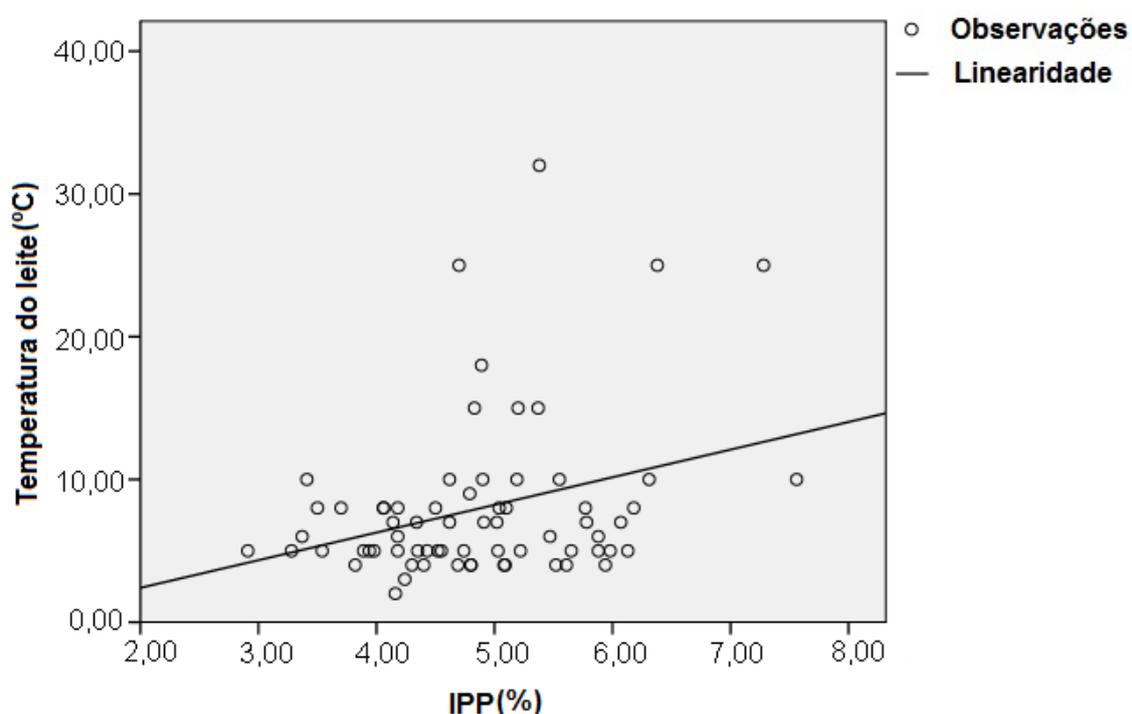
**Figura 22:** Correlação entre os percentuais de extensão da proteólise (IEP) e os percentuais de extrato seco desengordurado (ESD) do leite cru.

Os percentuais relativos ao índice de profundidade da proteólise para cada amostra, apresentou correlação significativa com a temperatura do leite no momento da coleta (Tabela 15 e Figura 23), o que demonstrou influência do resfriamento do leite na sua qualidade. Com o aumento da temperatura de conservação das amostras houve aumento no percentual do índice de profundidade da proteólise, que se refere as frações de proteínas com menor peso molecular e aminoácidos presentes na amostra. Destaca-se também que as temperaturas de refrigeração do leite constatadas permitem a multiplicação mais acentuada da microbiota psicrotrófica deterioradora que produz proteases capazes de hidrolisar as caseínas de forma inespecífica e influenciar nos índices de extensão e de profundidade da proteólise.

O número de micro-organismos no leite cru está relacionado às condições higiênicas da produção e, ao tempo e temperatura em que o leite é armazenado.

**Tabela 15:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores relacionados aos índices de profundidade de proteólise (IPP) e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variável	Correlação	r	Prob > F	Equação da regressão
Temperatura do leite (°C)	Positiva	0,317	0,009	$y = - 1,467 + 1,936x$

