

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA - UNIFOR-MG

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

EUDORO DA COSTA LIMA NETO

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E CLASSIFICAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA EM LEITE CRU
CAPTADO EM LATICÍNIOS NO MUNICÍPIO DE PIUMHI-MG**

FORMIGA-MG

2018

EUDORO DA COSTA LIMA NETO

QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E CLASSIFICAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA EM LEITE CRU
CAPTADO EM LATICÍNIOS NO MUNICÍPIO DE PIUMHI-MG

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR –
MG., como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Msc. Priscila Mara Rodarte
Lima e Pieroni

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Borges
Acurcio

FORMIGA-MG

2018

Eudoro da Costa Lima Neto

Quantificação de micro-organismos e classificação de sua atividade enzimática proteolítica e lipolítica em leite cru captado em laticínios no município de Piumhi-MG.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR – MG., como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Msc. Priscila Mara Rodarte Lima e Pieroni

Orientador

Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio
Coorientador

Prof. Dr. Mariana André Pompeu

UNIFOR-MG

Formiga, 10 de julho de 2018.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UNIFOR-MG

L732 Lima Neto, Eudoro da Costa.
Quantificação de micro-organismos e classificação de sua atividade enzimática proteolítica e lipolítica em leite cru captado em laticínios no município de Piumhi-MG / Eudoro da Costa Lima Neto. – 2018.
28 f.

Orientadora: Priscila Mara Rodarte Lima e Pieroni.
Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Centro Universitário de Formiga - UNIFOR, Formiga, 2018.

1. Micro-organismos. 2. Leite. 3. Psicotróficos. I. Título.

CDD 637.1

Catálogo elaborado na fonte pela bibliotecária
Regina Célia Reis Ribeiro – CRB 6-1362

RESUMO

O principal método utilizado para avaliação da qualidade do leite é o perfil microbiológico, porque, elevadas taxas de micro-organismos no leite, resultam em impacto direto na sua vida útil, pois, estes promovem a putrescência dos principais elementos do leite. Os micro-organismos identificados no leite podem ser classificados em três grupos: mesofílicos, termodúricos e mesofílicos psicrotóxicos, popularmente denominados simplesmente de psicrotóxicos. Estes micro-organismos são os que mais participam na putrescência do leite e seus derivados lácteos, deteriorando o leite ao se multiplicarem antes do beneficiamento e também após o beneficiamento do leite por atividade de suas enzimas termorresistentes. O objetivo deste trabalho foi quantificar as bactérias psicrotóxicas e classificar a presença e atividade das enzimas proteolíticas e lipolíticas destas, presentes em leite cru resfriado de laticínios do centro-oeste de Minas Gerais. As amostras de leite cru resfriados, foram coletadas em tanques de expansão de três laticínios no município de Piumhi, MG. Foram coletadas três amostras por laticínio, onde foram homogeneizadas e diluídas em tubos contendo salina estéril (0,9% NaCl) e formadas alíquotas. Foram espalhados 0,1ml das diluições em placas de petri contendo ágar *BHI*, em seguida foram incubadas a 7°C e a 37°C, durante um período máximo de sete dias. Os resultados parciais foram observados a cada 48h. Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à morfologia das suas colônias e quanto às suas características morfotintoriais. A capacidade de produzir proteases, foi determinada em ágar caseinato de cálcio, e de produzir lípases em ágar tributirina. Os resultados encontrados na contagem de micro-organismos totais das amostras de leite cru coletadas, expressaram variações de $9,6 \times 10^6$ UFC/ml a $1,32 \times 10^7$ UFC/ml. Quanto aos morfotipos das colônias isoladas; 14 morfotipos diferentes foram encontrados e caracterizados. Em relação às características morfotintoriais, oito isolados apresentaram-se com Gram negativos (57,1%) e seis como Gram positivos (42,8%). No que tange o perfil enzimático das amostras, observou-se baixa incidência de micro-organismos com capacidade lipolítica e uma incidência maior de micro-organismos com capacidade proteolítica a 37°C. Não houve lipólise e observou-se uma incidência de proteólise insignificante a 7°C.

Palavra-chave: Ação enzimática. Leite-cru. Psicrotóxicos.

