UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FLAVIO EVANS VILELA PEREIRA

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*

Goiânia
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FLAVIO EVANS VILELA PEREIRA

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 apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Celso José de Moura
Co-orientador: Prof. Dra. Nilda de F. F. Soares
Prof. Dr. Nélio José de Andrade

Goiânia
2010

.

FLAVIO EVANS VILELA PEREIRA

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 defendida e aprovada em ....de ..... de ....., pela Banca Examinadora constituída pelos membros:

_____

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau – EV/UFG

_____

Profa. Dra. Miriam Fontes Araújo Silveira – EAEA/UFG

_____

Prof. Dr. Celso José de Moura – EAEA/UFG
(Orientador)

.

DEDICATÓRIA

Ao meu Deus que; mesmo eu sendo infiel ele é fiel!!!

Dedico aos meus pais, Evandro e Alba e irmãos,
Flaviane e Jônatas que sempre me apoiaram
em tudo e por acreditarem em mim!!
Amo muito vocês!!

.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu DEUS, autor da vida e que me deu sabedoria e me capacitou até aqui; pois tenho certeza que, sem Ele, nada eu conseguiria e se eu confiar nEle e descansar também nEle, o MAIS Ele fará!!!
Obrigado SENHOR!!!

Aos meus amados pais, Evandro e Alba Ester, que sempre me educaram no caminho correto e sempre me apoiam em tudo que vou fazer e principalmente pelo amor que me deram; espero dar muito mais alegrias a vocês!!

Aos meus irmãos, pelo conpanheirismo, amizade e carinho em todos os momentos, até mesmo nas "brigas"!!

Ao professor, orientador e amigo Celso José de Moura, pela amizade e dicas de vida e pela sua compreensão de minhas falhas e pelas viagens que fizemos pelo Estado de Goiás, que ao meu ver foram muito produtivas e que deixaram saudades!!

Ao Sindileite, na pessoa do Dr. Alfredo Luis Correia, que possibilitou a realização da primeira etapa da pesquisa com a coleta das amostras de leite nos laticínios.

À Universidade Federal de Goiás, especialmente à Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização desse mestrado.

Às colegas de mestrado, que, apesar do pouco tempo que passamos juntos e ser a "minoria", foi muito agradável e útil, tanto para o crescimento no aspecto intelectual, quanto para o pessoal.

Às minhas estagiárias da primeira etapa da pesquisa, a saber: Gisele, Janaína, Gardênia, Lílyam, Sarah, Natália e Alessandra, já que ainda estava fazendo as disciplinas e sem elas, dificilmente realizaria as análises em tempo hábil.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo através da Rede de Cooperação Acadêmica para Fortalecimento dos Programas de Pós-graduação e à professora Maria Célia Lopes Torres, coordenadora desse projeto.

À professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e voltar à casa (UFV - Viçosa) pelo projeto da CAPES, pela co-orientação e pela aquisição de materiais para a pesquisa.

Ao professor Nélio José de Andrade pela grande disposição em me auxiliar e pela atenção e seus aconselhamentos, o que possibilitou a criação de um bom relacionamento de trabalho, além da compra de alguns materiais, possibilitando a execução do trabalho.

Aos estagiários que me acompaharam na segunda parte da pesquisa, André, Lucas e Monica, o que possibilitou a realização desta parte da pesquisa, inclusive "virando noites".

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Embalagem e Higiene Industrial e Microbiologia de Alimentos pelo convivío agradável ao longo de vários meses, tornando o trabalho menos cansativo.

A todos, que de algum modo, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nEle e o mais Ele fará.”

Salmos 37.5

Um pouco de ciência nos afaste de Deus. Muito, nos aproxima.

Louis pasteur

.

RESUMO

O leite por ser um alimento rico, constituí-se em um meio natural para o desenvolvimento de vários microrganismos, principalmente bactérias; desta forma, muito perecível. É necessário tratamento térmico o mais rápido possível, a fim de manter a qualidade. Uma nova tecnologia vem sendo utilizada na melhoria dos alimentos, denominada de embalagem ativa, como os filmes antimicrobianos, na intenção de controlar o desenvolvimento microbiano no produto. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a qualidade de leite UAT produzido no Estado de Goiás, assim como isolar e identificar microrganismos psicrotróficos de leite cru e microrganismos de leite UAT, sendo que para este direcionado para identificação de *Bacillus sporothermodurans*, bem como criação de filme antimicrobiano para inibição deste microrganismo produtor de esporos altamente resistentes. Para o isolamento de psicrotróficos em leite cru, foi utilizado PCA e incubação à 21°C por 72h. Para avaliação de qualidade do leite UAT, foi feito a pesquisa de aeróbios mesófilos em PCA com incubação à 30°C por 72h e o isolamento de microrganismos termorresistentes foi realizado em ABHI com incubação a 35°C por 48h. A identificação dos isolados foi realizada conforme metodologias clássicas de identificação bioquímica. Segundo esta identificação, os microrganismos psicrotróficos mais isolado foram *Staphylococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. com 21,5% cada, dos 70 isolados, verificando uma percentagem maior de microrganismos Gram-positivos (82,85%). Considerando os isolados de leite UHT, dos 157, apenas 31 foram identificados como sendo bastonetes Gram-positivos que submetidos a testes bioquímicos, apenas 2 corresponderam ao *B. sporothermodurans* seguindo-se os resultados conforme registrado, apesar de haver divergências quanto a alguns testes e seus resultados, necessitando de identificação mais apurada utilizando-se de biologia molecular. Quanto ao filme antimicrobiano a base polimérica utilizada foi o acetato de celulose com incorporação de nisina, a fim de inibir o desenvolvimento do *B. sporothermodurans* com o intuito de verificar a ação deste peptídeo antimicrobiano frente a este microrganismo. Os resultados obtidos indicaram ação da nisina na inibição do microrganismo estudado, no entanto, quando incorporado ao filme, não apresentou o resultado esperado, tanto em testes em meio sólido como em meio líquido, apesar de ter alterando a velocidade específica (μ) de crescimento do microrganismo na concentração mais baixa testada. Há a necessidade de realização de teste em alimentos, especialmente em leite e derivados em que foram relatados a contaminação pelo *B. sporothermodurans*.

Palavras-chave: leite cru refrigerado, qualidade do leite, *Bacillus sporothermodurans*, filme ativo, nisina.

.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS IN REFRIGERATED RAW MILK AND UHT MILK IN THE STATE OF GOIÁS AND DEVELOPMENT OF ACTIVE ANTIMICROBIAL PACKAGING TO INHIBITION OF *Bacillus sporothermodurans*.

ABSTRACT

Raw milk is a natural culture medium for the microbial growth and easy deterioration, because of that, thermal processing is needed as soon as possible. A new technology has been used to improve the food quality, active packaging, such as antimicrobial films, wich the intention to control the microbial growth in the products. The aim of this study was to evaluate the UHT milk quality produced in Goiás State, isolation and identification of *Bacillus sporothermodurans*, beside create a antimicrobial film for inhibition of this microrganism high heat resistance spore former. The isolation of psychrotrophic in raw milk was used PCA with incubation at 21 °C for 72h. To evaluate the UHT milk has been doing research on aerobic mesophilic in PCA with incubation at 30 °C for 72h and to thermoresistents microrganisms was in ABHI with incubation at 35 °C for 48h. The identification of isolates was performed according to convetional methods of biochemistry identification. From raw milk, the psychrotrophic microrganisms most isolates were *Staphylococcus* sp. and *Corynebacterium* sp., both with 21,5% from 70 isolates, verifying a higher contauge of Gram-positive microrganisms (82,85%). Considering the 157 UHT isolates, just 31 were identified as Gram-positive microrganisms through biochemical tests, only 2 correponded to *B. sporothermodurans*, although there are differences from the tests and their results between various authors, requiring more accurate identification using molecular biology. The antimicrobial film maded of cellulose acetate with addition of nisin to inhibit the development of *B. sporothermodurans*, the results indicated action of nisin in inhibition this microrganism, however, when incorporated into the film, did not show the expected results in both tests, solid and liquid medium, although the specific rate (μ) growth of the microrganism was changing iin the lowest concentration tested. There is a need to conduct testing in foods, mainly in dairy products which have been reported contamination by *B. sporothermodurans*.

Keywords: refrigerated raw milk, milk quality, *Bacillus sporothermodurans*, active films, nisin.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Produção brasileira de leite (Total e com SIF)..... 21
Figura 2 Representação da estrutura química da molécula de nisina..... 32
Figura 3 Desdobramento enzimático da uréia pela ação da urease..... 45
Figura 4 Hidrólise da esculina..... 48
Figura 5 Análise AM em leite UAT durante a vida-de-prateleira..... 59
Figura 6 Teste do halo em disco de papel-filtro sem adição de solução de nisina..... 69
Figura 7 Teste do halo de inibição do BSP em disco de papel-filtro com solução de nisina (concentrações de 0,5 e 1,0%)..... 69
Figura 8 Teste do halo de inibição do BSP em disco de papel-filtro com solução de nisina (concentração de 5,0%)..... 69
Figura 9 Teste do halo de inibição com filmes sem e com 0,5% de nisina..... 71
Figura 10 Teste do halo de inibição com filmes com 1,0 e 5,0% de nisina..... 72
Figura 11 Curva de crescimento de *B. sporothermodurans* em meio BHI, na presença de filmes com diferentes concentrações/área incorporado com nisina..... 73

.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 PIB Total e PIB Agropecuário do Brasil – 2004/2008..... 17
Quadro 2 Ranking da produção anual de leite por Estado no Brasil..... 19

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Microrganismos psicrotróficos segundo o Gênero e coloração de Gram..... 24
Tabela 2 Efeitos na qualidade de produtos lácteos devido ao desenvolvimento de psicrotróficos em leite cru antes do tratamento térmico..... 25
Tabela 3 Mercado nacional de leite fluido e parcela do leite longa vida..... 26
Tabela 4 Identificação do metabolismo de utilização da glicose por microrganismos..... 46
Tabela 5 Interpretação do resultado do teste de redução do nitrato..... 47
Tabela 6 Enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e de psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado em silos de sete indústrias no Estado de Goiás no ano de 2008..... 55
Tabela 7 Resultados das avaliações quantitativas e qualitativas de amostras de leite UAT de sete indústrias no Estado de Goiás no ano de 2008..... 57
Tabela 8 Identificação morfológica e tintorial de microrganismos isolados de leite cru refrigerado..... 61
Tabela 9 Caracterização das colônias isoladas em leite cru refrigerado produzido em Goiás no ano de 2008..... 63
Tabela 10 Identificação morfológica e tintorial de microrganismos isolados de leite UAT..... 65
Tabela 11 Dimensões do halo de inibição do crescimento do BSP em meio BHI com papel-filtro inoculado com diferentes concentrações de nisina..... 70
Tabela 12 Média das velocidades específicas de crescimento (μ) de *B. sporothermodurans* em meio BHI com os diferentes tratamentos dos filmes de acetato de celulose incorporados com nisina..... 74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 13

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 14
2.1 COMPONENTES DO LEITE..... 14
2.2 IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DO LEITE..... 15
2.3 QUALIDADE DO LEITE..... 21
2.4 MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS..... 23
2.5 LEITE UHT/UAT..... 26
2.6 EMBALAGEM ATIVA..... 28
2.6.1 Filmes Antimicrobianos..... 29
2.6.2 Bacteriocinas..... 30
2.6.3 Métodos de avaliação de ação antimicrobiana..... 32

3 OBJETIVOS..... 34
3.1 OBJETIVOS GERAIS..... 34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 34

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 35
4.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS..... 35
4.1.1 Material e Amostragem..... 35
4.1.2 Métodos..... 35
4.1.2.1 Lactofermentação..... 36
4.1.2.2 Análises microbiológicas..... 36
4.2 IDENTIFICAÇÃO..... 38
4.2.1 Microrganismos utilizados..... 38
4.2.2 Morfológica e tintorial..... 38
4.2.3 Bioquímica..... 40
4.2.3.1 Microrganismos Psicrotróficos..... 40
4.2.3.2 Microrganismos Termorresistentes..... 47
4.3 DESENVOLVIMENTO DE FILME ATIVO..... 50
4.3.1 Microrganismo de estudo..... 50
4.3.2 Preparo da solução de nisina..... 50
4.3.3 Atividade da nisina na inibição do microrganismo *B. sporothermodurans* **(BSP)**..... 50
4.3.4 Preparo de filmes de acetato de celulose..... 51

.