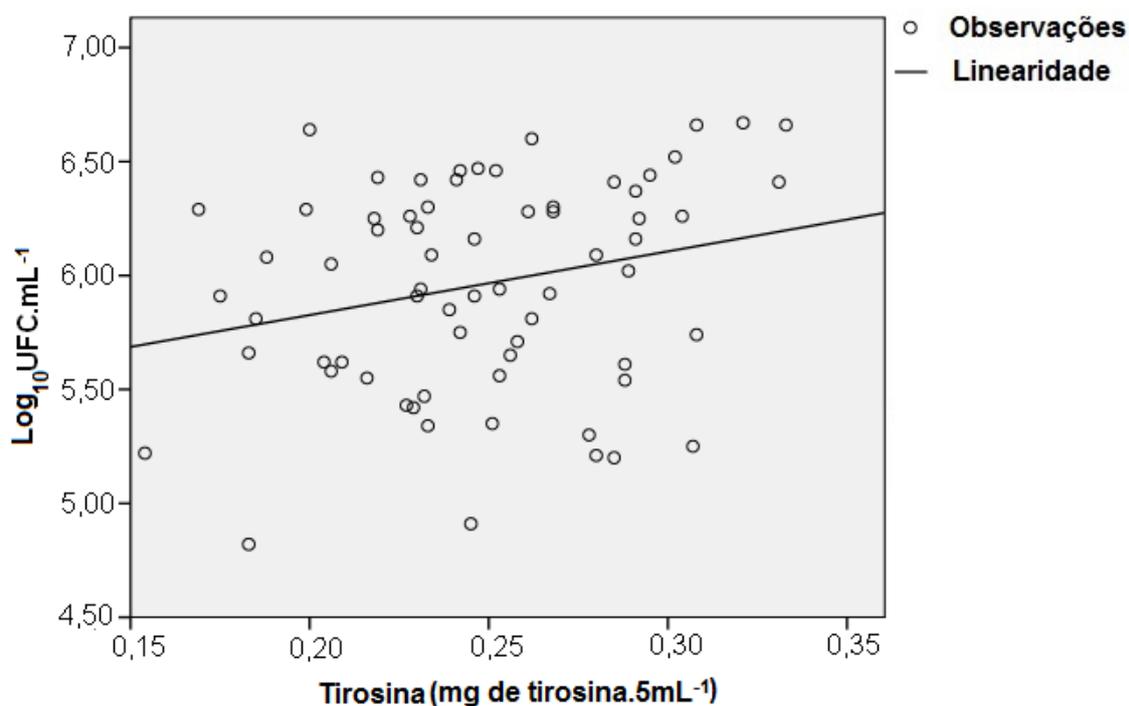


**Figura 23:** Correlação entre os percentuais de profundidade da proteólise (IPP) e as temperaturas do leite no momento da coleta (°C).

O grau de proteólise ( $\text{mg de tirosina} \cdot 5\text{mL}^{-1}$ ) correlacionou-se de forma positiva com a contagem total de bactérias e com o índice de extensão da proteólise (Tabela 16, Figuras 24 e 25), o que indicou o aumento da contagem total de bactérias há um aumento na hidrólise das proteínas, associado ao aumento na produção/concentração de proteases, que proporcionam uma crescente degradação proteica e liberação de peptídeos, que são indicados pelo aumento considerável do aminoácido tirosina livre no leite analisado.

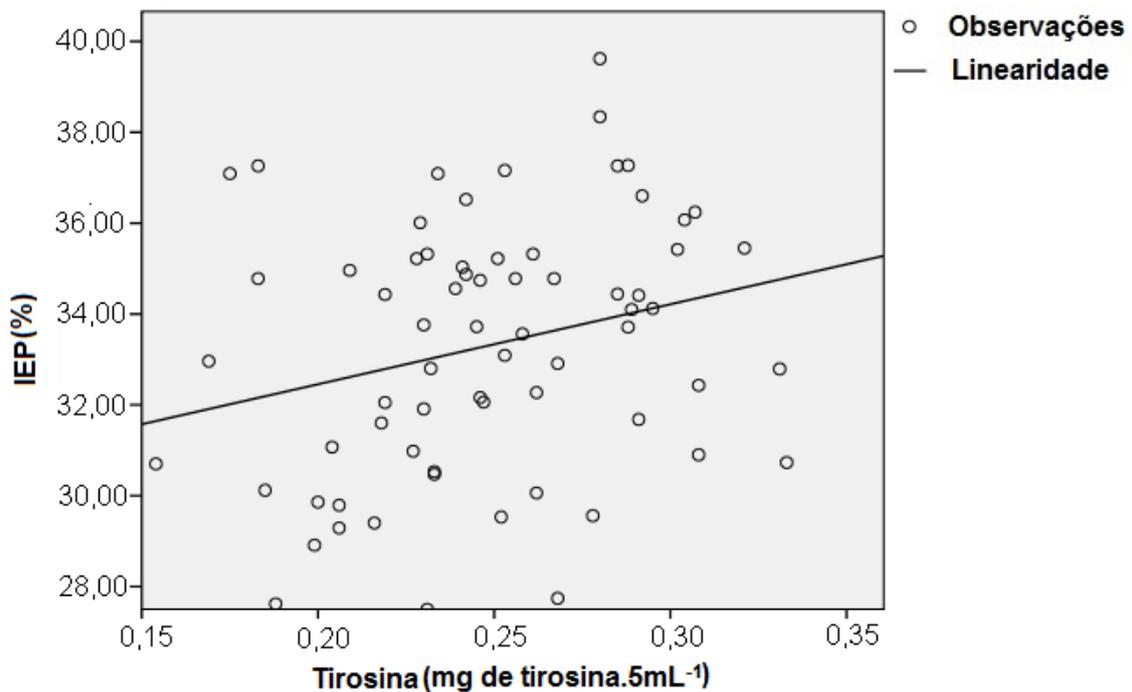
**Tabela 16:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores de tirosina ( $\text{mg}\cdot 5\text{mL}^{-1}$ ) e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variáveis	Correlação	R	Prob > F	Equação da regressão
$\text{Log}_{10}\text{CBT}$	Positiva	0,276	0,020	$y = 5,267 + 2,795x$
IEP (%)	Positiva	0,283	0,017	$y = 28,932 + 17,606x$



**Figura 24:** Correlação entre o grau de proteólise ( $\text{mg de tirosina}\cdot 5\text{mL}^{-1}$ ) e os valores da contagem total de bactérias ( $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot \text{mL}^{-1}$ ) no leite cru.

Portanto, com o aumento na hidrólise das proteínas há um aumento nos percentuais de peptídeos de alto peso molecular, que estão associados a fração do soro, aumentado, consequentemente, o índice de extensão da proteólise das amostras de leite.