ABSTRACT

The main method used to evaluate the quality of milk is the microbiological profile, because high levels of micro-organisms in milk, resulting in a direct impact on their life, because they promote the putrescence of the main elements of the milk. The micro-organisms identified in milk can be classified into three groups: mesophilic, psychrotrophic and mesophilic thermophilic, popularly called simply psychrotrophics. These micro-organisms are the most involved in milk putrescence and their dairy products, deteriorating milk to multiply before processing and also after the milk processing activity for its heat-resistant enzymes. The objective of this study was to quantify the psychrotrophic bacteria and classify the presence and activity of proteolytic enzymes and lipolytic those present in raw milk dairy cold of the Midwest of Minas Gerais. The cooled raw milk samples were collected from dairy three expansion tanks in the city of Piumhi, MG. Three samples were collected from dairy where they were homogenized and diluted into tubes containing sterile saline (0.9% NaCl) and aliquots formed. Were spread in 0.1 ml of the dilutions petri dishes containing BHI agar then were incubated at 7 ° C and 37 ° C for a period of seven days. The partial results were observed every 48 hours. Bacterial isolates were evaluated for morphology of their colonies and about their morphotinctorial features The ability to produce proteases was determined in agar calcium caseinate, and produce lipases on tributyrin agar. The results in total microorganism count of samples of raw milk collected variations expressed $9,6 \times 10^6$ CFU / ml to $1,32 \times 10^7$ CFU / ml. As for the morphotypes of isolated colonies; 14 different morphotypes were found and characterized. Regarding morphotinctorial features eight isolates presented with Gram negative (57.1%) and six as Gram positive (42.8%). Regarding the enzymatic profile of the samples was observed low incidence of microorganisms with lipolytic capacity and a higher incidence of micro-organisms having proteolytic capacity at 37 ° C. And lipolysis was not observed a negligible effect proteolysis at 7 ° C.

Keyword: Enzymatic action. Raw milk. Psychrotrophics.

LISTA DE ABREVIACOES

UAT: Ultra alta temperatura

CCS: Contagem de células somáticas

CBT: Contagem bacteriana total

Ufc/ml: Unidade formadora de colônias por mililitros

IN: Instrução normativa

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Quantificação de micro-organismos mesofilos (UFC/ml) a temperatura de 37°C	20
Quadro 2- Caracterizações morfológicas das colônias do laticínio DI	21
Quadro 3- Caracterizações morfológicas das colônias do laticínio VA	21
Quadro 4- Caracterização morfológicas das colônias do laticínio VI	21
Quadro 5- Características morfológicas e classificação morfotintorial apresentadas por micro-organismos em microscopia óptica após morfotintura (Gram).....	23
Quadro 6- Resultados encontrados de proteólise e lipólise após incubação a 37°C e a 7°C e crescimento a 37°C e a 7°C, para evidenciação de características psicrotólicas	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 LEITE	14
2.2 QUALIDADE DO LEITE.....	15
2.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO LEITE	15
2.4 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL	16
2.5 MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS.....	20
4.2 ASPECTOS MORFOTINTORIAIS	22
4.3 CARACTERÍSTICAS PSICOTRÓFICAS, PROTEÓLISE E LIPÓLISE.....	23
5 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil ocupa o quinto lugar no ranking mundial de produção de leite, com uma produção aproximada de 34 milhões de toneladas, possuindo assim um grande papel socioeconômico no agronegócio brasileiro, sendo Minas Gerais o principal produtor nacional, produzindo cerca de 26% do leite brasileiro (IBGE, 2016).

De acordo com a instrução normativa de identidade e qualidade de leite cru (IN 62), o leite é caracterizado como produto extraído da glândula mamária de bovinos fêmeas saudáveis, por meio de ordenha, sem interrupção, com higiene adequada, visando sempre a boa nutrição e o bem-estar animal (BRASIL, 2011).