4.3.5 Ação antimicrobiana do filme pelo método de difusão em disco..... 51

4.3.6 Ação antimicrobiana por inibição da curva de crescimento em meio líquido..... 52

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 54

5.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS..... 54

5.1.1 Leite cru..... 54

5.1.2 Leite UAT..... 57

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS..... 61

5.2.1 Microrganismos Psicrotróficos..... 61

5.2.2 Microrganismos Termorresistentes..... 64

5.3 DESENVOLVIMENTO DE FILME ATIVO..... 68

5.3.1 Atividade da nisina na inibição do microrganismo *B. sporothermodurans* **(BSP)**..... 68

5.3.2 Seleção do filme incorporado com nisina..... 70

5.3.3 Ação antimicrobiana do filme pelo método de difusão em disco..... 71

5.3.4 Ação antimicrobiana do filme por inibição da curva de crescimento em meio líquido..... 72

6 CONCLUSÃO..... 77

7 SUGESTÕES..... 78

APÊNDICES..... 79

REFERÊNCIAS 84

.

1 INTRODUÇÃO

O leite possui papel importante na alimentação humana por ser considerado um dos alimentos mais completos, e por causa disso, constitui-se em um ótimo meio de cultura para o desenvolvimento de vários tipos de microrganismos, influenciando, desta forma, na qualidade microbiológica desta matéria-prima.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento, em que, as condições higiênico-sanitárias de obtenção e armazenamento do leite exercem grande influência na qualidade do leite, bem como de seu transporte até o seu posterior beneficiamento na indústria de laticínios.

Um dos parâmetros analisados para verificação da qualidade do leite é o seu perfil microbiológico, que pode ser caracterizado por microrganismos indicadores de higiene e patógenos.

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácteos, pois; mesmo que o tratamento térmico realizado na indústria possa destruir a quase totalidade destes microrganismos, existe um grupo; conhecidos como psicrotróficos, que podem produzir enzimas termoestáveis e que não são inativadas por processamentos térmicos, inclusive pelo processo de esterilização comercial conhecida como UHT/UAT (Ultra High Temperature/Ultra Alta Temperatura).

Além da produção de enzimas, existem alguns tipos de microrganismos que formam esporos e alguns destes também são termoestáveis e que, do mesmo modo que as enzimas resistem a tratamentos térmicos, portanto, podem estar presentes no produto final, podendo deteriorar o mesmo, diminuindo sua vida útil, caso venham a germinar.

Com o propósito do aumento do tempo de vida de prateleira dos alimentos, bem como melhoria e/ou manutenção da qualidade dos produtos alimentícios, foram desenvolvidas as embalagens ativas, que possuem várias funções, como a de substâncias capazes de inibir e/ou retardarem desenvolvimento microbiano, com isso, garantir a segurança microbiológica dos mais variados alimentos, além do aumento de sua vida útil.

.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002).

O leite é um dos principais alimentos utilizados na alimentação humana, juntamente com os seus mais variados derivados. Possui grande importância nutricional, econômica e social.

2.1 COMPONENTES DO LEITE

O leite é um alimento altamente nutritivo e completo, pois fornece quase todos os nutrientes em quantidades razoáveis e exercem vários efeitos benéficos à saúde do consumidor, dentre eles estão auxiliar no crescimento de crianças e adolescentes, formação dos ossos, dentes e músculos, regulagem do sistema nervoso, modulação do sistema imune, prevenção da osteoporose etc. (SPREER; QUEVEDO, 1996; TEEGARDEN et al., 1999)

A composição do leite varia de acordo com um grande número de fatores, dentre eles, estão a espécie, raça, genética do animal, alimentação, idade e período de lactação. No entanto, em média, o leite de vaca possui a seguinte composição: 87-88% de água; 3,0-4,0% de gordura; 4,5-4,8% de lactose; 3,2-3,5% de proteínas e 0,5-0,7% de sais minerais.

O leite possui uma baixa concentração de vitaminas, não sendo, portanto, um alimento a ser utilizado como fonte de vitaminas. As vitaminas presentes no leite são as vitaminas hidrossolúveis A, B1, B12 e em quantidades ainda menores as vitaminas lipossolúveis, representada pelas vitaminas C e D (SPREER; QUEVEDO, 1996).

Como se percebe, a água é o elemento em maior quantidade no leite, constituindo fator importante para o rápido desenvolvimento de microrganismos e de reações bioquímicas, sendo, portanto, uma matéria-prima altamente perecível.

.

A principal proteína do leite é a caseína, possuindo um alto valor biológico, sendo facilmente aproveitada pelo organismo, e desempenhando papel importante no reparo do tecido muscular (SPREER; QUEVEDO, 1996).

O açúcar do leite está sob a forma da lactose, sendo importante para a fermentação do mesmo por ser substrato de certos microrganismos que a utilizam e, assim, acidificam o leite.

A gordura do leite é uma fonte rica de energia, servindo de veículo de transporte para proteínas lipossolúveis. Encontra-se em forma de emulsão e é o elemento mais variável no leite, podendo variar de 1,5 a 7,0% (SPREER; QUEVEDO, 1996).

Quanto aos minerais, merece destaque o cálcio (Ca^{2+}) e o fósforo (P). Sabe-se que os produtos lácteos são a principal fonte de Ca^{2}+, por isso é um produto altamente recomendado para crianças de até 12 anos, pois é importante no crescimento e na formação dos ossos, dentes e músculos (HAREL et al., 1998; JACKMAN; MILLANE; MARTIN, 1997; TEEGARDEN; WEATER, 1997). Contudo, estudos relatam que, a ingestão diária de leite e de outros produtos lácteos também é indicada na fase adulta, pois, reduz a incidência de enfermidades associadas à deficiência de Ca^{2+} na terceira idade, como a osteoporose, especialmente em mulheres (TEEGARDEN et al., 1999).

2.2 IMPORTÂNCIA SÓCIO-ECONÔMICA DO LEITE

A produção leiteira nacional vem crescendo muito nestes últimos quinze anos, adquirindo bastante destaque no comércio interno e externo e ganhando posição de destaque no cenário mundial, apesar da relativa baixa produtividade do rebanho. Entretanto, o Brasil ocupa a sexta posição no cenário da produção mundial de leite, com aproximadamente 25 bilhões de litros e com perspectivas de crescer ainda mais (EMBRAPA, 2009).

O leite está entre os cinco produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado, arroz e cana-de-açúcar. Dos 101 bilhões de reais gerados pelos produtos pecuários, o leite contribuiu com mais de 19 bilhões de reais ou quase 19,5 % do Valor Bruto da Produção Pecuária (VBP), superado apenas pelo valor da produção das carnes bovina e de frango (Quadro 1). O Agronegócio do Leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e de renda para a população, em que a indústria

.

de Laticínios ocupa a 12ª posição na geração total de empregos no Brasil, apresentando grande importância social para o país (IBGE, 2009). Com a crise econômica mundial em 2008, a previsão para o VBP destes produtos é de que caia para 2009, especialmente o do leite, visto que, a diminuição da exportação de lácteos, causou aumento do excedente de produção no mercado interno e fez com que o produtor recebesse menos, aliado ao aumento do custo de produção, fazendo com que, no primeiro semestre de 2009, a produção de leite caísse (ALVIM, 2009; EMBRAPA, 2009).

No Brasil, existe grande variação em relação à quantidade e produtividade leiteira. A região Centro-Oeste, representada principalmente pelo Estado de Goiás, aumentou expressivamente sua contribuição para a produção leiteira nacional nestes últimos 16 anos. Segundo Gomes (1999), um dos fatores que contribuíram para este grande aumento na produção de leite nesta região caracteriza-se, o custo de produção significativamente menor que o das outras regiões produtoras, devido a pelo menos três fatores: 1) a produção de grãos que se concentra nesta região e, desta maneira, o transporte é mais barato; 2) o baixo custo de oportunidade da terra devido à crise da pecuária de corte; e 3) financiamentos com taxas favorecidas, promovido pelo Fundo Constitucional do Centro-Oeste (FCO).

.

Quadro 1. PIB Total e PIB Agropecuário do Brasil – 2004/2008.

Produtos	Valor Bruto da Produção (R$ milhões)					Dif. % 2007/2008
	2004	2005	2006	2007	2008	
Agropecuário	188.211	168.533	180.191	212.473	263.118	23.0
Agrícola	117.889	98.570	107.615	131.693	161.626	22.7
Pecuária	70.321	69.963	72.576	80.779	101.492	25.6
Carne bovina	32.208	30.628	32.375	32.813	45.497	38.7
Soja	36.729	25.196	24.718	33.083	45.648	38.0
Cana-de-açúcar	12.525	13.402	19.252	21.351	18.080	-15.3
Frango	16.403	16.533	17.174	21.820	23.836	9.2
Milho	13.805	10.240	11.715	19.161	28.643	49.5
Leite	**11.900**	**12.572**	**13.022**	**15.041**	**19.574**	**30.1**
Café beneficiado	8.813	9.572	11.274	9.521	13.330	40.0
Arroz	8.847	6.620	5.697	6.312	7.207	14.2
Suíno	6.392	6.802	6.334	7.260	8.532	17.5
Laranja	2.991	3.135	4.538	5.237	5.313	1.5

Fonte: IBGE (2009).

Além do baixo custo de produção, a indústria laticinista contribuiu imensamente na produção de leite no Centro-Oeste, através da assistência técnica aos produtores e a criação de demanda de leite, pois as maiores empresas de lácteos instalaram-se nesta região e a ampliação do mercado para o consumo do leite longa vida (leite UHT/UAT) também favoreceu este crescimento, por possuir uma vida de prateleira bem maior que o pasteurizado, podendo ser transportado a distantes localidades, sem deteriorar.

Especialmente, em Goiás, teve a mobilização da Federação de Agricultura de Goiás (FAEG) que contribuiu em estimular o produtor a se profissionalizar, bem como movimentar a classe produtora para conseguir negociações mais vantajosas com a indústria.

Portanto, esses fatores são fortes argumentos para a explicação da migração da produção leiteira para esta região, alterando, em pouco tempo, o perfil da produção leiteira nacional (GOMES, 1999).

Nesses aspectos, Goiás possui uma situação privilegiada, ocupando a quarta posição (já ocupou a segunda posição no período de 1999 a 2005), entre os maiores produtores de leite por estado, com uma produção, aproximadamente de 10,5% do total

.

produzido no Brasil, perdendo apenas para Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná; situando-se na frente de São Paulo, estado que já foi tradicionalmente o segundo maior produtor durante muito tempo. No entanto, com relação a esse crescimento na produção leiteira, entre 1995 e 2006, o Estado de Goiás foi o que mais cresceu, com aumento na produção de 98,36% neste período, superior ao desempenho apresentado pelos demais principais produtores: Minas Gerais (39,19%), São Paulo (-12,23%), Paraná (51,88%) e Rio Grande do Sul (38,24%) (Carvalho & Oliveira, 2006; Hott & Carvalho, 2007; IBGE, 2009).

Contudo, dados mais recentes da Embrapa (2009), revelam que o Estado de Goiás ocupa novamente a quarta posição, devido principalmente a crise econômica mundial do segundo semestre de 2008, fazendo com que a exportação de lácteos diminuísse. Com isso, houve um aumento no mercado interno de lácteos; fazendo com que tivesse diminuição do preço pago ao produtor, fazendo com que estes ficassem descapitalizados e não conseguissem comprar alimentos adequados para o rebanho, ocasionando queda na produção, além do mais, para complicar, o preço da alimentação animal e dos insumos sofreram aumentos (ALVIM, 2009; MILKPOINT, 2009). No entanto, conforme Embrapa (2009), o estado de Goiás ainda possui o melhor índice de produtividade (leite/hab.) dentre os maiores estados produtores de leite (Quadro 2).

Ainda com relação a estes parâmetros, as grandes diferenças que ocorrem na produção de leite nas regiões, ocorrem principalmente às características intrínsecas de cada região, como perfil do produtor, acesso à assistência técnica especializada, programas regionais de controle sanitário de rebanhos e políticas de pagamento e controle de qualidade realizada pelos laticínios. Todos esses fatores podem exercer influência na decisão do produtor em investir e progredir na atividade leiteira.

.

Quadro 2. Ranking da produção anual de leite por Estado no Brasil.

Posição	Estados	Produção de leite (milhões de litros)	Produtividade (Litros/vaca)	Produtividade (Litros/habitante
1	Minas Gerais	7.275	1.463	377
2	Rio Grande do Sul	2.944	2.222	278
3	Paraná	2.701	1.998	263
4	**Goiás**	**2.639**	**1.154**	**467**
5	Santa Catarina	1.866	2.321	318
6	São Paulo	1.627	1.078	41
7	Bahia	966	546	69
8	Rondônia	708	714	487
9	Pernambuco	662	1.385	78
10	Mato Grosso	644	1.140	226
11	Pará	643	637	91
12	Mato Grosso do Sul	490	974	216
13	Rio de Janeiro	463	1.129	30
14	Espírito Santo	438	1.126	131
15	Ceará	416	816	51
16	Maranhão	336	642	55
17	Sergipe	252	1.273	130
18	Alagoas	243	1.389	80
19	Rio Grande do Norte	214	849	71
20	Tocantins	214	463	172
21	Paraíba	170	798	47
22	Acre	80	544	122
23	Piauí	76	396	25
24	Distrito Federal	36	1.800	15
25	Amazonas	20	513	6
26	Amapá	6	750	10
27	Roraima	6	333	15
	Brasil	**26.134**	**1.237**	**142**

Fonte: EMBRAPA (2009).