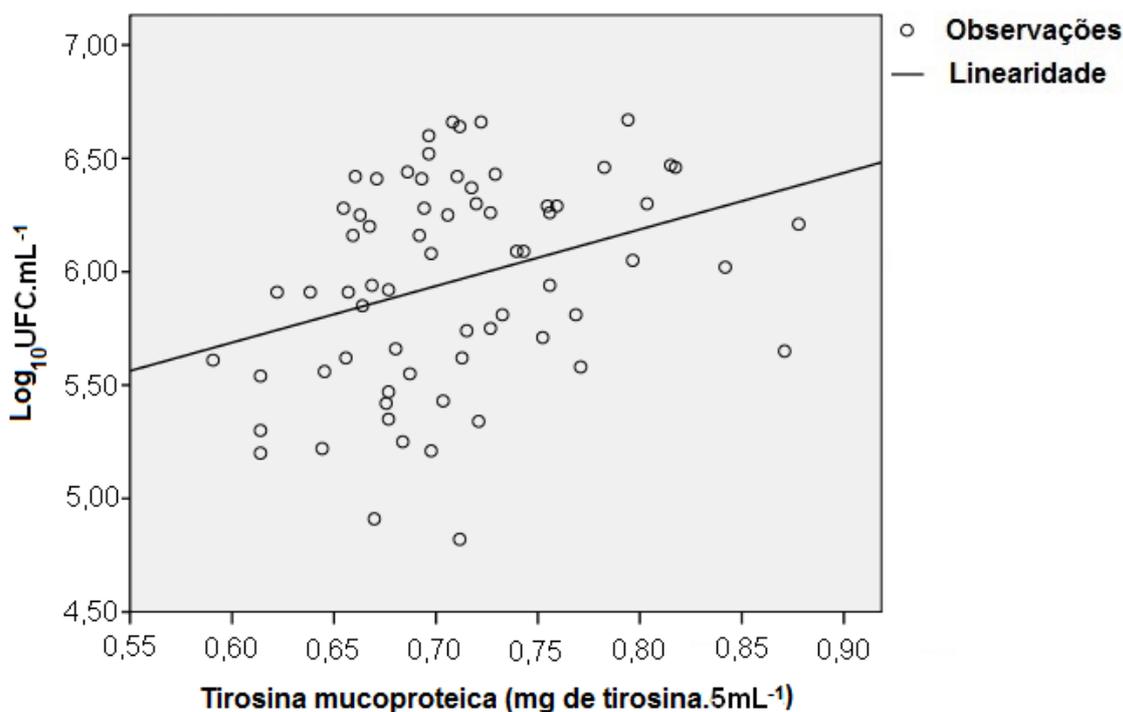
**Figura 25:** Correlação entre o grau de proteólise (mg de tirosina.5mL<sup>-1</sup>) e os percentuais de extensão da proteólise (IEP).

Segundo Chen *et al.* (2003), a correlação entre as concentrações de tirosina no leite não foi, significativamente, conclusiva em relação a alguns problemas mais específicos como perda de qualidade físico-química e ocorrência de características sensoriais indesejáveis, exceto em alguns casos, como o sabor amargo, que pode ser proveniente da hidrólise das estruturas proteicas e liberação de peptídeos de baixo peso molecular que são provenientes da ação enzimática.

A partir dos dados obtidos quando se utilizou kit de dosagem de mucoproteínas (Tabela 17, Figuras 26 e 27) constatou-se correlações positiva e significativa entre os índices de tirosina (mg.5mL<sup>-1</sup> em tirosina mucoproteica), contagem total de bactérias e contagem de micro-organismos psicotróficos. Estas correlações indicam que com o aumento da microbiota presente no leite cru ocorre hidrólise das proteínas devido a ação de enzimas extracelulares produzidas por estes micro-organismos.

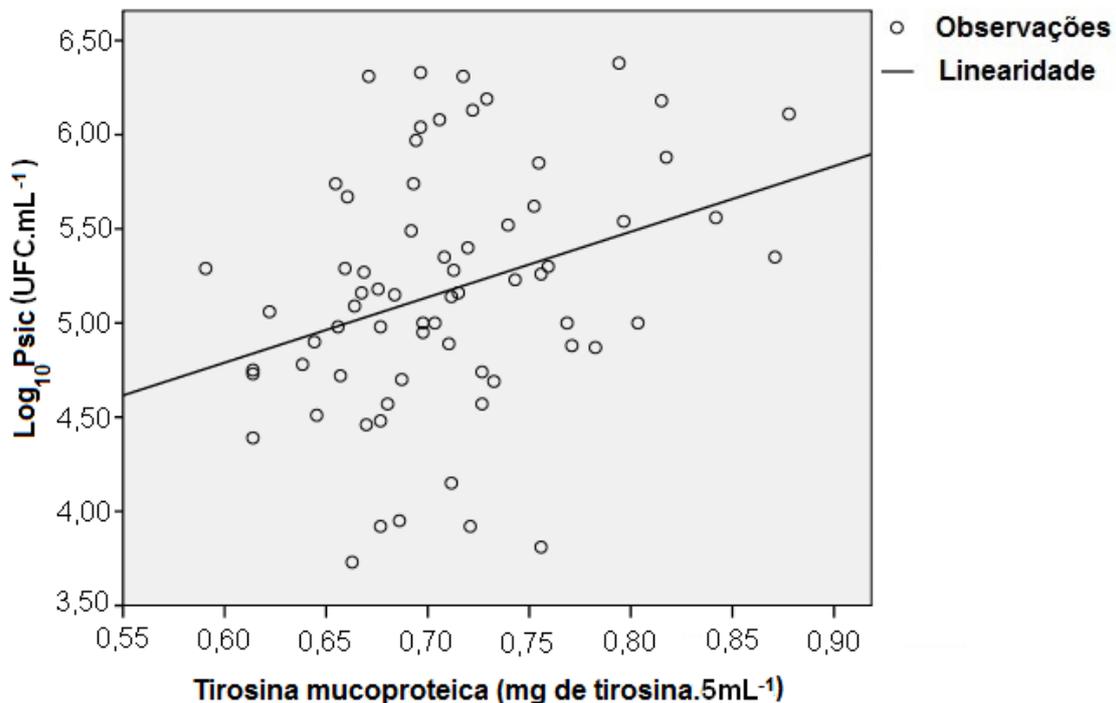
**Tabela 17:** Correlação linear através da regressão multivariada entre todos os valores de tirosina ( $\text{mg}\cdot 5\text{mL}^{-1}$  em tirosina mucoproteica), e as variáveis relacionadas á qualidade do leite.

