

BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS E PROTEOLÍTICAS DO LEITE CRU REFRIGERADO GRANELIZADO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CLAE.

SANTOS, Priscila Alonso¹; **NICOLAU, Edmar Soares**²

Palavras- chave: bactéria psicotrófica, proteólise, CLAE, leite cru.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

No Brasil, o início da implementação de estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se na segunda metade da década de 90, sendo regulamentada em 2002 por meio da Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002 a, b). A indústria mudou o perfil da coleta de leite, adotando a granelização, e, ainda que de uma forma tímida, tem estimulado a adoção do pagamento pela qualidade, com critérios baseados na qualidade (resfriamento, análise bacteriana e dos componentes) e volume da produção (COSTA & FILHO, 2005). A melhoria da qualidade do leite cru tem sido tema da maior relevância, refletindo a mudança de paradigma que experimenta o agronegócio do leite no Brasil. As perspectivas de avanço tecnológico são permeadas pelo envolvimento de todos os setores da cadeia, de forma colaborativa e associativa, com legítimas representações técnica, política e institucional (SILVA & NEVES, 2001). A própria indústria de laticínios tem interesse nas medidas de avaliação da matéria-prima, para implementar o pagamento por qualidade de leite aos produtores e expandir a área de controle sanitário dos rebanhos (RIOS, 2001). A mudança de enfoque iniciada com as medidas de estímulo ao resfriamento e granelização está se complementando com a adoção de controle baseado em análise laboratorial de amostras de leite, para se obter resultados de composição físico-química e contagem de células somáticas, além das técnicas convencionais de plataforma (COSTA & FILHO, 2005). Procedimentos de estocagem do leite cru na fonte de produção, sob refrigeração, possui como vantagens a redução dos custos operacionais de produção e a redução da perda da matéria-prima. Entretanto, se considerar que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, por períodos prolongados, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade de bactérias psicotróficas. Portanto, se o leite cru é submetido a períodos de estocagem prolongados sob refrigeração, o controle de psicotróficos na matéria-prima pode ser mais importante do que o realizado após o processamento. Os procedimentos inadequados de higiene na cadeia produtiva do leite e a microbiota contaminante do ambiente são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por microrganismos psicotróficos deterioradores e, ou, patogênicos. No Brasil, não existe uma regulamentação específica sobre a qualidade microbiológica do leite cru para a fabricação de produtos lácteos específicos. Entretanto, com o conhecimento da qualidade do leite cru, pode-se prever a qualidade de produtos lácteos subsequentemente manufaturados, incluindo o leite UHT. O objetivo deste trabalho será investigar o efeito de fatores determinados com relação ao leite cru, como a presença de bactérias psicotróficas proteolíticas e a produção de soro, através da composição da microbiota contaminante no leite cru e sua atividade proteolítica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Amostragem.

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com uma indústria de laticínio situada no estado de Goiás, submetida ao controle higiênico-sanitário permanente, através do Serviço de Inspeção Federal (SIF). As análises laboratoriais foram realizadas no Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foram colhidas 36 amostras de (500 mL) de leite cru refrigerado em tanques de expansão nas propriedades rurais do estado de Goiás, estocados por, aproximadamente, 24, 48, 72, 96, 120 e 216 horas em tanques de refrigeração individuais e coletivos, foram coletadas em frascos de vidro esterilizados, aleatoriamente, em diferentes propriedades rurais durante o período de agosto a setembro de 2005. A temperatura do leite foi aferida no momento da colheita, bem como a capacidade do tanque, a produção de leite dia na propriedade, quantidade de leite existente no tanque no momento da colheita. A procedência da água usada nos procedimentos de higienização e o seu tratamento não foram investigados. Após a colheita, as amostras serão imediatamente colocadas em banho de gelo, com temperatura de aproximadamente 4°C, e transportadas ao Laboratório do Centro de Pesquisa em Alimentos – CPA/UFG para a realização da determinação da contaminação por bactérias psicotróficas e psicotróficas proteolíticas, bem como a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, análise pela CLAE, para posterior pesquisa de soro no leite.

2.2 - Contagem de microrganismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos.

Primeiramente foram preparadas as diluições das amostras pipetando-se, asépticamente, 25 mL da amostra, e transferindo para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais de até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente. Após a realização das diluições decimais, foi adicionado 1 mL das diluições em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de agar casoy adicionado de 10% de leite em pó desnatado reconstituído à 10% fundido e resfriado à temperatura em torno de 45°C. Após a solidificação do agar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 7°C por 10 dias (APHA, 1992). As colônias de bactérias proteolíticas no agar leite apresentam-se rodeadas por uma zona clara como resultado da conversão da caseína em compostos nitrogenados solúveis. Como o meio é opaco, utiliza-se um precipitante químico (ácido clorídrico 1% ou ácido acético 10%) para detectar a proteólise e para confirmar se as zonas claras que são causadas por proteólise ou pela formação de ácidos devida à fermentação de carboidratos. Após o tratamento com o precipitante químico, as colônias não podem ser usadas para outras análises.