De forma geral, a produção leiteira brasileira é caracterizada por pequenos a médios produtores, em especial em várias regiões de Goiás, com produção média diária

.

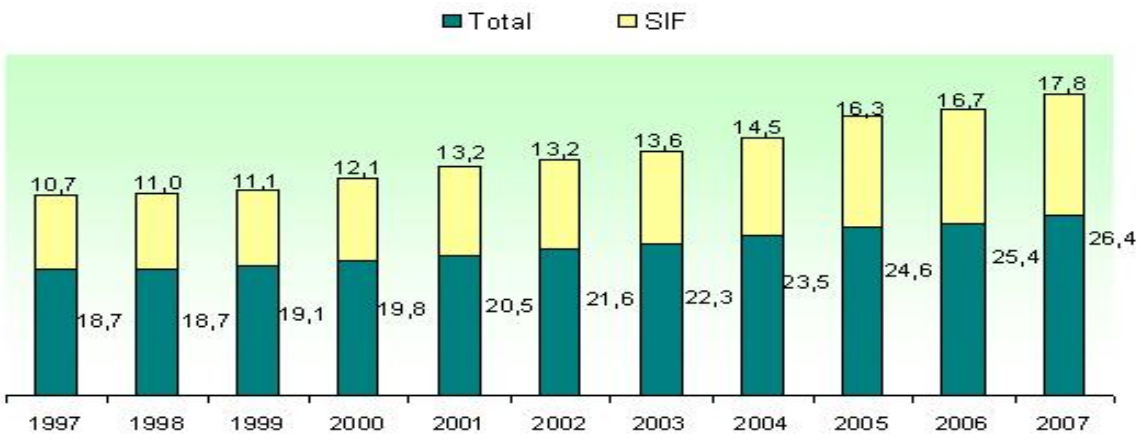
entre 50 e 100 litros e de origem familiar, constituindo a principal fonte de renda (EMBRAPA, 2009).

Em alguns casos, há um baixo investimento no setor, e conseqüentemente; gera pouca produtividade e baixa qualidade do produto, pois pequena parcela desses produtores tem acesso à tecnologia e assistência técnica adequada na produção. O reflexo disso é na qualidade do leite, sendo possível verificar com relativa freqüência que as propriedades com produção leiteira maior, quando comparadas àquelas com menor produção, produzem leite de melhor qualidade (TKAEZ et al., 2004).

Apesar desta base familiar da produção leiteira brasileira, a maior parte do leite é destinado ao beneficiamento, para fabricação de leite fluido e derivados, o excedente é destinado à exportação (IBGE, 2009). Entretanto, tanto em pequenas cidades (comunidades rurais), como em grandes centros urbanos, ainda é comum a comercialização do leite cru, denominado de comércio informal de leite, mesmo sendo proibida por lei desde 1952 (BRASIL, 1952). Estima-se que um pouco mais de 60% da produção nacional tenha inspeção federal, enquanto que os restantes 40% da produção de leite no Brasil passe por inspeções municipais ou estaduais ou são destinadas ao mercado informal (Figura 1). Considerando o período de 2003 a 2007, estima-se que, houve um aumento na inspeção federal de quase 5%.

Existem vários fatores que estimulam este comércio, dentre eles, podem ser mencionadas principalmente as flutuações na economia, que obrigam o produtor a procurar formas alternativas de obter maior lucro, e a necessidade de atender uma demanda de mercado para este produto, já que existe um importante mercado consumidor que acha que este tipo de leite e seus derivados, como o queijo minas frescal, apresentam maiores vantagens nutricionais que os produtos beneficiados, além de outros supostos benefícios, como preço, facilidade de entrega, pagamento e por fatores emocionais (BELOTI et al., 1999; QUINTANA; CARNEIRO, 2006). Conforme Enticott (2003), a preferência (por parte dos consumidores) por alimentos crus, como o leite, deve-se à atual procura por alimentos “naturais”, “tradicionais” e da região, desconsiderando os conhecidos conceitos de segurança alimentar.

.



Fonte: EMBRAPA (2009)

Figura 1. Produção brasileira de leite (Total e com SIF).

2.3 QUALIDADE DO LEITE

Com a modernização da sociedade e com o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento de diferentes alimentos, elaboração de novos produtos alimentícios e com a maior exigência por parte dos consumidores, a qualidade da matéria-prima coletada no campo, é algo amplamente discutido por profissionais e técnicos em todo o mundo.

Com o leite não é diferente, e muitos estudos foram e continuam sendo feitos, a fim de avaliar a qualidade desta matéria-prima, com a intenção de fornecer melhorias para os variados produtos produzidos a partir do leite cru ou em melhorar a eficiência na produção destes produtos (BARBANO, 1992; BARBANO; MA; SANTOS, 2006; BOOR, 2001; KLEI et al., 1998; MA et al., 2000; MUNRO et al., 1984; SANTOS; MA; BARBANO, 2003;).

Uma das maneiras em se avaliar a qualidade do leite cru e de derivados é através da pesquisa de microrganismos indicadores de higiene presentes nestes produtos, seja nas etapas de produção, influenciando no rendimento para a produção dos demais derivados, no processamento que ocorre na indústria, como controle de qualidade da matéria-prima e dos derivados, ou no comércio, determinando a qualidade microbiológica dos mesmos, bem como a determinação de alimentos seguros destes produtos, quando se utiliza da pesquisa de microrganismos patogênicos (BONFOH et

.

al., 2003; BOOR, 2001; BOOR et al., 1998; CHAMBERS, 2002; CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004; COTTON; WHITE, 1992; LUES; VENTER; WESTHUIZEN, 2003;).

Vários estudos, realizados no Brasil e em diversas regiões, confirmam a baixa qualidade microbiológica do leite cru produzido, evidenciado pelo elevado número de microrganismos indicadores, especialmente os aeróbios mesófilos, sugerindo condições inadequadas na produção leiteira (BELMONTE; LAGO, 2004; BELOTI et al., 1999; BUENO et al., 2002; FRANCO et al., 2000; LOURENÇO; SILVA, 2000; MOURA et al., 1999; POIATTI et al., 1999; PONSANO et al., 2004; VIANA et al., 2002). Esta insatisfatória qualidade do leite produzido no Brasil é um problema crônico, e que envolve os mais diversos fatores de ordem social, econômica, cultural e até climática e que apesar de ter um importante papel na política nacional, ainda é necessário muito investimento neste setor, a fim de modernizá-lo e desta forma, se destacar ainda mais no cenário mundial (GUIMARÃES, 2002).

Essa baixa qualidade microbiológica do leite cru pode sugerir ainda, a presença de alguns microrganismos patogênicos que podem ser veiculados por este produto, por isso, deve-se combater o mercado informal e apenas consumir produtos beneficiados, mesmo que estes não sejam detectados por metodologias convencionais (BADINI et al., 1996; CARLOS; OSCAR; IRMA, 2001; FRANCO et al., 2003; JAYARAO; HENNING, 2001; LAMAITA et al., 2005).

Com o intuito de alterar esse cenário nacional, marcado pela baixa qualidade do leite e visando a modernização do setor leiteiro nacional, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), iniciou uma série de discussões em meados da década de 90 através do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), culminando com a publicação da Instrução Normativa n° 51 (IN 51) em 2002.

A IN 51 é um conjunto de regulamentos técnicos que determina novas normas na produção, identidade e qualidade dos diferentes tipos de leite produzidos no Brasil, regulamentando a coleta e o transporte a granel do leite cru, bem como a sua conservação sob refrigeração adequada (BRASIL, 2002; GUIMARÃES, 2002).

Considerando algumas das inovações da IN 51, destaca-se o armazenamento do leite cru sob refrigeração na fazenda até a sua coleta e transporte, que é realizada por caminhões que possuem tanques isotérmicos, que mantêm a temperatura do leite, até a sua chegada na indústria. Outra inovação foi com relação à qualidade microbiológica do leite cru, o qual se dividiu as diferentes regiões do Brasil, com base em condições

.

técnico-econômicas, e diferentes prazos para o cumprimento desta norma por parte dos produtores.

Com essas modificações que começaram a partir de Janeiro de 2006 para algumas regiões, alguns técnicos e profissionais, relatam a melhoria aparente da qualidade do leite, mas ressaltam que ainda há muito por se fazer, principalmente em nível de exportação de produtos lácteos para o mercado internacional, pois; a grande parte do mercado é muito exigente em termos de qualidade dos produtos (MILKPOINT, 2008).

2.4 MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

Apesar da adoção da refrigeração na fazenda reduzir os custos operacionais de produção, incluindo a deterioração do leite por atividade acidificante de bactérias mesofílicas, problemas tecnológicos podem estar associados, principalmente; à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrotróficas. Estas enzimas são termorresistentes, mantendo sua atividade após tratamentos térmicos e até mesmo após o tratamento UHT, e estão relacionadas às perdas de qualidade e rendimento na produção de derivados lácteos, como queijos, e à redução da vida de prateleira do leite UHT e de outros produtos lácteos (ARCURI, 2003; CHAMPAGNE et al., 1994; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; COUSIN, 1982; FOX, 1981; GRIFFITHS; PHILIPS; MUIR, 1987; GRIFFITHS et al., 1988; SANTOS; CARVALHO; ABREU, 1999; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Diversas reações bioquímicas podem ser detectadas em leites estocados sob refrigeração, por longos períodos de tempo, devido à ação destes microrganismos psicrotróficos sobre alguns componentes do leite. Entre elas, pode-se citar: reações de fermentação, com liberação de ácidos e gases, decomposição da uréia, produção de pigmentos de diversas cores, além da proteólise e lipólise sobre a proteína e gordura, respectivamente, do leite (ARCURI, 2003; PINTO et al., 2006; COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Os microrganismos psicrotróficos encontrados no leite e em produtos lácteos incluem várias espécies de bactérias e que não constituem um grupo taxonômico específico, algumas até fazem parte de grupos que realizam fermentação desejável em alguns derivados, como é o caso de algumas bactérias ácido-láticas (BAL's). As

.

principais bactérias representantes deste grupo são: *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., e *Lactobacillus* spp, entre outras.

A Tabela 1 mostra alguns, dos principais microrganismos psicrotróficos, conforme classificação de Gram (ARCURI, 2003; PINTO et al., 2006; GARCÍA-ARMESTO SUTHERLAND, 1997; MATTA; PUNJ, 1996; RYSER, 1999; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Destes microrganismos, as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. têm sido isoladas com maior freqüência do leite e de produtos lácteos refrigerados, pois apresentam melhor capacidade de desenvolvimento sob temperaturas de refrigeração, embora não representem mais do que 10% da microbiota do leite cru recém-ordenhado (COUSIN, 1982; ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000; SMILTWELL; KAILASAPATHY, 1995; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; WALKER, 1988).

A contaminação dos produtos lácteos por microrganismos, inclusive pelos psicrotróficos, pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, procedimentos higiênico-sanitários insatisfatórios e controle de mastite ineficiente. Portanto, para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade, procedimentos de higienização adequados, devem ser empregados ao longo de toda a cadeia produtiva do leite, bem como utilização de água de boa qualidade e manejo sanitário eficiente (CHAMBERS, 2002; ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000a; JAY, 2005; MURPHY; BOOR, 2000).

Tabela 1. Microrganismos psicrotróficos segundo Gênero e coloração de Gram.

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
Arthrobacter, Bacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Clostridium, Corynebacterium, Micrococcus, Streptococcus.	*Achromobacter, Acitenobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Campylobacter, Chromobacterium, Citrobacter, Enterobacter, Flavobacterium, Hafnia, Klebsiella, Moraxella, Proteus, Pseudomonas, Serratia, Xanthomonas, Yersinia*

Fonte: Adaptado de Arcuri (2003).

.

Os principais efeitos dos microrganismos psicrotróficos em leite e derivados estão relatados na Tabela 2, segundo sua contagem em leite cru utilizado para produção dos determinados derivados.

Tabela 2. Efeitos na qualidade de produtos lácteos devido ao desenvolvimento de psicrotróficos em leite cru antes do tratamento térmico.