Variáveis	Correlação	r	Prob > F	Equação da regressão
$\text{Log}_{10}\text{CBT}$	Positiva	0,325	0,007	$y = 4,195 + 2,489x$
$\text{Log}_{10}\text{Psic}$	Positiva	0,319	0,008	$y = 2,707 + 3,471x$



**Figura 26:** Correlação entre o grau de proteólise ( $\text{mg}\cdot 5\text{mL}^{-1}$  em tirosina mucoproteica) e contagem total de bactérias ( $\text{Log}_{10}\text{UFC}\cdot \text{mL}^{-1}$ ) do leite cru.

Pinto (2004) constatou que amostras de LDR 12% inoculadas com duas estirpes de *P. fluorescens* (07A e 041) e incubadas em diferentes temperaturas (2, 4, 7, 4 10°C) desenvolveram uma evolução no grau de proteólise até que a contagem atingisse  $8,0 \log \text{UFC}\cdot \text{mL}^{-1}$ , sendo que no início da fase estacionária de crescimento em todas as temperaturas avaliadas, ocorreu uma aceleração do aumento dos valores de tirosina presente no meio.



**Figura 27:** Correlação entre o grau de proteólise ( $\text{mg} \cdot 5\text{mL}^{-1}$  em tirosina mucoproteica) e contagem de micro-organismos psicotróficos ( $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) no leite cru.

No entanto, embora Pinto (2004) tenha observado um aumento da proteólise com o aumento da população de *P. fluorescens* no leite, esta indicação não pode ser generalizada para a correlação entre contagem de psicotróficos e índice de proteólise, considerando que altas contagens de micro-organismos psicotróficos no leite, não demonstram necessariamente a atividade proteolítica mais acentuada, em relação à amostras com altas contagens, principalmente, a microbiota contaminante e a atividade de enzimas endógenas presentes no leite.

Portanto, o desenvolvimento de pesquisas que tragam uma abordagem sobre métodos que permitam de forma mais simples e de rápida definição do estado de degradação das proteínas do leite e, conjuntamente, a população microbiana contaminante, tornando mais ágil o processo de triagem da matéria-prima na linha de processamento, permitindo inferir diretamente sobre qualidade dos derivados lácteos.

Constatou-se também, durante o presente estudo, correlações significativas entre as amostras instáveis ao teste do álcool 72% v/v., índice de tirosina (mg de tirosina.5mL<sup>-1</sup>) e contagem total de bactérias (Tabela 18).

**Tabela 18:** Correlação categorizada (p<0,05) através da regressão logística univariada, entre as amostras avaliadas como instáveis ao álcool 72% v/v. em relação a contagem bacteriana total e grau de proteólise.

	Nº amostras	Nº amostras instáveis (%)	Razão de Chances	Prob > F
<b>Log<sub>10</sub>CBT (UFC.mL<sup>-1</sup>)</b>				
de 4,81 até 6,03	34	2 (5,9%)	1,00	0,013
de 6,04 até 6,67	34	11 (32,4%)	7,65 (1,55 - 37,87)	
<b>Grau de proteólise (mg de tirosina.5mL<sup>-1</sup>)</b>				
de 0,154 até 0,264	35	3 (8,6%)	1,00	0,049
de 0,265 até 0,333	33	10 (30,3%)	4,63 (1,15 - 18,75)	

A observação feita pela categorização das amostras, diferenciando-as de instáveis e estáveis ao teste com álcool 72% v/v., possibilitou a análise da regressão logística univariada ( $p \leq 0,05$ ), para as variáveis que representaram o Log<sub>10</sub>CBT e a quantidade do aminoácido tirosina. O levantamento foi executado a partir da sua razão de chance de ser considerado instável a partir de sua mediana, sugerindo uma análise sobre índices importantes.

A partir desta avaliação, as amostras que apresentaram contagem bacteriana total acima de 6,04 log<sub>10</sub>CBT.mL<sup>-1</sup>, apresentaram um aumento de 665%, para que estas amostras fossem consideradas como instáveis ao teste do álcool 72% v/v., em relação as outras amostras analisadas com valores menores ou iguais a 6,03 log<sub>10</sub>CBT.mL<sup>-1</sup>.

Segundo Pinto (2004), a uma associação entre o número de micro-organismos, grau de proteólise e o tempo de estocagem do leite, inferindo sobre a perda da estabilidade térmica. Em amostras com população microbiana superior a 7,0 log<sub>10</sub>UFC.mL<sup>-1</sup>, foram mais susceptíveis à instabilidade térmica durante o aquecimento a 72°C, por 15 segundos.

As amostras analisadas que apresentaram valores acima de 0,265 mg de tirosina.5mL<sup>-1</sup> de leite apresentaram um aumento de 363%, para que estas amostras fossem consideradas como susceptíveis a instabilidade ao teste do

álcool 72% v/v., em relação as amostras analisadas com valores menores ou iguais a 0,265 mg de tirosina.5mL<sup>-1</sup> de leite.