Devido ao alto valor nutritivo, o leite é de extrema importância para a alimentação humana, contendo substâncias benéficas à saúde como: vitaminas, proteínas, sais minerais e carboidratos, sabendo-se que esta composição pode variar de acordo com a raça do animal, idade, estágio de lactação, alimentação, além das boas práticas de obtenção e fabricação (beneficiamento) do leite. O leite “in natura”, logo após a ordenha, possui condições adequadas para a multiplicação de micro-organismos responsáveis pela degradação das substâncias benéficas, diminuindo assim a vida útil do produto (CARDOSO, 2006; SILVA, 2010).

O principal método utilizado para avaliação da qualidade do leite é o perfil microbiológico, pois elevadas taxas de micro-organismos no leite resultam em impacto direto na sua vida útil, pois estes promovem a putrescência dos principais elementos do leite como: proteína, gordura e lactose (CHAMBERS, 2005; NERO et al., 2009)

Os micro-organismos identificados no leite, podem ser classificados em três grupos: mesofílicos, termofílicos e mesofílicos psicrotóxicos. Os psicrotóxicos se destacam neste contexto, pois, além de sua capacidade de se desenvolver em temperaturas mais baixas, produzem enzimas com atividades proteolítica e lipolítica. Estes micro-organismos são os que mais participam na putrescência do leite e de derivados lácteos, deteriorando o leite ao se multiplicarem antes do beneficiamento,

e também, após o beneficiamento do leite, por atividades de suas enzimas que são termorresistentes. A atividade enzimática resultante de proteases e lipases, está associada com a piora da qualidade sensorial e com o baixo rendimento deste leite e seus derivados. Os principais micro-organismos psicrotróficos associados ao leite são não patogênicos, mas alguns gêneros podem causar quadros de intoxicação alimentar (BRITO, 1998).

O objetivo deste trabalho, foi quantificar as bactérias psicrotróficas e classificar as atividades enzimáticas proteolíticas e lipolíticas destas, presentes em leite cru resfriado de laticínios do centro-oeste de Minas Gerais, tendo em vista que estas atividades enzimáticas levam a uma deterioração dos componentes do leite, prejudicando assim o seu rendimento industrial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEITE

O leite é produzido durante a lactação e secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas bovinas, possui uma coloração branca ou até mesmo amarelada, odor característico agradável e sabor adocicado (SILVA, 2010).

Considerado um alimento muito importante e um dos mais completos, o leite é ótimo para alimentação de pessoas em qualquer faixa etária, pois ele é um alimento de alto valor nutricional, contendo proteínas, minerais (como o cálcio, magnésio, selênio), vitaminas (como a riboflavina, a vitamina B12 e a vitamina B5) que favorecem a formação e manutenção da saúde dos tecidos presentes no corpo humano além de fortalecerem os ossos. Tais nutrientes também favorecem o processo de cicatrização, melhoram o sistema imunológico, além de auxiliarem na conservação de cabelos e músculos. Todavia, o leite possui uma quantidade baixa de ferro e vitamina D, além da ausência de ácido fólico, não conseguindo atender as exigências nutricionais completamente (MÜLLER, 2002; BRITO; DIAS, 1998).

A classificação dos micro-organismos presentes no leite, pode ser assim disposta: desejáveis e indesejáveis. Os desejáveis são fundamentalmente aqueles responsáveis pelo processo metabólico, propiciando benefícios à saúde humana. Já os indesejáveis, advêm principalmente de uma atividade microbiana descontrolada, modificando as características e tornando o leite e seus derivados inadequados ao homem, podendo ser prejudiciais à saúde do consumidor (ROCHA, 2006; ORDONES et al, 2007).

2.2 QUALIDADE DO LEITE

Para uma produção de leite de qualidade, devemos sempre observar a saúde do animal, assim como a higienização dos utensílios de ordenha, e também as condições de armazenamento do produto (ARAÚJO et al., 2013).

Devido à grande capacidade de multiplicação de micro-organismos e a grande resistência à temperatura de refrigeração, o controle da qualidade deste leite, desde a ordenha até o seu beneficiamento, é de extrema importância. Todas as empresas responsáveis por coletar a matéria prima dos produtores, estão exigindo produtos de qualidade. Com estas mudanças, os produtores estão mais cuidadosos com a higienização dos utensílios, além da sanidade dos animais, para que obtenham produtos de qualidade cada vez melhores (GUERREIRO et al., 2005).