Produto	Psicrotróficos em leite cru (log_{10} UFC/mL)	Efeitos na qualidade
Leite UHT	5,9	Gelatinização após 20 semanas
	6,9-7,2	Gelatinização depois de 2-10 semanas; desenvolvimento gradual de perda do sabor; apresentando um sabor amargo.
Leite em pó, leite desidratado	6,3-7	Estabilidade ao calor reduzida; capacidade aumentada de fazer espuma quando reconstituído
Leite pasteurizado	5,5	Sabor inferior, se comparado com outros leites pasteurizados produzidos com leite cru de boa qualidade
	7-8	Menor tempo de prateleira; aumento de sabor e odor desagradável
Queijos duros	6,5-7,5	Rancidez
	7,5-8,3	Predominância de rancidez e gosto de sabão; rendimento reduzido para fabricação
Queijo cottage	5-7,8	Correlação significativa entre contagens de psicrotróficos no leite cru e gosto amargo
Manteiga	Não determinado	Rápido desenvolvimento de rancidez em manteigas fabricado com leite cru refrigerado e estocado que em leite cru fresco; lípase de *Pseudomonas* é ativada em manteiga congelada
Iogurte	7,6-7,8	Sabor amargo, dependendo da microflora específica

Fonte: Sørhaug; Stepaniak (1997).

.

2.5 LEITE UHT/UAT

Define-se leite UHT ou UAT (Ultra High Temperature ou Ultra-Alta Temperatura) ou ainda como Longa Vida como um produto homogeneizado que foi submetido por tratamento térmico intenso e de fluxo contínuo, a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, durante um curto espaço de tempo, de 2 a 4 segundos, e imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado, sob condições assépticas, em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1996b).

O leite UHT, no segmento de lácteos, ganhou uma grande importância econômica nesses últimos anos, tornando-se um produto de destaque e de grande comercialização e consumo, determinados pelos mais diversos fatores, chegando a representar mais que 75% do total de leite fluido comercializado no Brasil (Tabela 3, MEIRELES, 2000).

Tabela 3. Mercado nacional de leite fluido e parcela do leite longa vida (milhão de litros).

Ano	Total Leite Fluido	Leite Longa Vida	Market Share %
1992	3.693	355	9,6%
1993	3.162	456	14,4%
1994	3.615	730	20,2%
1995	4.200	1.050	25,0%
1996	4.535	1.700	37,5%
1997	4.720	2.450	51,9%
1998	5.080	3.100	61,0%
1999	5.125	3.425	66,8%
2000	5.230	3.600	68,8%
2001	5.390	3.950	73,3%
2002	5.700	4.220	74,0%
2003	5.767	4.227	73,3%
2004	5.993	4.403	73,5%
2005	6.352	4.802	75,6%
2006	6.660	5.050	75,8%

Fonte: ABLV (2008)

.

Vários são os fatores que levaram a esse grande aumento na produção e consumo deste tipo de leite. Para o setor industrial, proporcionou a economia de frio e de seus equipamentos, a simplificação do sistema de distribuição e a possibilidade da comercialização de seus produtos a longas distâncias, devido ao aumento da vida de prateleira deste produto (média de cinco meses), visto que, antes; pelo Brasil ser um país tropical e de grande extensão territorial, impossibilitava a comercialização de alimentos perecíveis a longas distâncias, como ocorria com o leite pasteurizado, mais conhecido como leite de "saquinho", além de se instalarem várias novas indústrias de laticínios no país e crescimento do *marketing* de indústrias de equipamentos sobre os laticínios e destes sobre o consumidor, que ocorreu após a abertura econômica do país, com a redução/eliminação das taxas alfandegárias a partir da formação do MERCOSUL no início da década de 90 (GOMES, 1999; PRATA, 1997). Considerando o lado do consumidor, cita-se a praticidade do leite longa vida quanto à facilidade da compra em grandes intervalos de tempo, facilidade na estocagem deste produto, que pode ser a temperatura ambiente e com isso, tem–se a preferência pela maioria dos consumidores (SANTOS; CARVALHO; ABREU, 1999).

Estudos sobre a qualidade microbiológica do leite UAT sugerem que ele pode ser considerado virtualmente estéril, por destruir todas as células bacterianas vegetativas, devendo estar em conformidade com o padrão estabelecido por legislação. No entanto; segundo Iturrino et al. (1996), apenas o processo industrial não poderia esterilizar o leite, uma vez que a presença de esporos altamente resistentes ao calor está diretamente relacionada com as precárias condições de obtenção do leite *in natura*; sendo amplamente relatado a sobrevivência de esporos que podem germinar e se desenvolverem em leite estocado, além da presença de enzimas termoestáveis (BRASIL, 1996b; COELHO et al., 2001; ROSSI-JÚNIOR et al., 2006; REZENDE-LAGO; ROSSI-JÚNIOR; AMARAL; 2000; VIDAL-MARTINS; ROSSI-JÚNIOR; REZENDE-LAGO; 2005). Logo, as condições higiênico-sanitárias adotadas durante a obtenção e transporte da matéria-prima são fatores de fundamental importância para a qualidade do leite UAT (PRATA, 1997).

Os microrganismos esporulados isolados com maior freqüência no leite cru pertencem ao gênero *Bacillus*. Este gênero é representado por um grande número de espécies, aproximadamente cinqüenta. As bactérias pertencentes a este gênero são caracterizadas por uma intensa atividade metabólica, pois produzem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos, sendo comumente denominados também de

.

psicrotróficos termodúricos. Devido a esta característica, a identificação desses microrganismos é bastante complicada, não havendo um consenso geral sobre a melhor forma de realizá-la. A presença destes microrganismos no leite UHT também tem sido atribuída a falhas no sistema de envase das embalagens e à má higienização do equipamento de esterilização, que podem servir como fontes de contaminação (CRIELLY; LOGAN; ANDERTON, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 2006; ITURRINO; NADER FILHO; DIMENSTEIN, 1996; REZENDE; ROSSI Jr.; AMARAL, 2000; VIDAL-MARTINS; ROSSI-JÚNIOR; REZENDE-LAGO, 2005; WESTHOFF; DOUGHERTY, 1981; ZACARCHENCO et al., 2000).

O *B. sporothermodurans*, microrganismo relatado recentemente (metade da década de 1990), parece resistir às condições de tempo e temperatura empregadas atualmente no sistema UHT de processamento térmico, fato que desperta preocupação pela possibilidade de prejuízos com a condenação de lotes do produto, mesmo que, atualmente, não foi descoberto que esse tipo de *Bacillus* cause alguma enfermidade ou alguma deterioração no produto, apesar de outras espécies do gênero serem responsáveis principalmente pela deterioração. No entanto, há uma escassez de dados técnico-científicos com relação a esse microrganismo, inclusive na literatura internacional, principalmente com relação ao seu comportamento em alimentos, características fisiológicas e bioquímicas, mecanismos de deterioração, resistência térmica e técnicas de isolamento, sendo necessário mais estudo (BUSATTA; VALDRUGA; CANSIAN, 2005; PETTERSSON et al., 1996; ZACARCHENCO et al., 2000)

2.6 EMBALAGEM ATIVA

A manutenção da qualidade dos alimentos é algo que sempre desperta interesse e a embalagem destes, assim como a escolha destas embalagens, é muito importante para isto, aliado a aplicação de boas práticas higiênico-sanitárias das matérias-primas manipuladas em etapas anteriores ao processamento dos mais variados produtos alimentícios.

O uso de embalagens que interagem diretamente com o alimento, mantendo por um tempo maior ou ainda ampliando parâmetros desejáveis; a fim de causar melhoria da qualidade do produto, tem crescido de forma acentuada na última década. Tais

.

embalagens são denominadas por embalagens ativas e vários são os exemplos como, filmes antioxidantes, sachês absorvedores de oxigênio, de etileno ou de umidade e os filmes antimicrobianos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

2.6.1 Filmes Antimicrobianos

A partir das últimas décadas, o setor de embalagens ativas apresentou grandes avanços, com a incorporação de substâncias antimicrobianas em superfícies de embalagens, utensílios de preparo de alimentos, materiais higiênicos, dentre outros. A ampliação do consumo de alimentos industrializados pela sociedade moderna traz a evidência de diversas enfermidades veiculadas pelos alimentos. Nos Estados Unidos, as enfermidades veiculadas pelos produtos alimentícios geram milhões de enfermos e milhares de mortes, sendo que; a maioria não chega nem a ser diagnosticada ou mesmo notificada (ANDERSON et al., 2004; CDC, 2009; FRENZEN, 2004; JONES; GERBER, 2001). Ampliando estes dados para o resto do mundo, estima-se que, aproximadamente um terço da população de países desenvolvidos é afetada anualmente por doenças veiculadas por alimentos, acreditando-se ainda que este problema seja maior em países em desenvolvimento (JAY, 2005; SCHLUNDT, 2002). No Brasil, não existem dados oficiais que revelem a situação real das toxinfecções alimentares, apesar de haver diversas pesquisas que tentem levantar dados no país sobre diversos patógenos que acometem alimentos (FRANCO et al., 2003; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2000; MENDES et al., 1999).

A fim de combater os mais diversos tipos de microrganismos patogênicos e de outros deteriorantes, a incorporação de substâncias antimicrobianas tem por finalidade de ocasionar a liberação gradativa destas substâncias, sobre a superfície do alimento, reduzindo ou até mesmo inibindo o crescimento destes microrganismos nos alimentos, melhorando o alimento quanto os aspectos de segurança microbiológica, além de aumentar o tempo de vida-de-prateleira, através de sua ação em microrganismos deterioradores (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; LIMJAROEN et al., 2003; PADGETT; HAN; DAWSON, 1998).

Várias substâncias antimicrobianas têm sido utilizadas com o propósito de reduzir, inibir ou retardar o desenvolvimento microbiano; tais como: ácido sórbico, ácido propiônico, ácido benzóico, ácido cítrico, sorbato de potássio, benzoato de sódio, lactato de sódio, quitosana, triclosan e bacteriocinas, como a nisina; com a intenção de manter a qualidade do alimento por um período de tempo maior, prolongando a vida-de-

.

prateleira (ENDO et al., 2008; MELO et al., 2002; SEBTI; COMA, 2002; SILVEIRA, 2005; SOARES et al., 2002; VILLADIEGO, 2004).

2.6.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ou pequenas proteínas que inibem, seja por ação bacteriostática, seja por ação bactericida; produzidas a partir de bactérias ácido-láticas (BAL). Essas bacteriocinas despertam grande interesse na fermentação industrial de alimentos, pois são considerados bioconservantes (ou biopreservantes), com capacidade de inibir o desenvolvimento de vários microrganismos, sejam eles patogênicos ou deteriorantes, em vários tipos de alimentos, na qual, sua efetividade é freqüentemente relacionada por fatores ambientais, tais como pH, temperatura, composição, estrutura e microbiota do alimento, ressaltando que, os alimentos são complexos ecossistemas, o qual ocorrem inúmeras interações com os microrganismos em que, o balanço e a multiplicação microbiana e a ação benéfica ou maléfica sobre eles, possuem grandes variáveis. Dentre alguns microrganismos destacam-se *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, etc (BREDHOLT et al., 2001; DE MARTINIS et al., 2001; FIORENTINI et al., 2001; GUEDES NETO et al., 2005; MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005; SOUZA; SILVA; SOUZA, 2005).

Desta forma, por causa desta ação antimicrobiana das bacteriocinas, há um grande potencial de utilização destas substâncias na aplicação na indústria alimentícia, visando a redução de preservantes químicos, assim como a intensidade de certos tratamentos térmicos, resultando em alimentos naturalmente preservados e melhores sensorialmente, além de preservar suas propriedades nutricionais. Esta propriedade resulta em alternativa na satisfação de diversos consumidores que, demandam por alimentos mais seguros microbiologicamente e mais “frescos”, ou seja, que apresente, no momento do consumo, sabor e odor o mais próximo do natural possível. A associação da bacteriocinas entre si ou então usadas combinadas com outros agentes antimicrobianos, bem como formas de tratamentos físicos além do calor, destacando-se processos de tratamento em alta pressão e campos de pulsos elétricos; tem mostrado maior eficiência na preservação dos alimentos, fornecendo barreira adicional contra os microrganismos, inclusive de esporos (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003; GÁLVEZ et al., 2007).

.