Segundo Arcuri *et al.* (2004), as causas mais comuns da instabilidade do leite ao etanol estão relacionadas com o desenvolvimento de micro-organismos fermentadores da lactose com o aumento da acidez, a alta incidência de mastite no rebanho e um possível desequilíbrio salino no leite, sendo muitas vezes relacionada também à presença de micro-organismos psicrotróficos e psicrotrófico proteolíticos, a exemplo da espécie *P. fluorescens*, principal bactéria psicrotrófica isolada do leite cru refrigerado no Brasil.

## 7. CONCLUSÕES

Embora a maioria das amostras analisadas, cerca de 88,2%, estivessem de acordo com os padrões de qualidade composicional exigido pela legislação, os valores relacionados aos indicadores microbiológicos e de sanidade do rebanho, não demonstraram valores satisfatórios, apenas 10,3% apresentaram resultados que atendem aos parâmetros da IN 62/2011, a partir do dia 01 de Julho de 2014. Apresentando as dificuldades que o setor produtivo, que ainda não está se adequando as exigências quanto a sanidade do rebanho e os métodos de obtenção e manutenção da qualidade higiênica do leite.

A partir dos estudos sobre a correlação entre as variáveis estudadas, observou-se a relação entre a sanidade do rebanho e da temperatura de armazenamento no aumento do número de bactérias; além da influência de alguma infecção sobre a síntese e liberação do leite pela glândula mamária.

A contagem de micro-organismos psicotróficos proteolíticos não demonstrou qualquer correlação significativa com alguma variável que pudesse responder sua ocorrência no leite, devido em grande parte, a dificuldade de observar a formação do halo de clarificação, em placas com muito populosas. Porém, a contagem de micro-organismos psicotróficos, apresentou correlação significativa com a contagem total de bactérias, o que demonstra a relação da higiene na obtenção e armazenamento do leite nas fazendas sobre a qualidade do leite.

A avaliação da produção de proteases dos micro-organismos isolados das amostras analisadas apresentou uma evolução do diâmetro dos halos de clarificação em todas as temperaturas, desde a observação com 24 horas até 120 horas de incubação. Outro aspecto observado foi a formação de halos com maior diâmetro, à medida que a temperatura de incubação foi maior para cada isolado. Porém, em alguns isolados a produção de proteases foi menor quando foi o isolado foi incubado em temperatura, por meio da variação da capacidade proteolítica em algumas linhagens de bactérias psicotróficas, em diferentes faixas de temperatura.

A avaliação dos índices de profundidade e extensão da proteólise apresentaram valores relacionados a atividade proteolítica endógena no leite,

por meio do índice de extensão da proteólise; e a partir dos valores relacionados aos índices de profundidade da proteólise, obtivemos dados sobre a atividade proteolítica exógena sob o leite analisado. E dentro deste estudo podemos observar uma variação maior entre os valores médios percentuais para os índices de profundidade da proteólise, por meio de uma maior variação se deve a atividade proteolítica diferenciada presente no leite.

A avaliação da atividade proteolítica do leite, por meio do uso da azocaseína como substrato, não apresentou correlação significativa com as variáveis que pudessem responder seus valores, por meio da grande variabilidade da atividade proteolítica entre os micro-organismos.

A avaliação da proteólise no leite, por meio da quantificação de tirosina apresentou correlações significativas com a contagem total de bactérias e o índice de extensão da proteólise associado ao aumento na produção de enzimas extracelulares, com consequente aumento do percentual de soro-proteínas e dos índices dos aminoácidos livres no meio. Por outro lado, a quantificação de tirosina mucoproteica no leite, através da aplicação de um kit de quantificação de mucoproteínas, demonstrou uma correlação significativa com a contagem total de bactérias e a contagem de psicotróficos presente no leite. Em ambos foi observada uma alta variação nos dados, por conta da diversidade da microbiota proteolítica nas amostras analisadas.

Quanto ao teste de estabilidade ao álcool 72% v/v., 19,% das amostras analisadas foram classificadas como instáveis, mas esta estabilidade poderia estar ligada a diversos fatores como a acidez elevada, ao leite instável não ácido (LINA) ou algum desequilíbrio salino mediante à problemas na alimentação, período de lactação ou raça do animal. E com estes mesmos dados, foi observado a correlação da contagem total de bactérias e os valores de tirosina no leite pelo método descrito por Hull (1947), ocasionando a instabilidade do leite ao teste do álcool a 72% v/v., em amostras que apresentaram valores de  $\text{Log}_{10}\text{CBT}$  acima de  $6,04 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ , e para concentração de tirosina no leite acima de  $0,265 \text{ mg.5mL}^{-1}$ , associado esta instabilidade a ação de proteases de origem microbiana sobre as caseínas do leite.

Os resultados forneceram observações importantes sobre o uso do kit de dosagem de mucoproteínas, como um bom indicador quanto a proteólise ocorrida no leite, porém faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o sua proposta de mensuração. Sendo através da conciliação entre os métodos de quantificação de tirosina (método de Hull com o kit de mucoproteínas); o desenvolvimento de um kit com os reagentes utilizados pelo método descrito por Hull (1947); como também o aperfeiçoamento de sua sensibilidade e especificidade, com o propósito de minimizar a influência de outros fatores aos seus resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBILLOS S. M.; BUSTO, M. D., PEREZ-MATEOS, M.; ORTEGA, N. Analysis by capillary electrophoresis of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease on bovine caseins. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-1200, 2007.

ARCURI, E.; TAVARES, W.; PEREIRA, D.; BRITO, M. Efeito do crescimento de *Pseudomonas* sp. proteolítica na estabilidade do leite ao etanol. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 140-144, 2004.

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.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16. ed. Washington, 1995.