Com isso foram designados parâmetros para avaliação da qualidade do leite pela Instrução Normativa nº 62, com requisitos mínimos para composição do leite cru, dentre eles, a contagem de células somáticas e contagem bacteriana total (BRASIL, 2011).

A contagem bacteriana total está relacionada a uma contaminação indireta do leite, sendo os principais fatores ligados à higienização dos utensílios de ordenha, no transporte e armazenamento do leite, o que torna sua incidência, consequência da falta de boas práticas na hora da ordenha, na higienização dos equipamentos envolvidos e no processo de armazenamento do leite (VARGAS et al., 2013).

2.3 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO LEITE

As avaliações físico-químicas e biológicas do leite são de suma importância para indústrias e consumidores, pois estas avaliações consistem em estimar todos os elementos contidos na composição do leite, como teor de gordura e proteína, contagem de células somáticas e bacterianas totais, assegurando assim a qualidade da matéria-prima e possivelmente do produto final. Um dos principais fatores de importância desta avaliação, está em mostrar aos produtores que quando se produz

leite de forma inadequada, se produz matéria-prima em qualidade inferior à exigida pela legislação (MACHADO; CASSOLI, 2002).

Uma matéria-prima de qualidade inferior, irá gerar prejuízos para a indústria, além da produção de derivados de pior qualidade, o que impacta tanto aos produtores como aos consumidores finais. A gordura, por exemplo, é um componente que sofre muita variação, seja por fatores fisiológicos (como raça e idade) ou por fatores nutricionais ou patológicos (como a mastite), proporcionando derivados lácteos, como queijos; com rendimento, textura e aroma inferiores, caso a qualidade da matéria-prima não seja adequada (BARBOSA et al, 2014).

2.4 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

As avaliações de contagem bacteriana total possibilitam observar a quantidade de colônias bacterianas presentes no leite analisado, resultados estes que demonstram, principalmente, a falta de boas práticas agropecuárias, como má higienização dos equipamentos de ordenha, seja por utilização de água contaminada ou por limpeza indevida dos utensílios, além do estado de conservação em que os equipamentos se encontram, ou seja, de tudo que entre em contato com o leite (MACHADO; CASSOLI, 2002).

O parâmetro para a contagem bacteriana total, é designada pela UFC/ml (unidade formadora de colônia por mililitros) em que, para animais saudáveis, 10.000 UFC/ml é considerado um limite satisfatório. Os principais fatores que podem elevar esses níveis são: refrigeração inadequada do leite, devido a facilidade de proliferação das bactérias entre as temperaturas de 4°C e 63°C, devido a temperatura ótimas de crescimento de grupos de micro-organismos, com capacidade de resistirem as temperaturas de pasteurização e de micro-organismos psicotróficos, de crescerem em temperaturas mais baixas (ressaltando que os tanques de armazenamento do leite devem homogeneizar e resfriar a 4°C todo o leite contido em seu interior em um tempo de até duas horas, depois do fim da ordenha), transporte, condição de higiene dos equipamentos, currais, ordenhadores, como também manejo de ordenha inadequado (ORDÓNEZ et al., 2007).

2.5 MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS

A implementação de normas de refrigeração do leite após a ordenha, possibilitou a diminuição de perda do leite por inibir sua deterioração ácida e o crescimento de micro-organismos mesófilos. Essas normas adotadas no Brasil, por volta de 2002, atua de forma seletiva favorecendo o crescimento dos micro-organismos psicotróficos, devido ao crescimento destes em temperaturas mais baixas (FAIRBAIRN; LAW, 1986; BRASIL, 2002).

Dentro do grupo de micro-organismos psicotróficos presentes no leite, estão bactérias Gram negativos e Gram positivos, onde as mais encontradas no leite são aquelas pertencentes aos seguintes gêneros: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (SORHOUG; STEPANIAK, 1997). Os micro-organismos psicotróficos, são caracterizados por serem capazes de se desenvolver em temperatura de refrigeração abaixo de 7°C, mas com crescimento ótimo em temperatura ambiente (SANTOS; et al, 2009).