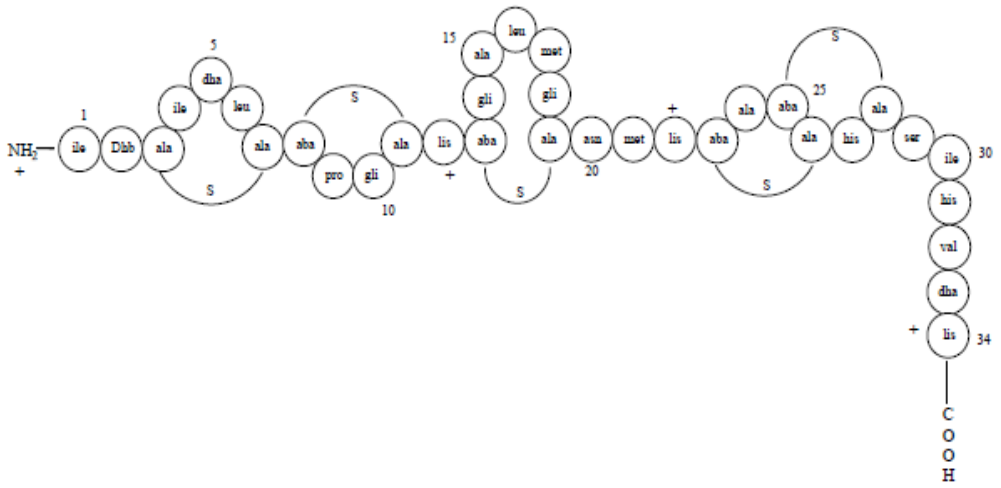
O produto da fermentação ocasionada pela ação das BAL's inclui diversas bacteriocinas, tais como as lactacinas, pediocinas, diolococinas, propiocinas, carnocinas e as mais estudadas, as nisinas. Dentre essas substâncias, a nisina é a única bacteriocina autorizada a ser usada como aditivo, em mais de 50 países, inclusive no Brasil, o qual, já em 1988, o FDA concedeu-lhe o "status" de GRAS ("Generally Recognized As Safe") com a função de atuar como conservante de diferentes alimentos, especialmente em leite, queijos e outros produtos lácteos; na concentração máxima de 12,5 mg/Kg (BOWER et al., 2002; BRASIL, 1996a; DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003; HAN, 2002; WHO, 2009a).

A nisina foi descoberta na Inglaterra em 1928, isoladas de bactérias presentes em leite, e é produzida por estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Estruturalmente, é um polipeptídeo formado por 34 aminoácidos, constituindo-se em uma molécula catiônica devido a combinação de três resíduos de lisina e um ou mais resíduos de histidina, conforme pode ser visto na Figura 2 (CLEVELAND et al., 2001; McAULIFFE et al., 2001). A ação da nisina é específica contra bactérias Gram-positivas, inclusive contra esporos, mas ineficiente contra as Gram-negativas e fungos (bolores e leveduras), isto se deve porque a parede das bactérias Gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos e proteínas, os quais atuam como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo com que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Possuem ação entre várias espécies de microrganismos como *Listeria*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Micobacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, dentre outros (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2003; McAULIFFE; ROSS; HILL, 2001; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2004; PIRTTIJÄRVI et al., 2001; ZAPICO et al., 1999).

Envolvendo embalagens ativas, tais como filmes com atividade antimicrobiana, muitos trabalhos têm demonstrado sua eficácia nos mais variados tipos de alimentos, inclusive utilizando nisina, esteja ela associada ou não com outros agentes (GUERRA et al., 2005; JOERGER, 2007; MAURIELLO et al., 2005; MELO, 2003).

Porém, alguns autores evidenciaram a efetividade da nisina contra microrganismos Gram-negativos, quando associadas com outras substâncias, como o ácido lático e o EDTA, sendo este o agente quelante mais efetivo contra esse grupo de microrganismos (CLEVELAND et al., 2001; HELANDER; SANDHOLM, 2000).

.



Fonte: McAULIFFE et al., 2001.

Figura 2. Representação da estrutura química da molécula de nisina.

2.6.3 Métodos de avaliação de ação antimicrobiana

Para o desenvolvimento de embalagens que contenham ação antimicrobiana, é preciso dispor de métodos de avaliação destas embalagens, com relação à eficácia em reduzir a contagem microbiana em alimentos, ou ainda, de forma indireta, avaliar a capacidade da embalagem ativa em limitar o crescimento do microrganismo desejado.

Através de experimentos microbiológicos, pode-se avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais de embalagem, por meio da inoculação dos microrganismos alvos na superfície do alimento, em contato com o material antimicrobiano seguida de estocagem correta. A contagem dos microrganismos em intervalos pré-determinados de tempo possibilita avaliar se houve crescimento de microrganismos ou se o material foi eficiente em provocar a redução ou até mesmo em inibir o desenvolvimento do microrganismo inoculado. Conforme Brody et al. (2001), compara-se os resultados com a amostra controle, inoculada e embalada com filme sem substância antimicrobiana. Dentre os experimentos microbiológicos para avaliar a ação antimicrobiana, destaca-se o <u>método de difusão em disco</u> (halo de inibição) e <u>influência na curva de crescimento</u> em meio líquido.

O método de avaliação de antibióticos (antibiograma) originou o método de avaliação antimicrobiana pela difusão em disco, em que, um meio sólido é inoculado com o microrganismo desejado e, em seguida, é aplicado o filme antimicrobiano sobre a superfície do meio de cultura seguido de incubação na temperatura adequada ao desenvolvimento do microrganismo. Após incubação, como resultado positivo para

.

ação antimicrobiana observa-se a formação de halo de inibição do crescimento ao redor do filme, anota-se a medida em milímetros (mm) e compara-se o resultado com filmes sem adição da substância antimicrobiana Tal método destaca-se pela facilidade e pelo baixo custo em sua realização e mede a susceptibilidade do microrganismo em análise frente ao agente antimicrobiano *in vitro* (LIMJAROEN et al., 2003; SILVA et al., 2003; WHO, 2009b).

A atividade antimicrobiana de um filme também pode ser avaliada através da curva de crescimento do microrganismo em análise pode ser observada pela alteração das características da curva de crescimento em meio líquido, em comparação da curva de crescimento controle, sem ação do filme antimicrobiano. A curva de crescimento pode ser medida por duas formas: pelo método microbiológico tradicional através da contagem em placas e através da densidade ótica, obtida pela turvação do meio de crescimento, sendo efetuada em espectrofotômetro, e plotada através da conversão logarítmica da absorbância em 640 nm versus tempo de desenvolvimento; em que a atividade antimicrobiana pode ser evidenciada pelo aumento da fase *lag*, redução da taxa de crescimento (μ) na fase exponencial (*log*) e total crescimento na fase estacionária, em comparação com a embalagem convencional ou sem embalagem. (HAN, 2000; HAN; FLOROS, 1998; MELO et al., 2003; WURLITZER, 2007).

As embalagens que possuem alguma ação antimicrobiana apresentam redução na taxa de crescimento e menor população microbiana na fase estacionária, indicando maior segurança microbiológica para o alimento envolvido, e a extensão da fase lag sugere maior vida-de-prateleira para o produto (BRODY et al., 2001; COOKSEY, 2001; LIMJAROEN et al., 2003; QUINTAVALLA; VICINI, 2002).

.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Quantificar e identificar microrganismos presentes em leite cru refrigerado e em leite UHT.
- Desenvolver filme ativo para possível utilização no envase de leite UHT para aumento da sua vida-de-prateleira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado destinado à produção de leite UHT no Estado de Goiás;
- Avaliar a qualidade microbiológica de leite UHT, produzido em sete fábricas do Estado de Goiás, ao longo de sua estocagem;
- Isolar microrganismos termorresistentes em leite UHT;
- Isolar e identificar *B. sporothermodurans* em leite UHT ao longo da estocagem;
- Avaliar a atividade da nisina na inibição de *B. sporothermodurans*;
- Desenvolver filme ativo com nisina, a fim de inibir o desenvolvimento de *B. sporothermodurans* em meio de cultura, para possível utilização em leite e derivados (principalmente leite UHT).

.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

4.1.1 Material e Amostragem

As amostras de leite cru refrigerado, por tempo não maior que 72h, estocado em silo previamente determinado em cada uma das sete indústrias de laticínios do estado de Goiás que produzem leite UAT, foram coletadas em frascos previamente esterilizados e com volume aproximadamente de 100 mL. Após o processo de tratamento (UAT) e envase desse leite foram coletadas 12 embalagens cartonadas (Tetrabrik) contendo um litro de leite cada, para realização de análises microbiológicas. O período de coleta das amostras foi entre julho a setembro de 2008.

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas e transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos do Setor de Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, juntamente com as caixas de leite UAT. Uma amostra do leite envasado foi retirada para análise imediata, sendo considerado o tempo zero (T_0); as demais foram armazenadas sob as mesmas condições que o leite UAT é armazenado no mercado, ou seja, à temperatura ambiente, sobre prateleiras, distanciadas do chão e das paredes. As amostras de leite UAT foram analisadas até 150 dias (5 meses ou T_{150}) de estocagem, em intervalos de 30 dias, totalizando 42 amostras, com 6 amostras para cada empresa.

4.1.2 Métodos

Antes da realização das diluições, as amostras foram submetidas à homogeneização manual por aproximadamente 20 – 30 segundos. Uma alíquota de cada amostra de leite cru foi diluída serialmente em escala decimal, em solução de água peptonada a 0,1% até a diluição 1:100.000 (10^{-5}) e as amostras de leite UAT foram diluídas em escala seriada decimal em solução de água peptonada a 0,1% até a diluição de 1:100 (10^{-2}) (BRASIL, 2003; WHER, 2004).

.

4.1.2.1 Lactofermentação

Foi realizado o teste da Lactofermentação segundo Bramley e McKinnon (1990) a fim de caracterizar a microbiota mesofílica predominante no leite cru de cada uma das sete indústrias. Foram retiradas alíquotas de 10 mL do leite e adicionadas em tubos estéreis, em quadruplicata. Os tubos foram incubados a 37 °C por até 48h, sendo observado o coágulo formado. Os resultados foram interpretados da seguinte forma:

- **Coágulo Gelatinoso** (uniforme e gelatinoso): proveniente da fermentação lática e considerado normal para um leite de qualidade satisfatória, com predominância de bactérias ácido-láticas;
- **Coágulo Esfacelado** (esfacelado ou esponjoso, com produção de ácido e gás, com soro claro e abundante): proveniente de fermentação pseudo-láctica devido à presença de coliformes;
- **Coágulo Caseoso** (que se contrai de um lado ou em todo contorno, com soro claro ou leitoso): proveniente de fermentação proteolítica, devido à presença de microrganismos proteolíticos;
- **Coágulo Floculoso** (flocos de caseína, com bolhas gasosas): proveniente de fermentação por levedura;
- **Coágulo Líquido** (ausência de coagulação): indica impossibilidade de desenvolvimento de microrganismos, podendo ser um indicativo de presença de substâncias inibidoras.

4.1.2.2 Análises microbiológicas

Para a pesquisa de aeróbios mesófilos (AM) nos leites cru e UAT, amostras de 1 mL das diluições selecionadas foram inoculadas em placas contendo Ágar Padrão de Contagem (PCA – Plate Count Agar), para Contagem Padrão em Placas (CPP), em profundidade (ou “pour plate”) e em duplicata, com incubação a 30 °C por 72 h (WHER, 2004). O resultado final foi obtido considerando-se a diluição com 20 a 300 colônias, pela média das placas e feita correção de acordo com a diluição considerada. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL).

Para a contagem de microrganismos psicrotróficos (PSI) totais, as diluições selecionadas foram semeadas 0,1 mL por superfície (ou “spreed plate”) e em duplicata, em PCA, com incubação a 7°C por 10 dias (WHER, 2004). O resultado final foi obtido considerando-se a diluição com 20 a 300 colônias, feita correção de acordo com a diluição considerada. O resultado foi expresso em UFC/mL.

.

A pesquisa de PSI proteolíticos foi realizada em Ágar Leite (MA – Milk Agar), por inoculação em superfície da diluição selecionada em duplicata e com incubação a 22 °C por 72 h. Após o período de incubação a superfície do meio, contendo os microrganismos foram cobertas com solução de ácido acético a 10% e mantido por aproximadamente um minuto. Passado este tempo, o excesso de solução foi retirado e as colônias foram enumeradas conforme a observação ou não de halo claro. Dessas colônias características foram selecionadas de 3 – 5 colônias, para serem identificadas e caracterizadas. (BRASIL, 1993) O resultado final foi expresso em UFC/mL.

A pesquisa de microrganismos termorresistentes, para identificação de *Bacillus sporothermodurans* (BSP), foi conduzida conforme preconizada por Brasil (2003), com modificações proposta por Zacarchenco e Leitão (1999), no que diz respeito ao método de plaqueamento. Portanto, para a realização desta pesquisa, foi utilizado Ágar Infusão de Cérebro-Coração (Ágar BHI), por plaqueamento de 0,1 mL da amostra, em superfície e em duplicata, com incubação a 30 °C por 72 h. Após a incubação, colônias relatadas como típicas (pequenas, lisas e de coloração branca a bege e sem pigmento solúvel) foram enumeradas e selecionadas de 3 a 5 colônias para posterior identificação morfológica e bioquímica. Outras colônias, que diferiram das típicas, também foram selecionadas, em menor número, para posterior identificação. O resultado final foi dado em UFC/mL, considerando-se a diluição selecionada e feita à correção devida.

Para o leite UAT, a fim de, buscar correlação entre o sistema de aquecimento (direto e indireto) com a contagem microbiana, foram realizados questionários contendo informações como tipo de trocador utilizado no processamento UAT e as condições de processo, tempo e temperatura utilizados.