BARBOSA, J. B.; TALMA, S.V.; BATISTA, C.S.; MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O. Avaliação de rendimento da produção dos queijos Minas Frescal, Minas Padrão e Mussarela fabricado com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 64, n. 371, p.27-34, 2009.

BIASUTTI, E. A. R. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina**. 88p. (Dissertação). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. 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 União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p.13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 32, de 30 de junho de 2011. Prorroga por seis meses a vigência dos prazos estabelecidos para a adoção de novos limites microbiológicos e de células somáticas, que entrariam em vigor a partir de 1º de julho de 2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, dispostos na Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de julho de 2011. Seção 1, p. 4. a

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera o caput... da Instrução Normativa nº 51 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, p.6-11. b

BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D. **Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 92**. Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, p. 8, 2007.

BRITO, M. A. V. P. Influência das células somáticas na qualidade do leite. In: MINAS LEITE: Qualidade do leite e produtividade dos rebanhos leiteiros. **Anais...** Juiz de Fora, 1, p.41-46,1999.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.57, p.83-88, 2002.

BRITO, M. A. V. P. E.; SOUZA, G. N.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. **Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 99**. Qualidade do leite armazenado em tanques coletivos. Juiz de Fora, Embrapa Gado de Leite, p. 8, 2009.

BRUM, J. V. F.; GONÇALVES, N. B.; MASSON, M. L. Pesquisa de microorganismos psicotróficos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., 2004, Juiz de Fora, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.59, n. 339, p.150-154, 2004.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 848-854, 2005.

CARDOSO, R.R. **Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.

CHEN, L. D. R. M.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COSTA, F. F.; RESENDE, J. V.; ABREU, L. R.; GOFF, H. D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 6, p. 2165-2174, 2008.

COSTA, F. F.; BRITO, M. A. V. P.; GUIMARÃES, M. F. M.; FURTADO, M. A. M.; PINTO, I. S. B. Identificação e Quantificação do perfil protéico do leite. **Caderno de Tecnologia de Laticínios**, v. 92, p.124-125, 2011.

CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E.; FERNANDES, A. M.; OLIVEIRA, C. A. F. D. Relationship between plasmin activity and casein fractions during storage of UHT milk. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 29-33, 2013.

COUSIN, M. A.; MARTH, E. H. Lactic acid production by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 406-410, 1977.

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

CREAMER, L. K. Electrophoresis of cheese. **International Dairy Federation, IDF Bulletin** v. 261, p. 14-28, 1991.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.36, n.2, p.173-182, 2003.

De KRUIF, C.G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. 3.ed. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, v.1, p.233-276. 2003.

De NONI, I.; PELLEGRINO, L.; CATTANEO, S.; RESMINI, P. HPLC of proteose peptones for evaluating ageing of packaged pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v.17, n. 1, p.12-19, 2007.

De RHAM, O.; ANDREWS, A. T. Qualitative and quantitative determination of proteolysis in mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, v. 49, p. 587-596, 1982.

DePETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2043-2070, 1992.

DOS SANTOS, P. A.; DA SILVA, M. A. P.; MOREIRA, G. D. N.; BARROS, J. C.; DE OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado in vitro com *Pseudomonas fluorescens*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 313-320, 2010.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food microbiology**, v. 26, n. 2, p. 228-231, 2009.

ESTEVEZ, E. G. **Componentes nitrogenados: metodologias analíticas e associações com outros indicadores de qualidade do leite cru refrigerado**. 127 p. (Dissertação). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.

FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 4, p. 901-908, 1998.

FARREL, H.M. JR., JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G.T.; BROWN, E.M.; BUTLER, J.E.; CREAMER, L.K.; HICKS, C.L.; HOLLAR, C.M.; NG-KWAI-HANG, K.F.; SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FERREIRA, A. A.; MARQUES, K. A.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, E. M. F.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L. Influência da Atividade Enzimática de *Pseudomonas fluorescens* 041 em Labneh. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 17-24, 2012.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, 2012.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Estratégias para redução da contagem de células somáticas do leite. In: MINAS LEITE: Qualidade do leite e produtividade dos rebanhos leiteiros. **Anais...** Juiz de Fora, 1, p.47-52, 1999.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 2000. 544 p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. 3.ed. New York, Kluwer: Academic/Plenum Publisher, v.1, 2003.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. **Standard methods for the microbiological examination of dairy products**, American Public Health Association, 16 ed. p. 271-286, 1993.

GALANTE, V. A.; DA COSTA, E. O Associativismo Entre Os Produtores De Leite Em Resposta A Instrução Normativa 51: O Caso Do Município De Santa

Izabel Do Oeste-Pr. In: **46° Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**, 2008.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473-484, 2005.

GILLIS, W. T.; CARTLEDGE, M. F.; RODRIGUES, I. R.; SUAREZ, E. J. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 11, p. 2875-2879, 1985.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. Purification and characterization of intracellular aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 1, p. 44-54, 1995.

GOUNOT, A. M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Experientia**, v. 42, n. 11-12, p. 1192-1197, 1986.

GUVEN, M.; YASAR, K.; KARACA, O. B.; HAYALOGLU, A. A. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 3, p. 180-184, 2005.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in protein chemistry**, v. 43, p. 63-151, 1992.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, n. 2, p. 255-263, 2003.

HORNE, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 11, n. 2, p. 148-153, 2006.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability. In: THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. **Milk protein: from expression to food**. New York, p.133-157. 2009.