Devido a este fator, devemos compreender estes mecanismos de adaptação a baixas temperaturas, melhorando então as medidas de controle ao aumento destes micro-organismos no leite. A capacidade dos psicotróficos de se desenvolverem em baixas faixas de temperatura é devido a alterações dos lipídeos e das proteínas da membrana celular destes micro-organismos, que vão ser mais resistentes ao estresse térmico, promovidos pela refrigeração (PINTO, 2004).

A modificação dos lipídios, garante melhor capacidade de regulação da fluidez e permeabilidade da membrana celular, enquanto as alterações de proteínas são de caráter genotípico e são associadas a propriedades das enzimas bacterianas e aos seus sistemas de tradução, que não deixam de ocorrer mesmo em temperaturas inferiores. A adaptação dos micro-organismos psicotróficos, de se desenvolverem em baixas temperaturas, pode ser explicada pela preservação do fluxo metabólico celular. Para isso, são necessárias modificações estruturais das enzimas, para que elas mantenham sua capacidade catalítica eficiente, isso proporciona a estes micro-organismos adaptados ao frio, a característica de suas enzimas apresentarem alta atividade específica, mesmo em baixas temperaturas (PINTO, 2004).

Micro-organismos psicotróficos, estão presentes no ambiente, habitando solos, água e tecidos animais, sendo os principais deteriorantes de leite (especialmente o refrigerado) e seus derivados (RAJMOHAN, 2002). A grande maioria dos micro-organismos psicotróficos são eliminados por tratamento térmico, mas a deterioração que ocorre no leite se dá principalmente pela ação de enzimas produzidas por eles, enzimas essas, que são termorresistentes e mesmo com a pasteurização (72 a 75°C de 15 a 20 seg.) ou o tratamento UAT (130 a 150°C de 2 a 4 seg.) não são eliminadas do leite, resultando na deterioração do leite por atividade proteolítica e lipolítica (SORHAUG; STEPHANIAK, 1997).

As ações enzimáticas de proteólises atuam em sua maioria na κ -caseína, desestabilizando as micelas de caseína por meio de clivagem na porção C-terminal destas. As submicelas de κ -caseína, que são as mais afetadas, se situam na periferia da micela e proporcionam estabilidade à partícula de caseína. Sua hidrólise, faz com que haja a coagulação do leite, de modo similar ao que ocorre na coagulação enzimática (por ação da quimosina, por exemplo), desencadeando problemas tecnológicos como: baixo rendimento em derivados lácteos, amargor do leite e derivados, gelificação do leite UAT e produção exagerada de aminoácidos no período de maturação de queijos, proporcionando um sabor amargo e queda no rendimento (PINTO, 2004; TONDO et al., 2003; MOREIRA, 2010).

Já as enzimas que promovem lipólises, atuam hidrolisando triglicerídeos (que formam a gordura) em ácidos graxos de cadeia curta, através da lecitinase, consideradas umas das mais importantes lipases sintetizadas pelos psicotróficos, atua na ruptura da membrana dos glóbulos de gordura, e do mesmo modo através da enzima fosfolipase C, que também destroem a membrana dos glóbulos de gordura, contribuindo com as lipases, a degradação dos lipídeos, produzem odor desagradável no leite e derivados lácteos e podem rancificar queijos (PINTO, 2004; TONDO et al., 2003; NUNES, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite cru resfriado, foram coletadas em tanques de expansão, de três laticínios no município de Piumhi, MG, em frascos estéreis de 80 ml. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo até o laboratório de microbiologia do CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR – MG onde foram analisadas no período de março a junho.

Foram coletadas três amostras por laticínio, onde foram homogeneizadas e diluídas em tubos contendo 9ml de solução de salina estéril (0,9% NaCl) e formadas alíquotas a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Foram espalhados 0,1ml das diluições em placas de petri contendo ágar *BHI* (brain heart infusion, Himedia, Mumbai, India), em seguida foram incubadas a 7°C e a 37°C, durante um período máximo de sete dias. Os resultados parciais foram observados a cada 48h (dois dias) (FIGUEIREDO, 2017).