As colônias de microrganismos psicrotróficos e termorresistentes selecionadas foram estocadas em tubos contendo Ágar Nutriente e BHI inclinados, respectivamente; acrescidos de óleo mineral na superfície, sob refrigeração (6 ± 2 °C), para posterior recuperação/reativação, identificação e caracterização.

.

4.2 IDENTIFICAÇÃO

4.2.1 Microrganismos utilizados (culturas puras)

- *Bacillus sporothermodurans* **(**CCT 6247 DSMZ 10599**)**;
- *Escherichia coli* (ATCC11229);
- *Listeria innocua (ATCC 33090);*
- *Salmonella choleraesuis* (ATCC 6539);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442);
- *Staphylococcus aureus (ATCC 6538);*
- *Streptococcus agalactiae (ATCC 13813);*
- *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048);

4.2.2 Morfológica e tintorial

A reativação e identificação dos microrganismos isolados foram realizadas nos laboratórios de Embalagem (LABEM) e de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para a reativação dos microrganismos isolados foram utilizados, respectivamente, para o leite cru e UAT, caldos tripticato de soja (TSB) e BHI e estriados nos respectivos ágares, TSA e ABHI. Após a reativação de todas as colônias isoladas, tanto do leite cru, quanto do leite UAT, foram realizadas as provas de identificação.

- Coloração de Gram

A primeira prova foi através da coloração de Gram, a partir de uma colônia bacteriana inoculada em lâmina de vidro para microscopia, previamente higienizada e com 1 gota de solução salina estéril. Após a fixação do esfregaço em chama de bico de Bünsen, este foi corado com solução de Cristal-Violeta por um minuto, escorrendo ao final e lavando com água destilada. A seguir, cobriu-se o esfregaço com a solução de Lugol e deixando atuar por 1 minuto, escorrendo após este tempo e lavando com água destilada. Depois, foi utilizada solução descolorante (álcool absoluto ou 95%), deixando-a atuar por 10-15 segundos, escorrendo e lavando com água destilada. Por fim, a lâmina foi coberta com o contra-corante, a safranina, deixando-a atuar por 30-60

.

segundos, escorrendo e lavando com água destilada e deixando secar ao ar. Após a secagem, os esfregaços preparados foram observados ao microscópio usando objetiva de imersão (aumento de 100X); a fim de verificar a morfologia e coloração dos isolados (BRASIL, 2003). Foram utilizados como controles os microrganismos *Escherichia coli* que é um bastonete Gram-negativo e *Staphylococcus aureus* que é um cocos Gram-positivo.

- Reação de KOH 3%

Com o objetivo de confirmar a coloração de Gram, foi realizada a reação de KOH a 3% (p/v). Uma gota de KOH 3% foi colocada em uma lâmina e suspendeu-se uma ou mais colônias (conforme o tamanho da colônia), homogeneizou-se, com auxílio de uma alça de platina e foi realizada a leitura em um minuto. A presença da formação de um filamento viscoso é confirmatório para microrganismos Gram negativos, enquanto a ausência é para Gram positivos (QUINN et al., 1999). Os controles positivo e negativo foram os mesmos para coloração de Gram.

- Teste de Catalase

O teste de catalase foi realizado através da adição de uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em lâmina de microscópio. Inoculou-se uma colônia e homogeneizou-se o conteúdo. A presença de bolhas de gás dentro de poucos segundos é indicativa de reação positiva para a enzima catalase, enquanto a ausência é reação negativa (QUINN et al., 1999). Os controles positivo e negativo foram, respectivamente, *Listeria innocua* e *Streptococcus agalactiae*.

- Teste de Oxidase

O teste de oxidase foi realizado utilizando-se tiras de papel contendo o reagente p-fenilenodiamina (Laborclin). Com uma alça de platina foi feita a transferência asséptica de uma ou mais colônias para as tiras, homogeneizou-se sobre a superfície da tira e, conforme recomendação do fabricante foi feita a leitura em dois minutos. As colônias que desenvolveram uma coloração azulada a violeta são oxidase positivas. Os controles positivo e negativo foram, respectivamente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

.

4.2.3 Bioquímica

Testes bioquímicos clássicos foram realizados, a fim de identificar o gênero destes microrganismos. Vale lembrar que em todas as provas realizadas foram feitos controles negativos sem inoculação de microrganismos, a fim de comprovar a esterilidade dos meios preparados.

4.2.3.1 Microrganismos Psicrotróficos

Para os microrganismos isolados a partir do leite cru foram realizados os seguintes testes: crescimento em meio MacConkey (AMC), teste de motilidade, produção de H_2S e indol em meio SIM, ágar ferro e açúcar tríplice (TSI), ágar lisina ferro (LIA), teste do citrato, teste do vermelho de metila (VM), teste de Vogues-Proskauer (VP), teste da urease, teste de metabolismo oxidativo e/ou fermentativo da glicose (OF) e teste da redução do nitrato a nitrito.

- Crescimento em meio com ágar Mac Conkey (AMC)

Este teste foi realizado para confirmar se o microrganismo já analisado quanto à coloração, era gram-negativo e para observação se este fermentava ou não a lactose. O AMC é seletivo para bactérias gram-negativas, pois possui em sua composição sais de bile e de cristal violeta, que interferem no metabolismo de bactérias gram-positivas. Além dessa seletividade, age também como diferenciador devido a presença de lactose em sua composição, distinguindo-se as bactérias que fermentam a lactose (LAC^+) das que não fermentam (LAC^-). Este meio possui como indicador de pH o vermelho neutro, o qual em pH ácido é rosa e em pH alcalino permanece incolor (RIBEIRO; SOARES, 1998).

As culturas reativadas em TSB foram semeadas com alça de platina em AMC, e incubadas a 21 °C por 24h. A interpretação dos resultados se dá:

- Colônias que fermentam a lactose (LAC^+) – formação de colônias róseas ou vermelhas;

- Colônias que não fermentam a lactose (LAC^-) – não formam colônias róseas ou vermelhas.

Os microrganismos utilizados como controles foram *Escherichia coli*, que fermenta a lactose e *Listeria innocua*, que não fermenta a lactose e não cresce neste meio.

.

- Teste de Motilidade, Sulfito e Indol em meio SIM (Sulphite Indol Motility)

Os testes de motilidade, indol e produção de sulfito foram realizadas a partir da inoculação de uma colônia isolada por meio de uma picada com agulha de platina. O tubo inoculado foi incubado a 35 °C por 24-48h. Após a incubação, foram observadas se houve motilidade do meio através da turvação ou não, além de observar o escurecimento, que é evidência de produção de H_2S. Após essas observações, foram adicionadas 4-5 gotas do reagente de Kovacs para identificação da reação de indol (BARROW; FELTHAM, 1995).

A produção de H_2S ocorre a partir de compostos orgânicos que contem enxofre como os contidos em meios de cultura que possuem peptonas e caseínas.

Interpretação dos resultados:

- Meio turvo – motilidade positiva;

- Desenvolvimento do microrganismo apenas aonde foi realizado a inoculação – motilidade negativa;

- Produção de H_2S – meio fica escuro (positivo);

- Produção de indol – desenvolvimento de um anel de coloração vermelho escuro na superfície do tubo é resultado positivo; o não desenvolvimento desta coloração, permanecendo castanho é resultado negativo.

Os microrganismos utilizados como controles para este teste foram *E. coli*, que é indol positivo e motilidade positiva, *Enterobacter aerogenes* que é indol negativo e motilidade positiva e *Salmonella choleraesuis* que é indol e motilidade positivos e produtor de H_2S.

- Teste do Ágar Ferro e Açúcar tríplice (TSI)

Este teste foi realizado por meio da inoculação com agulha de platina por picada na base (fundo - crescimento em anaerobiose) do meio TSI e depois na rampa (parte inclinada – crescimento em aerobiose) até a extremidade final fazendo estrias do tipo em “zigue-zague”, constituindo-se em um meio diferencial. A seguir foi incubado a 35 °C/24-48h (HAJDENWURCEL, 1998).

Interpretação do resultado:

- Inclinação vermelha (alcalino) e fundo amarelo (ácido) – apenas fermentação da glicose;

.

- Inclinação e fundo amarelos – fermentação da glicose, juntamente com a lactose e/ou sacarose;

- Inclinação amarela (ácido) e fundo vermelho (alcalino) – fermentação da lactose e/ou sacarose;

- Meio escurecido – produção de H_2S;

- Produção de gás – presença de gás no meio.

Os controles utilizados foram a *Salmonella choleraesuis* com fermentação apenas da glicose e *E. coli* com fermentação de todos os açúcares (glicose, galactose e/ou sacarose) com produção de gás.

- Teste do Ágar Lisina Ferro (LIA)

A finalidade deste teste é determinar atividade da enzima lisina descarboxilase e produção de H_2S, constituindo-se também em meio diferencial também (HAJDENWURCEL, 1998).

A partir do desenvolvimento da cultura, inoculou-se a colônia com agulha de platina por picada na base e estrias na rampa e a seguir incubou-se a 35 °C/24h, com leitura dos resultados após este tempo.

A interpretação é dada da seguinte forma:

- *Salmonella* sp. – o fundo e a inclinação do meio continuam com a cor púrpura e caso haja produção de H_2S, o meio se escurece. Mesmo ocorrendo a fermentação da glicose, devido a descarboxilação da lisina, ocorre a produção de um composto alcalino, a cadaverina, que neutraliza o ácido formado, ocorrendo inalteração da coloração do meio.

- *Proteus* sp. – o meio adquire uma coloração castanha em função da reação de desaminação da lisina a ácido α-cetocarbônico. Este composto reage com os sais de ferro provocando o aparecimento da cor castanha e o fundo pode ficar amarelo devido à fermentação da glicose.

O microrganismo utilizado como controle foi a *Salmonella choleraesuis* sendo LIA positiva.

- Teste do Citrato (Citrato de Simmons)

Esta prova tem por finalidade a caracterização de microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e fundamenta-se em determinar a capacidade dos

.

microrganismos utilizarem o citrato de sódio como única fonte de carbono para seu metabolismo, resultando em alcalinidade do meio (HAJDENWURCEL, 1998).

A partir de cultura reativada e desenvolvida em TSA, inoculou-se com uma agulha de platina, uma colônia em tubo contendo o meio citrato inclinado, com picada na base e estrias na parte inclinada. Incubou-se a 35 °C por 72-96h.

A interpretação do resultado é:

- Positivo – ocorre alteração da coloração do meio de verde para azul, por causa da alcalinização do meio.

- Negativo – não ocorre alteração da cor do meio.

Os microrganismos utilizados como controle foram o *Enterobacter aerogenes* como positivo e *E. coli* como negativo.

- Teste do Vermelho de Metila (VM)

Esta prova foi utilizada para caracterizar os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, este meio contém glicose e consiste na conversão desta em ácidos (lático, acético, fórmico, succínico etc), alterando assim a coloração do meio contendo o indicador vermelho de metila. Para realização desta prova uma colônia recentemente reativada e desenvolvida em TSA foi inoculada ao meio com auxílio de uma alça de platina, com incubação a 30 °C por até cinco dias. Após o período de incubação, foram acrescidas algumas gotas (2-4) do indicador vermelho de metila e realizada a leitura do resultado (QUINN et al., 1999).

Interpretação do resultado:

- Positivo – meio altera sua coloração para vermelho.

- Negativo – meio permanece com a mesma cor, ou seja, amarelo. Ocorrendo a coloração alaranjada, deve-se continuar a incubação por até 4 dias e repetir novamente a prova.

Ressalta-se que, os microrganismos VM negativos também produzem ácidos, entretanto, em concentração menor; devido à formação de outros compostos que neutralizam estes ácidos produzidos e desta forma não provoca a viragem de cor pelo indicador.

Os microrganismos utilizados como controles foram *E. coli* como positivo e *E. aerogenes* como negativo.

.

- Teste de Vogues-Proskauer (VP)

Para este teste foram utilizados os mesmos tubos da prova anterior (VM). Após o período de incubação e a realização do teste VM, adicionou-se ao tubo aproximadamente 0,6 mL da solução A (α-naftol 5%), que age como catalisador e agente intensificador da cor e 0,2 mL da solução B (KOH 40% ou NaOH 40%) agindo como agente oxidante e depois agitar vigorosamente o tubo, a fim de, o oxigênio atmosférico entrar em contato com o meio e assim oxidar a acetoína.

Esta prova baseia-se na determinação da capacidade dos microrganismos em produzirem um composto neutro, o acetilmetilcarbinol (acetoína) a partir da fermentação da glicose. Na presença de oxigênio atmosférico e em meio alcalino (solução B), a acetoína e o 2,3 butilenoglicol são oxidados para diacetil que, combinados com um grupamento guanídico da arginina (presente na peptona) produz uma coloração vermelha proporcional à quantidade de diacetil do meio (HAJDENWURCEL, 1998).