HULL, M. E. Studies on milk proteins: II-Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 30, n. 11, p. 881-884, 1947.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk. Enumeration of somatic cells**. IDF, 8p. IDF Standard 148A; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1995.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole milk: Determination of milk fat, protein and lactose content-Guide for the operation of Mid-Infrared instruments**. IDF Standard 141 B; International Dairy Federation: Brussels, Belgium, 1996.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. D. A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicrófilas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, v. 60, n. 4, p. 452-457, 2013.

JAY, J. M. Low-Temperature Food Preservation and Characteristics of Psychrotrophic Microorganisms. In: JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 323-339

JENSEN, S. E. ; PHILLIPPE, L.; TSENG, T. J.; STEMKE, G. W.; CAMPBELL, J. N. Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and a laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian journal of microbiology**, v. 26, n. 1, p. 77-86, 1980.

KRÜGER, C. C. H. **Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeos de leite bovino**. 149p. (Tese). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra high temperature processed milk. **Journal Dairy Science, Champaign**, v. 74, n. 4, p. 1151-1156, 1991.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation fo ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 145-148, 1977.

LE, T.X.; DATTA, N.; DEETH, H.C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. **Food Research International**. v.39, n.7, p.823-830, 2006.

LOPES JÚNIOR, F. J. E.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. S.; MORAES, L. C. D.; SOUZA, G. N. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 691-696, 2012.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Milk salts: Technological significance. In: McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**; Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. New York: Springer, 2009. v. 3. p. 351-390.

MAGALHÃES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MAYERHOFER, H. J.; MARSHALL, R. T.; WHITE, C. H.; LU, M. Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 44-48, 1973.

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; MEZÊNCIO, J. M. S.; Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, 2004.

MARTINS, M.L.; ARAÚJO E.F.; MANTOVANI H.C.; MORAES C.A. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International journal of food microbiology**, v. 102, n. 2, p. 203-211, 2005.

MIRALLES, B.; RAMOS, M.; AMIGO, L. Influence of proteolysis of milk on the whey protein to total protein ratio as determined by capillary electrophoresis. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 9, p. 2813-2817, 2003.

MITCHELL, G. E.; FEDRICK, I. A.; ROGERS, S. A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 2. Cheddar cheese from farm bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 41, 1986.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: III-Factors influencing intermediate and long life dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 3, p. 67-72, 1996.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological research**, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.

NAKAMURA, A. Y.; ALBERTON, L. R.; OTUTUMI, L. K.; DONADEL, D.; TURCI, R. C.; AGOSTINIS, R. O.; CAETANO, I. C. S. Correlação entre as variáveis climáticas e a qualidade do leite de amostras obtidas em três regiões do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**. v. 15, n. 2, p. 103-108, 2012.

NARIMATSU, A.; DORNELLAS, J. R. F.; SPADOTI, L. M.; PIZAIA, P. D.; ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 177-182, 2003.

NETTO, G. G. **Avaliação do efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas na vida de prateleira de leite desnatado pasteurizado microfiltrado**. 74 p. (Dissertação). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta scientiae veterinariae**. v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46. 2010

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1129-1135, 2006.

ORTEGA, N.; ALBILLOS S. M.; BUSTO, M. D. Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. **Food Control**. v. 14, n. 5, p. 307-315, 2003.

PICHETH, G.; BRESOLIN, P. L.; PEREIRA JR, O.; JAWORSKI, M. C. G.; SANTOS, C. M.; PINTO, A. P.; ALCÂNTARA, V. M.; SCARTEZINI, M.; FADEL-PICHETH, C. M. Mucoproteína versus alfa-1-glicoproteína ácida: o que quantificar? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 87-91, 2002.

PINTO C. L. O.; CARDOSO R. R.; VANETTI M. C. D. Bactérias psicrotróficas proteolíticas e potencial determinador a temperaturas de refrigeração. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**. v. 59, n. 339, p.110-117, 2004.

PINTO, C. L. de O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 97p. (Tese). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004.

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

PINTO, C. L. de O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D.; SILVA, R. F. P. Bactérias psicrotróficas e importância do controle de sua contaminação na cadeia do leite. In: PINTO, C. L. de O.; PICCOLO, M. da P.; BRITO, M. A. V. P.; MARTINS, M. L.; MACÊDO, C. S.; FARIÑA, L. O. de. **Qualidade microbiológica do leite cru**. Viçosa: EPAMIG Zona da Mata, 2013, p. 135-156.

POLITIS, I.; BIZELIS, I.; TSIARAS, A.; BALDI, A. Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 3, p. 273-278, 2004.

PRADA, L. F.; PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIÉS, G. A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II-lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 330-333, 2000.

RAJČEVIČ , M.; POTOČNIK, K.; LEVSTEK, J. Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. **Agriculturae Conspectus Scientificus**., v.68, p.221-226, 2003.

RANGEL, A. H. D. N.; MEDEIROS, H. R. D.; SILVA, J. B. A. D.; BARRETO, M. L. D. J.; LIMA JÚNIOR, D. M. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 3, 2009

RECIO, I.; AMIGO, L.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 697, n. 1, p. 231-242, 1997.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

RICHARDSON, B. C. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity New Zealand. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 18, n. 3, p. 233-245, 1983.

SAMARŽIJA, D.; ZAMBERLIN, Š.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANTANA, E. H. W.; DE. BELOTI, V.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA, M. A. de.; MORALES, L. B. de.; PEREIRA, M. S.; GUSMÃO, V. V. Milk Contamination in different points of the dairy process. II-Psychrotrophics and proteolytics microorganisms, **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, p. 349-358, 2004.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R.; Psicrotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. **Boletim Sociedade Brasileira Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 22, p. 129-138, 1999.

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

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003.