Primeiramente, os isolados bacterianos foram avaliados quanto à morfologia das suas colônias e quanto às suas características morfotintórias (avaliadas pela coloração de Gram e visualização em microscopia por imersão, aumento de 100x em microscópio óptico. A capacidade de produzir proteases, foi determinada em ágar caseinato de cálcio (Merck, Darmstadt, Germany) e de produzir lípases em ágar tributirina (Merck, Darmstadt, Germany), seguindo com incubação a 7°C e 37°C. A proteólise e a lipólise, quando presentes, foram evidenciadas por uma zona clara ao redor da colônia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS

Os resultados encontrados na contagem de micro-organismos totais das amostras de leite cru, coletadas expressaram variações de $9,6 \times 10^6$ UFC/ml a $1,32 \times 10^7$ UFC/ml (QUAD. 1). Pinto (2006), em termos de contagem, encontraram, assim como no presente estudo, uma alta contagem e supuseram que o leite captado sofre contaminação durante o processo de ordenha, devido aos fatores já descritos. Já Pereira (2010), observou que de sete empresas analisadas, quatro apresentaram alta contagem de micro-organismos e três estavam dentro do padrão exigido pela Instrução Normativa nº 51, que era na época de 750.000 UFC/ml. Cardoso (2005), por sua vez, também relatou contagem elevada de bactérias (acima de 10^6 UFC/ml), o que indica que o padrão parece ser mais para uma contagem elevada do que uma contagem reduzida, em se tratando de contagem bacteriana total de leite cru.

Os isolados, foram separados pelas características morfológicas das colônias que cresceram a 37°C em ágar *BHI* (Himedia), apresentaram resultados apresentados na tabela 2, 3 e 4, em que no laticínio DI foram encontrados cinco morfotipos diferentes, VA seis morfotipos e VI três morfotipos.

Quadro 1- Quantificação de micro-organismos mesofilos (UFC/ml) a temperatura de 37°C

LATICÍNIOS	37°C
DI	$1,32 \times 10^7$
VA	$1,56 \times 10^7$
VI	$9,6 \times 10^6$

Tabela 2- Caracterizações morfológicas das colônias do laticínio DI

Características	DI 1	DI 2	DI 3	DI 4	DI 5
Cor	Branca	Amarela	Amarela	Branca	Esbranquiçada
Transparência	Translúcida	Translúcida	Opaca	Translúcida	Opaca
Forma	Redonda	Redonda	Redonda	Indefinida	Redonda
Borda	Irregular	Regular	Regular	Irregular	Regular
Tamanho	Média a Pequena	Pequena	Pequena	Média a grande	Pequena

Tabela 3- Caracterizações morfológicas das colônias do laticínio VA

Características	VA 1	VA 2	VA 3	VA 4	VA 5	VA 6
Cor	Amarela	Esbranquiçada	Branca	Amarelada	Amarelada	Esbranquiçada
Transparência	Opaca	Translúcida	Opaca	Translúcida	Translúcida	Opaca
Forma	Indefinida	Redonda c/ depressão central	Redonda	Redonda	Redonda c/ depressão central	Redonda
Borda	Irregular	Regular	Regular	Regular	Regular	Irregular
Tamanho	Grande	Média	Média a grande	Pequena	Média	Média

Tabela 4- Caracterizações morfológicas das colônias do laticínio VI

Características	VI 1	VI 2	VI 3
Cor	Branca	Amarela	Branca
Transparência	Translúcida	Opaca	Translúcida
Forma	Redonda	Redonda	Redonda
Borda	Irregular	Regular	Irregular
Tamanho	Média	Pequena	Média

4.2 ASPECTOS MORFOTINTORIAIS

Resultados encontrados na morfotintura (coloração de GRAM e visualização em microscopia ótica sob imersão, aumento de 100x) demonstraram oito dos isolados são Gram negativos (57,1%) e seis são Gram positivos (42,8%) (quad. 5). Resultados que concordam com Silva (2005), que obteve em seus estudos prevalência de bactérias Gram negativos isoladas nas amostras de leite cru resfriado e prevalência menor de Gram positivos.