Após a leitura dos microrganismos psicotróficos, as placas foram cobertas com solução de ácido acético a 10% por 1 minuto e retirado o excesso da solução de ácido em recipiente que possa posteriormente ser esterilizado. Efetuar a contagem de colônias que possuam um halo transparente ao seu redor e calcular o número de UFC por mL da amostra, multiplicado o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

2.3 – Contagem de *Pseudomonas . aeruginosa*

Amostras de 2,5 mL de leite cru refrigerado foi adicionado em 5 mL de Caldo Trypticaseína e soja - TSB e incubado à 35⁰C por 18-24 horas e após transferido uma quantidade de 0,1 mL da solução em placas contendo de 15 a 17 mL de Pseudomonas Cetrimide Agar (Oxoid), adicionado de 10% de glicerol e acrescido de CN suplemento seletivo, este foi distribuído nas placas e solidificado em temperatura ambiente, o inócuo de 0,1 mL de leite homogeneizado foi espalhado sobre a placa com uma alça de Drigalski e incubado a 35-37⁰ C por 48 horas e observado o crescimento de colônias.

2.4– Contagem de *Pseudomonas . fluorescens*

Amostras de 2,5 mL de leite cru refrigerado foi adicionado em 5 mL de Caldo Trypticaseína e soja - TSB e incubado à 35⁰C por 18-24 horas e após, transferido uma quantidade de 0,1 mL da solução em placas contendo de 15 a 17 mL de Pseudomonas Cetrimide Agar (Oxoid), adicionado de 10% de glicerol, este foi distribuído nas placas e solidificado em temperatura ambiente, o inócuo de 0,1 mL de leite homogeneizado foi espalhado sobre a placa com uma alça de Drigalski e incubado a 4-7⁰ C por 48 horas e observado o crescimento de colônias.

2.5 - Provas bioquímicas

Inicialmente os isolados foram caracterizados quanto à morfologia, atividade de oxidase e catalase e reação de Gram. Os isolado que se apresentaram como Gram-negativo não-fermentadores de glicose foram avaliados quanto à produção de pigmentos fluorescentes, após o crescimento, com o auxílio de uma lâmpada ultra-violeta Spectroline, Modelo CA-160, com irradiação em comprimento de onda de 365 nm. Após os isolados foram inoculados no meio TSI com o auxílio de uma agulha de platina e incubados na temperatura de 35⁰ C por 24 horas. Era feita a leitura do TSI e contraste de fase, como também acetamida e crescimento em 4⁰ e 43⁰ C para a confirmação de *Pseudomonas fluorescens*.

2.6 - Método de detecção de glicomacropéptideo em leite pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A metodologia empregada será de acordo com a descrita por BRASIL (1991). O princípio dessa técnica baseia-se na determinação da quantidade de glicomacropéptídeo (GMP) por meio do CLAE, métodos de filtração em gel, após filtrar o leite tratado com ácido tricloroacético (TCA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O projeto está em andamento, ainda não se obteve todos os resultados para uma análise estatística adequada entretanto, já foram analisadas 226 amostras.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, n. 172, p. 8 –13, 20 set. 2002 a. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro

de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, n. 172, p. 13 - 22, 20 set. 2002 b. Seção I.

COSTA, C. N.; FILHO, K, E. Identificação animal e rastreamento da produção de bovinos de corte e de leite, 2002. Disponível em: <http://www.agrosoft.org.br/ver.php?pagina=59> . Acesso em: 25 julho 2005.

RIOS, H. Consumidor: o ator principal do agronegócio do leite no Brasil . In: GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B.; CARNEIRO, A. V. O agronegócio do leite no Brasil. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 101-110.

SILVA, P. H. F.; NEVES, B. S. Avanços tecnológicos na indústria de laticínios no Brasil . In: VILELA, D.; BRESSAN, M. e CUNHA, A. S. Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento. Brasília: MCT / CNPq, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 157-164, 2001.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CPA – Centro de Pesquisa em Alimentos

1. Bolsista da UFG – CPA – Centro de Pesquisa em Alimentos, prialonso@yahoo.com.br

2. Orientador/Centro de Pesquisa em Alimentos, rena@vet.ufg.br