SANTOS, M. V. D.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R. D.; BOTARO, B. G. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição ea proteólise do leite. **Ciência rural**, v. 36, n. 5, p. 1486-1493, 2006.

SCHMIDT, D.G.; FOX P. F. Association of caseins and casein micelle structure. **Developments in dairy chemistry**, v. 1, p. 61-86, 1982.

SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico - prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001, 125p.

SILVA, P. H. F. da. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, v. 6, p. 3-5, 1997.

SILVA, P. H. F.; ABREU, L. R.; BRITO, J. R. F.; FURTADO, M. A. M. Variações regionais e sazonais na composição salina do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 59, n. 339, p. 25-31, 2004.

SIMÕES, M., SIMÕES, L.C., VIERIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificações**. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophics and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1999, Juiz de Fora, MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, p.238-241, 1999.

SOUZA, G. N., SILVA, M. R., SOBRINHO, F. S., COELHO, R. O., BRITO, M. A. V. P., & BRITO, J. R. F. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 830-834, 2005.

SOUZA, G. N.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na região sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Janeiro/2007 a junho/2008. In: **Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. p. 187-189, 2008.

SOUZA, A. B. **Avaliação da influência tecnológica da relação soro-proteína/caseínas durante condições simuladas de processamento térmico**. 78p. (Dissertação). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, 2013.

STRANGE, E. D.; MALIN, E. L.; VAN HEKKEN, D. L.; BASCH, J. J. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. **Journal of Chromatography**, v. 624, n. 1, p. 81-102, 1992.

SUHREN, G. II-Producer Microorganisms. In: MCKELLAR, R. C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton, Florida: CRC Press, p.4-34, 1989.

TRUJILLO, A. J.; CASALS, I.; GUAMIS, B. Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 11-19, 2000.

VALSECHI, O. A. O leite e seus derivados. **Tecnologia de Produtos Agrícolas de Origem Animal**. Araras, 2001.

VELOSO, A. C. A. **Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE**. 126p. (Dissertação). Universidade de Porto, Porto-Portugal, 2001.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M.; FERREIRA, M. da A. Metodologias de doseamento das proteínas do leite. **Boletim de Biotecnologia**, n. 69, p. 17-31, 2001.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

VENTURA, R. V.; LEME, T. A. R. P.; MENDONÇA, L. C.; DIAS, M. S.; AMORIM, M. A. Contagem de células somáticas e seus efeitos nos constituintes do leite. In: II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Goiânia. **Anais...** Goiânia, p.187-189, 2006.

VERT, R. T.; BARDANO, D. M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 7, p. 2077-2081, 1991.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PENNA, A.L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

VIEIRA, V. F. **Características Físico-Químicas e Sensoriais de Queijos Mussarela elaborados a partir de Contagens de Células Somáticas**. 71 p. (Dissertação). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga-BA, 2010.

WAUGH, D. F. The interactions of  $\alpha$ - $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. **Discussions of the Faraday Society**, v. 25, p. 186-192, 1958.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist?. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3, p. 189-192, 1999.

WINZLER, R. J.; DEVOR, A. W.; MEHL, J. W.; SMYTH, I. M. Studies on the mucoproteins of human plasma. I-Determination and isolation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 27, n. 5, p. 609, 1948.

WINZLER, R. J. Determination of serum glycoproteins. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 2, p. 279-311, 1955.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L.; LIMA, A. de. Extensão e profundidade de proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 44, n. 261, p. 50-54, 1989.

## APÊNDICE 1

**Tabela 1:** Valores médios (n=4), com o desvio padrão e seus valores mínimos e máximos, relativos às variáveis estudadas do leite cru

Variáveis	Médias	Mínimo – Máximo
Temperatura (°C)	8,0 ± 5,7	2 – 32
Volume (Litros)	428,7 ± 408,6	50 – 2000
Log CCS (célula.mL <sup>-1</sup> )	5,65 ± 0,29	4,80 – 6,23
Log CBT (UFC.mL <sup>-1</sup> )	5,96 ± 0,46	4,82 – 6,67
Log Psicotrófico (UFC.mL <sup>-1</sup> )	5,17 ± 0,65	3,73 – 6,38
Log Psic. Proteolítico (UFC.mL <sup>-1</sup> )	3,16 ± 1,38	2,00 – 6,04
Gordura (%)	3,48 ± 0,31	2,62 – 4,12
NT - Proteína Total (%)	3,22 ± 0,15	2,92 – 3,61
NS <sub>pH4,6</sub> → Soro-Proteínas (%)	1,07 ± 0,09	0,86 – 1,25
NS <sub>TCA 12%</sub> → Peptídeos e aminoácidos (%)	0,155 ± 0,029	0,097 – 0,234
NT - NS <sub>pH4,6</sub> → Caseínas (%)	1,99 ± 0,14	1,69 – 2,43
Lactose (%)	4,48 ± 0,12	4,03 – 4,69
EST (%)	12,10 ± 0,41	11,05 – 12,99
ESD (%)	8,62 ± 0,20	7,91 – 9,12
Índice Extensão de Proteólise (%)	33,30 ± 2,81	27,50 – 39,62
Índice de Profundidade de Proteólise (%)	4,87 ± 0,92	2,91 – 7,56
Atividade Proteolítica (Azocaseína) (UEP.0,1mL <sup>-1</sup> .hora)	2,29 ± 1,01	0,25 – 5,85
Tirosina método de Hull (mg.5mL <sup>-1</sup> )	0,248 ± 0,041	0,154 – 0,333
Kit de Mucoproteína Tirosina (mg.5mL <sup>-1</sup> )	0,709 ± 0,060	0,590 – 0,878