Nos resultados encontrados, houve prevalência de cocobacilos Gram negativo, que quando comparado com os estudos de ARCURI (2008), que encontrou uma incidência considerável de *Acinetobacter* spp, podendo sugerir que estes cocobacilos sejam do mesmo gênero, o que se torna preocupante, pois há diversos estudos com relação a resistência deste gênero a antibióticos e sua facilidade de disseminação como patógeno, principalmente para indivíduos imunossuprimidos.

Quadro 5- Características morfológicas e classificação morfotintorial apresentadas por micro-organismos em microscopia óptica após morfotintura (Gram).

Identificação	Característica	Gram
VA 1	Bacilo médio	Positivo
VA 2	Cocobacilo pequeno	Negativo
VA 3	Cocobacilo médio	Positivo
VA 4	Coco pequeno	Negativo
VA 5	Cocobacilo médio	Positivo
VA 6	Cocobacilo pequeno	Negativo
VI 1	Coco pequeno	Negativo
VI 2	Coco pequeno	Positivo
VI 3	Bacilo médio	Positivo
DI 1	Cocobacilo médio	Positivo
DI 2	Cocobacilo pequeno	Negativo
DI 3	Cocobacilo pequeno	Negativo
DI 4	Cocobacilo pequeno	Negativo
DI 5	Bacilo pequeno	Negativo

4.3 CARACTERÍSTICAS PSICOTRÓFICAS, PROTEÓLISE E LIPÓLISE

Em segundo momento, foi feito outro isolamento com amostras dos micro-organismos já elucidados para observação de características sugestiva de psicrotróficos (crescimento a 7°C), e avaliação de sua capacidade lipolítica em ágar tributirina e proteolítica em ágar caseinato de cálcio a 37°C e a 7°C, em que a proteólise e lipólise podem ser visualizadas por meio de halos em volta das colônias. O quadro 6, compila os resultados observados, que evidenciaram baixa incidência de micro-organismos, com capacidade lipolítica e uma incidência maior de micro-organismos com capacidade proteolítica a 37°C. Devido a esta faixa de temperatura e de que tenha ocorrido contaminação provável por micro-organismos do gênero *Pseudomonas* sp., que segundo Silva (2005), em seu estudo, este gênero

principalmente a espécie *Pseudomonas fluorescens*, se mostrou altamente produtora de protease e lipase. Não houve lipólise e uma incidência de proteólise insignificante a 7°C, resultados estes que corrobora com Valeriano (2007), que encontrou prevalência de atividade proteolítica e menor observação de atividade lipolítica, mas com diferença em relação ao presente experimento, visto que obteve seus resultados a temperatura de 25°C. Cardoso (2006) também observou em seu estudo, diferença com quantidade de micro-organismos proteolíticos superiores.

Quadro 6- Resultados encontrados de proteólise e lipólise após incubação a 37°C e a 7°C e crescimento a 37°C e a 7°C, para evidenciação de características psicotróficas

Identificação	Crescimento a 37°C	Proteólise 37°C	Lipólise 37°C	Características psicotróficas (Crescimento a 7°C)	Proteólise 7°C	Lipólise 7°C
VA 1	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
VA 2	—	—	—	—	—	—
VA 3	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não
VA 4	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
VA 5	Sim	Não	Não	—	—	—
VA 6	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
VI 1	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
VI 2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
VI 3	Sim	Não	Não	—	—	—
DI 1	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
DI 2	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
DI 3	—	—	—	—	—	—
DI 4	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
DI 5	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não

Os resultados expressados por — na tabela 6 representa os micro-organismos que não tiveram crescimento a temperatura 37°C e 7°C.

5 CONCLUSÃO

O leite cru refrigerado, captado por laticínios da região de Piumhi MG., apresentaram-se fora dos padrões exigidos pela legislação vigente, estipulada na Instrução Normativa nº7 (BRASIL, 2017), tendo alta contagem de micro-organismos mesófilos. Já em relação às características psicrotróficas, cerca de metade cresceu a 7°C, o que caracteriza esta população isolada como potencial psicrotrófica. Falhas na obtenção e no armazenamento do leite cru, podem afetar significativamente a qualidade do leite, com a seleção de micro-organismos psicrotróficos, ou mesmo micro-organismos mesófilos, que possuam capacidade proteolítica ou lipolítica, o que pode acarretar em diminuição do rendimento e da qualidade dos derivados lácteos provenientes deste leite cru.