Interpretação do resultado é:

- Positivo – ocorre coloração vermelha do meio entre 15 e 30 minutos;
- Fracamente positivo – ocorre coloração rósea;
- Negativo – inalteração na coloração ou coloração marrom-esverdeada.

Para este teste foram utilizados os mesmos microrganismos controles da prova VM, no entanto, a *E. aerogenes* foi o positivo e *E. coli* o controle negativo.

- Teste da Urease

Esta prova consiste em determinar a capacidade do microrganismo em hidrolizar a uréia, formando moléculas de amônia pela ação da enzima urease, enzima que decompõe a uréia com liberação de amônia (NH_3) e reação de decomposição segue-se abaixo. (RIBEIRO; SOARES, 1998).

A partir da cultura recém desenvolvida, inoculou-se com uma alça de platina em tubo contendo o meio, caldo uréia. Incubou-se a 35 °C/48-72h. Após este tempo, fez-se a leitura dos resultados.

.

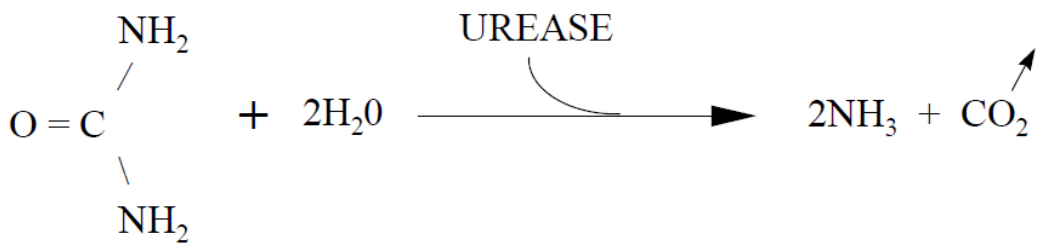


Figura 3. Desdobramento enzimático da uréia pela ação da urease.

Interpretação dos resultados:

- Positivo – o meio muda de cor para um róseo/ vermelho mais intenso;

- Negativo – o meio mantém a coloração inicial (rósea claro/pálido).

O controle utilizado foi a *Salmonella choleraesuis* como sendo negativo. *Proteus* sp. é positivo (não foi realizado).

- Teste do Metabolismo Oxidativo e/ou Fermentativo da Glicose (OF)

Este teste tem por finalidade analisar o metabolismo de utilização da glicose ou por meio da oxidação (aeróbios) ou, por fermentação (anaeróbios) ou os dois (anaeróbios facultativos). Para isso, foi utilizado o meio Hugh Leifson, utilizando dois tubos, os quais, em um, foi adicionado óleo mineral estéril (5 a 6 mm de altura) com a intenção de criar um ambiente de anaerobiose. Após a inoculação da colônia aos dois tubos, incubou-se a 30 °C por 14 dias, sendo analisados durante este período por um intervalo de três dias, pois existem microrganismos que somente produzem ácidos resultantes da utilização da glicose após vários dias de incubação (QUINN et al., 1999).

A interpretação dos resultados é feita segundo a tabela 4:

.

Tabela 4. Identificação do metabolismo de utilização da glicose por microrganismos.

Utilização da Glicose	Tubo sem óleo	Tubo com óleo
Por oxidação[a]	Amarelo	Verde
Por fermentação[b/c]	Amarelo[b] ou Verde[c]	Amarelo
Sem reação	Verde	Verde

[a] microrganismo aeróbio estrito, [b] microrganismo anaeróbio facultativo, [c] microrganismo anaeróbio estrito.

Os microrganismos utilizados como controles foram *E. coli* como fermentativa (anaeróbio facultativo) e *Pseudomonas aeruginosa* como oxidativa (aeróbio estrito).

- Teste de Redução do Nitrato (NO_3) a Nitrito (NO_2)

Este teste foi realizado utilizando-se caldo BHI adicionado de 0,3% de nitrato de potássio (KNO_3), como fonte de nitrato, conforme Pettersson et al. (1996), semeando a cultura com auxílio da alça de platina. Incubou-se a 35 ± 2 °C por até 72h. Após esse período, a capacidade do microrganismo em reduzir o nitrato a nitrito é proporcionada pela adição de dois reagentes: solução A (ácido sulfanílico 0,8%) e solução B (α-naftilamina 0,5% ou α-naftol 0,5%). No entanto, se a cultura não mudar de cor, existem duas possibilidades antes de serem negativas para esta prova. A primeira, de que o microrganismo não foi capaz de reduzir o nitrato a nitrito, não possuindo as enzimas necessárias (nitrato redutases) ou a segunda, que o microrganismo pode possuir enzimas que reduziram os nitratos a nitritos e estes por sua vez a amônia (NH_3) ou a forma azoto molecular (N_2).

Com isso, para determinação final de que se os nitratos foram reduzidos ou não a nitritos, adiciona-se uma pequena quantidade de zinco em pó ao meio incolor/amarelo claro (resultado negativo até então). O zinco irá promover redução dos nitratos a nitritos, levando ao aparecimento de uma coloração vermelha, caso estes não tenham sido reduzidos anteriormente com a adição dos dois reagentes (soluções A e B), indicando uma reação negativa. Por outro lado, se a adição de zinco não produzir uma alteração de cor, indica que os nitratos já tinham sido reduzidos a nitritos e estes a amônia ou a N_2, não alterando a coloração do meio; evidenciando uma reação positiva.

Os microrganismos utilizados como controles foram *B. sporothermodurans* como negativo e *Staphylococcus aureus* como positivo.

A interpretação do resultado encontra-se na tabela 5:

.

Tabela 5. Interpretação do resultado do teste de redução do nitrato.

Reação	Após adição das soluções A e B	Após adição do zinco em pó
Teste positivo	Vermelho	Não há necessidade de adição
Teste positivo	Incolor/amarelo claro	Incolor/amarelo claro
Teste negativo	Incolor/amarelo claro	Vermelho

4.2.3.2 Microrganismos Termorresistentes

Após a realização da coloração de Gram e KOH, catalase e oxidase foram realizadas as seguintes provas; crescimento em anaerobiose, hidrólise da esculina, fermentação da glicose, redução do nitrato e prova da urease, para a identificação bioquímica destes microrganismos, capazes de alterar produtos lácteos líquidos UAT, previamente já conhecidos como bastonetes Gram-positivos e catalase positivo e oxidase também positivo, com a intenção de identificação dos *B. sporothermodurans* (BSP), conforme Brasil (2003).

- Crescimento em Anaerobiose

O crescimento em anaerobiose foi feito pela inoculação da cultura selecionada em tubos com ABHI inclinado, incubando-se em jarra e criador de ambiente de anaerobiose a 35 ± 2 °C por até 72h, após a incubação foi verificado se houve crescimento. O BSP não cresce em anaerobiose.

- Hidrólise da Esculina

A esculina é um açúcar complexo e fluorescente sob luz ultra-violeta (UV). Microrganismos que possuem um sistema enzimático capaz de hidrolisá-la provocam a formação de β-D-glicose e esculetina que, ao reagir com íons ferro, dá origem a um complexo de coloração escura, não fluorescente (Figura 4).

.

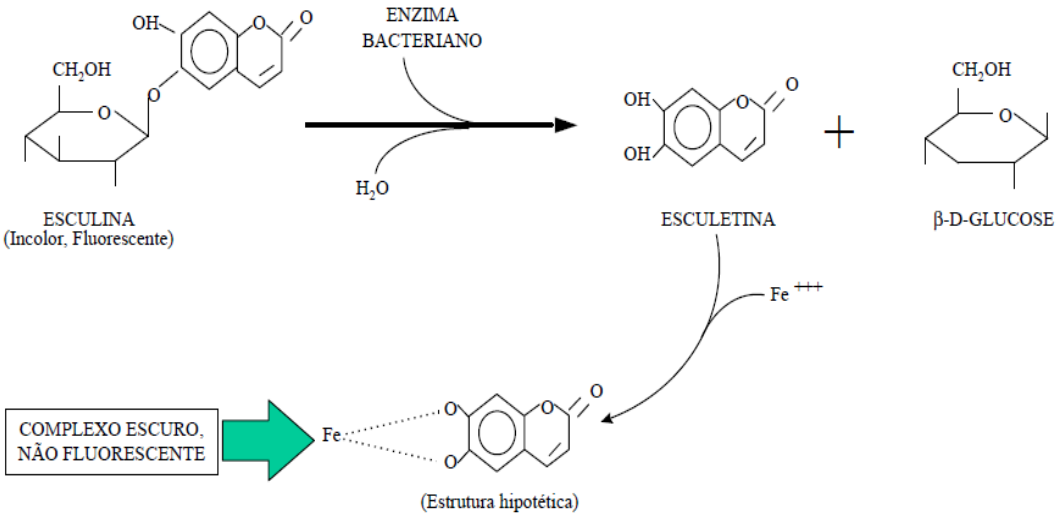


Figura 4. Hidrólise da esculina.

A hidrólise da esculina foi realizada mediante a inoculação da cultura com agulha de platina, em tubos com Agar esculina inclinado. Incubou-se a 35 ± 2 °C por até 72h. O enegrecimento do meio significa positividade para a hidrólise da esculina. O BSP hidrolisa a esculina.

- Fermentação da Glicose

A fermentação da glicose foi realizada adicionando a cultura crescida em caldo BHI, transferindo 0,1 mL para tubos contendo caldo vermelho de fenol-base adicionado de glicose, com incubação a 35 ± 2 °C por até 72h. A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente. O BSP não fermenta a glicose.

- Redução de Nitrato a Nitrito

A redução do nitrato a nitrito foi feito inoculando-se a cultura, com alça de platina, em tubos contendo caldo $BHINO_3$, com incubação a 35 ± 2 °C por até 72h. Após a incubação, adicionou-se aos tubos, 0,5 a 1 mL de alfa-naftilamina 0,5% e 0,5 a 1 mL de ácido sulfanílico 0,8%. O aparecimento de coloração vermelho/rosa escuro indica positividade para a redução de nitrato. Quando não houver o desenvolvimento desta coloração, ainda é preciso fazer a prova final, já que, talvez o nitrito possa ter sido convertido em amônia (NH^{3+}) ou em sua forma azoto molecular (N_2) e que consiste na

.

adição de pó de zinco. Após a adição do zinco, se houver o aparecimento de coloração vermelha/róseo escuro, indica reação negativa, pois o pó de zinco reage com o nitrato reduzindo-o a nitrito, mas se não houver este desenvolvimento de cor, indica que o nitrito já foi reduzido para as outras formas (NH^{3+} ou N_2), portanto, reação positiva. O BSP não reduz o nitrato a nitrito.

- Prova da Urease

A prova da urease foi realizada inoculando-se a cultura em tubos contendo Ágar uréia, com incubação a 35 ± 2 °C por até 72h. Depois, observar se houve crescimento com alteração da coloração do meio para rosa intenso ou não. O BSP não produz urease.

.

4.3 DESENVOLVIMENTO DE FILME ATIVO

4.3.1 Microrganismo de estudo

O microrganismo termorresistente *Bacillus sporothermodurans* - BSP (CCT 6247, DSMZ 10599) foi adquirido da Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia (FAT), sob a forma liofilizada e reativada segundo método recomendado pelo fornecedor, realizado em 5 mL de caldo BHI, com incubação de 35 ± 2°C por 24h.

4.3.2 Preparo da solução de nisina

A nisina em pó (Nisin from *Lactococcus lactis*: 2,5% balance sodium chloride and denatured milk solids) foi adquirida da Sigma-Aldrich do Brasil. A solução de nisina de 50.000 UI ml^{-1} foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de nisina em 10 mL (50 mg/mL) de HCl 0,01 M, com o intuito de facilitar sua diluição (LIU; HANSEN, 1990). A suspensão foi centrifugada a 3000 x g por 15 minutos a 10 °C em tubos estéreis, a fim de remover as proteínas do soro insolúveis (NGUYEN; GIDLEY; DYKES, 2008). O sobrenadante foi filtrado e uma solução estoque foi armazenada a 4 °C (KOMITOPOULOU et al., 1999). Esta solução foi diluída com HCl 0,01 M para obter uma solução de nisina de 10.000 UI ml^{-1} (10 mg/mL). Foram realizadas diluições sucessivas a fim de obter 5.000 UI ml^{-1} (5 mg/mL) e a partir desta, 2.500 UI ml^{-1} (2,5mg/mL).