REFERÊNCIAS

- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; Magalhães, M. M. D. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, 2008.
- ARAUJO, A. P.; OLIVEIRA, V. J.; SIQUEIRA, J. V. M.; MOUSQUER, C. J.; FREIRIA, L. B.; SILVA, M. R.; SOUZA SANTOS, C. M. Qualidade do leite na bovinocultura leiteira. **PUBVET**, v. 7, p. 2189-2326, 2013.
- BARBOSA, H. P.; DE LIMA, C. U. G. B.; SANTANA, A. M. F.; LINS, A. A.; POLIZELLI, M.; MARTINS, P. S. Caracterização Físico-Química De Amostras De Leite In Natura Comercializados no Estado Da Paraíba. **Revista Ciências Saúde Nova Esperança**, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite. Instrução Normativa nº 51, **Diário Oficial da União** 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite. Instrução Normativa nº 7 de 06 de junho de 2017, **Diário Oficial da União** 2017.
- BRITO, J. R.F.; DIAS, J. C. **A qualidade do leite**. 1998. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Gado de Leite. Disponível em:< <http://www.cnpqi.embrapa.br/sistemaproducao/>> Acesso em: 26 mai 2018.
- CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Viçosa.43f. 2006.
- CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. John Wiley e Sons, Hoboken, NJ, USA, p. 39-90, 2005.
- FIGUEIREDO, N. C. **Leite de cabra: diagnóstico de qualidade na macrorregião da Zona da Mata Mineira e estudo da degradação do leite armazenado por sete dias em condições laboratoriais**, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 47 p.: il., 2017.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, n. 1, p. 139-177, 1986.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Estatística de Produção Pecuária. Brasil**, 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/10/rebanho-bovino-brasileiro-cresce-e-chega-a-215-2-milhoes-de-cabecas-de-gado>>. Acesso em: 02 mai. 2018.

MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. Novas Tecnologias na Avaliação da Qualidade do Leite, **Avanços em produção e manejo de bovinos leiteiros**. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MOREIRA, G. I. P. **Caracterização de bactérias Gram positivas psicrotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, UFLA. Lavras, 104p. 2010

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Sul-Leite: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 2, p. 206-217, 2002.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NUNES, K. B. **Caracterização bioquímica de bactérias psicrotróficas e produção de enzimas termorresistentes em leite cru**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 64p. 2017

OLIVEIRA, C. L. P.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas¹. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos vol. 2: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

PEREIRA, F. E. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos em leite cru refrigerado e leite UHT no estado de Goiás e desenvolvimento de filme ativo antimicrobiano para inibição de *Bacillus sporothermodurans***. Dissertação (mestrado)-Universidade federal de Goiás. 2010.

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Bactérias Psicrotróficas Proteolíticas e Potencial Deteriorador a Temperaturas de Refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 110-117, 2004.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.

ROCHA, V. Apostila de Tecnologia de Leites e Derivados. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. 2006. Disponível em: <http://agata.ucg.br/formularios/ucg/docentes/maf/patricia/pdf/Apostila_Aula_Pr%C3%A1tica.pdf>. Acesso em: 16 mai. 2018.

SANTOS, P. A. D.; SILVA, M. A. P. D.; ANASTÁCIO, P. I. B.; JÚNIOR, S.; SILVA, J. W. D.; NICOLAU, E. S. Avaliação do tempo de armazenamento sobre parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instantânea de Laticínio “Cândido Tostes”**. p 35-41, 2009.

SILVA, R. A.; FILHO, S. F.; OLIVEIRA, A. V. B.; ARAÚJO, A. S. SILVA, F. O.; PEREIRA, E. M. Caracterização do sistema de produção de leite do município de Paulista-PB. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 6, n. 2, p. 31-46, 2010.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

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

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, 2008

TONDO, E. C.; LAKUS, F. R.; OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 146-150, 2003.

VALERIANO, C. **Identificação e Caracterização de bactérias psicotróficas Gram-negativas isoladas de tanques de refrigeração por expansão**. Lavras: UFLA, p41. 2007.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M. P.; MELLO, F. C. B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 4, 2014.