4.3.3 Atividade da nisina na inibição do microrganismo *B. sporothermodurans* (BSP)

A cultura de BSP foi reativada e posteriormente diluída, a fim de obter concentração de aproximadamente 10^6 UFC/mL, possibilitando assim a concentração de colônias desejável para evidenciar a formação de halo (VANDERZANT et al., 2000). Desta diluição, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas em superfície utilizando placas descartáveis contendo ágar BHI. Discos de papel-filtro estéreis com aproximadamente 11 mm de diâmetro foram colocados no centro das placas. A seguir, foram inoculados 20 µL da solução de nisina em diferentes concentrações (2.500 UI, 5.000 UI, 10.000 UI e 50000 UI ml^{-1}, representando respectivamente, 0,25%, 0,5%%, 1,0% e 5,0%) aos discos; além de serem realizados também dois controles, onde foi adicionado apenas o papel-filtro e papel-filtro com 20 µL de HCl 0,01 M. Nas três primeiras horas, as placas foram incubadas a 7 °C a fim de permitir uma melhor difusão

.

da nisina (GUERRA et al., 2005). Após esse tempo, foram incubadas a 35 ± 2 °C, temperatura ideal para o crescimento do BSP, por 24h.

O resultado foi a medida do diâmetro do halo de inibição ao redor dos discos, incluindo o do próprio disco de papel, utilizando régua e paquímetro. A concentração de nisina mínima para inibição (MIC) foi selecionada para a confecção dos filmes. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata e com três repetições (MARTINS et al., 2010).

Na avaliação por este método, os tratamentos (filmes) foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em três repetições, em quintuplicata, e os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (α=0,05). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa SAS (Statistical Analisys System 9.1).

4.3.4 Preparo de filmes de acetato de celulose

Os filmes foram produzidos pelo método “cast” (utilização de solvente) pela adição de acetona em polímeros de acetato de celulose (em flocos), deixando em repouso por 12-24h a fim de formar uma emulsão; segundo Soares (1998). Esta emulsão foi então distribuída sobre placas de vidro, com auxílio de um espaçador de espessura definida (1-3 mm), para permitir a homogeneidade da espessura do filme. Após a evaporação da acetona e secagem natural, o filme pronto foi retirado da superfície da placa de vidro.

Para produção dos filmes antimicrobianos foram adicionadas à emulsão de acetato de celulose, antes da distribuição nas placas de vidro, solução de nisina (em concentrações de 0,5; 5 e 10% do preparado comercial em relação ao peso de acetato de celulose). O controle foi o filme de acetato de celulose (sem adição do antimicrobiano) e o adicionado de HCl 0,01 M.

O método consistiu em adição da quantidade de nisina conforme a concentração e adição de aproximadamente 1-1,2 mL de HCl, para diluição da nisina.

4.3.5 Ação antimicrobiana do filme pelo método de difusão em disco

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes através do método de difusão em disco (halo de inibição) foi realizada segundo Limjaroen et al. (2003). O microrganismo utilizado foi o BSP que, após a reativação, a cultura foi diluída em caldo

.

BHI até obter concentração de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL, conforme comparada com tubo padrão de turbidez de acordo com a escala de McFarland. Deste, 0,1 mL foi inoculado em placas com ágar BH por superfície. Discos dos filmes controle e antimicrobianos nas concentrações de 0,5; 5 e 10% com diâmetro de aproximadamente 11 mm, esterilizados em luz UV, foram aplicados na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 7 °C por 3h. Após esse tempo, foram incubadas a temperatura ideal para o crescimento do BSP, ou seja, 35 ± 2 °C por 24h. Após incubação, ocorrendo inibição do crescimento microbiano ao redor do disco, o raio do halo de inibição foi medido, em milímetros; utilizando régua e paquímetro.

Na avaliação por este método, os tratamentos (filmes) foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em três repetições, em triplicata, e os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (α=0,05). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa SAS (Statistical Analisys System 9.0).

4.3.6 Ação antimicrobiana do filme por inibição da curva de crescimento em meio líquido

A cultura de BSP foi reativada por no mínimo duas vezes consecutivas, em caldo BHI, com incubação a 35 °C por 24h. Após este período, diluições sucessivas foram realizadas até obter a concentração de 10^5 UFC/mL, conforme escala de McFarland. Transferiu-se 1 mL desta diluição para 99 mL de caldo BHI em erlenmeyers com capacidade de 150 mL, à temperatura de 35 °C, sob agitação com uso de agitador (“shaker”) em banho-maria, para a realização da curva de crescimento do microrganismo inoculado neste erlenmeyer.

Amostras da suspensão de microrganismos foram retiradas a intervalos regulares de tempo e o crescimento microbiano avaliado por densidade ótica (DO) do meio de cultura, utilizando espectrofotômetro (Analítica GBCUV/VIS 918) no comprimento de onda de 640 nm. As leituras foram realizadas até que a curva de crescimento atingisse a fase estacionária. Nos casos em que o valor lido da absorbância (Abs) apresentava maior que 0,800, diluía-se a alíquota com caldo BHI e efetuava-se a correção da leitura de acordo com a diluição. Dados de absorbância foram transformados para logaritmo neperiano (ln) e plotados em gráfico ln (DO) *versus* tempo de incubação do

.

microrganismo sem a presença do filme, do filme controle e do filme com diferentes concentrações do antimicrobiano (MELO et al., 2003).

A eficiência dos filmes na inibição do crescimento do microrganismo foi avaliada comparando-se as velocidades específicas de crescimento (μ) das curvas geradas, e pelo aumento da fase *lag* (adaptação do microrganismo ao meio, antes do crescimento exponencial). O cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) foi realizado por meio de regressão linear dos dados da fase exponencial de crescimento do microrganismo a partir do gráfico logaritmo neperiano da densidade ótica versus tempo (HAN; FLOROS, 1998; HAN, 2000).

A proporção de suspensão bacteriana e os filmes foram de 1 mL para 1 cm^2 de filme, considerando os dois lados que entram em contato com o meio (100 mL para 100 cm^2 de área de filme) e segundo os tratamentos com nisina, a área foi aumentada em 1:2 e 1:4, aumentando dessa forma a concentração.

Os tratamentos realizados com os filmes foram os seguintes:

Tratamento A - sem filme;

Tratamento B - filme controle com área de contato 1:1 (1mL de meio para 1 cm^2 de filme);

Tratamento C - filme com 5% de nisina com área de contato 1:1 (1mL de meio para 1 cm^2 de filme);

Tratamento D - filme com 5% de nisina com área de contato 1:2 (1mL de meio para 2 cm^2 de filme);

Tratamento E - filme com 5% de nisina com área de contato 1:4 (1mL de meio para 4 cm^2 de filme).

Na avaliação da ação antimicrobiana por inibição em meio líquido, os tratamentos (filmes), foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os testes foram efetuados em duas repetições, em triplicata, e os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e regressão, utilizando o teste F e comparações das médias utilizando o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (α=0,05). As análises estatísticas foram realizadas com uso do programa SAS (Statistical Analisys System 9.0) e o Excel 2007.

.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

5.1.1 Leite cru

O resultado da lactofermentação de leite cru refrigerado coletado em sete indústrias laticinistas analisadas foi de cinco indústrias (71,4%) tiveram como resultado a formação de coágulo gelatinoso/homogêneo, representando uma fermentação considerada normal para leite com qualidade satisfatória; enquanto que duas indústrias (28,6%) apresentaram a formação de coágulo caseoso, indicando o predomínio de microbiota proteolítica. Em estudo feito por Pinto, Martins e Vanetti (2006) em que analisaram a lactofermentação de leite cru coletados em tanques individuais, coletivos e de silos industriais, em que a menor variação do tipo de coágulo formado ocorreu nas amostras coletadas nos silos, a qual, como apresentado nesse trabalho. O tipo de coágulo homogêneo/gelatinoso foi representado por metade das amostras, 25% representada pelo outro tipo de coágulo, como observado nesse trabalho, que é do tipo caseoso/digerido e os restantes 25% pelo tipo esfacelado/sulcado que representa indicativo de fermentação pseudo-lática, devido à presença de coliformes.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (AM) em leite cru foi alta, em quatros das sete empresas analisadas, enquanto que, em três apresentaram contagens inferiores ao estabelecido pela IN 51 para leite cru refrigerado, sejam eles individuais ou coletivos que atualmente para a região centro-oeste é de 750.000 UFC/mL (BRASIL, 2002; Tabela 6).

Os resultados observados neste trabalho foram melhores que os obtidos por trabalho de Pinto; Martins e Vanetti (2006) os quais, através da análise da qualidade microbiológica de leite cru refrigerado de silos de indústrias, em que, nenhuma amostra atendeu ao padrão microbiológico legal; que na época, era de 1.000.000 UFC/mL.

.

Tabela 6. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e de psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado em silos de sete indústrias no Estado de Goiás no ano de 2008.

Indústria	Aeróbios Mesófilos (UFC/mL)	Psicrotróficos (UFC/mL)	Percentagem de Psicrotróficos*
A	135.000	76.000	56,30%
B	741.000	207.500	28,00%
C	2.010.000	1.920.000	95,52%
D	4.005.000	2.510.000	62,67%
E	270.000	19.000	7,03%
F	2.250.000	574.000	25,51%
G	1.570.000	1.425.000	90,76%

*Percentagem de Psicrotróficos com relação aos Aeróbios Mesófilos (AM).

Com relação à contaminação por microrganismos psicrotróficos, não existe limites estabelecidos por legislação, entretanto, algumas pesquisas relatam-se que, alterações bioquímicas se tornam significativas, na matéria-prima com contagens superiores à 10^6 UFC/mL (ALMEIDA; FILHO, 1993; PINTO; MARTINS; VANETTI; 2006; SHAH, 1994). Contudo, outros pesquisadores, consideram que estas alterações podem ser percebidas com contagens menores, a partir de 10^5 UFC/mL, em leite UHT e alguns derivados (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Considerando essa referência mais rigorosa para a contagem de psicrotróficos, ou seja, de 10^5 UFC/mL, apenas as amostras de duas empresas encontravam-se abaixo deste valor, enquanto que as cinco restantes estavam acima.

Considerando as contagens de microrganismos psicrotróficos, observa-se que, as amostras de três empresas (A, B e E) apresentaram contagens inferiores, indicando uma melhor qualidade da matéria-prima destas indústrias, apresentando relação coerente com as contagens de aeróbios mesófilos, pois, foram as que obtiveram também menores contagens (Tabela 6).

Em experimento conduzido por Pinto, Martins e Vanetti (2006), em que coletaram amostras em silos de indústrias, variando entre $5,6 \times 10^5$ e $6,4 \times 10^6$ UFC/mL, um pouco maior que o ocorrido nessa pesquisa que foi de $1,9 \times 10^4$ e $5,7 \times 10^5$ UFC/mL. Contagens mais elevadas de microrganismos psicrotróficos foram constatadas por Silva (2003) em seu trabalho, o qual, amostras provenientes de silos de indústrias

.

processadoras de leite UAT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás com contagens que variaram entre 1,4 x 10^6 e 8,8 x 10^7 UFC/mL, sendo detectadas diferenças significativas em função do local (Estado) e estação do ano.

De acordo com Brasil (1980), estabelece um controle da contaminação da microbiota psicrotrófica de tal forma que, sua contagem não exceda a 10% do número total de AM. Considerando isto, apenas a indústria **E**, que obteve a menor contagem, estava dentro desse limite para os psicrotróficos. Isso indica que, a maior parte das amostras que estavam estocadas nos silos industriais não atendeu ao padrão estabelecido por Brasil (1980), assinalando que, as condições higiênicas de produção e de armazenamento, de transporte e de refrigeração nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não estavam adequadas para minimizar a contaminação microbiana e o crescimento de microrganismos psicrotróficos.

.

5.1.2 Leite UAT

Além do isolamento realizado para posterior identificação da microbiota do leite produzido em Goiás e daqueles resistentes ao tratamento UAT, foi possível a realização da avaliação de qualidade para este produto lácteo ao longo de sua vida-de-prateleira. As condições de processamento nos sete laticínios em que foram coletadas as amostras estão indicadas na Tabela 7, juntamente com as avaliações quantitativas e qualitativas das amostras de leite UAT.

Tabela 7. Resultados das avaliações quantitativas e qualitativas de amostras de leite UAT de sete indústrias no Estado de Goiás no ano de 2008.

Indústria	Nº de amostras analisadas	Sistema de Aquecimento (tipo de trocador)	Condições de processo		Amostras em desacordo com a legislação		Amostras contaminadas (m.o's termorresistentes)	
			T(°C)	T(s)	Nº	%	Nº	%
A	6	Direto (injeção de vapor)	139	3	1	16,6	4	66,6
B	6	Direto (injeção de vapor)	140	6	0	0	4	66,6
C	6	Direto (injeção de vapor)	140	3	0	0	2	33,3
D	6	Direto (injeção de vapor)	145	3-4	0	0	3	50,0
E	6	Direto (injeção de vapor)	142	3-4	0	0	6	100,0
F	6	Indireto (placa)	143	4	0	0	3	50,0
G	6	Direto (injeção de vapor)	148-152	2-5	0	0	6	100,0
Total	42	-	-	-	2	2,4	56	66,6

Segundo a Tabela 7, não há condições de correlacionar a contagem de microrganismos com o sistema de aquecimento, pois, todos os sistemas, com exceção do primeiro, não apresentaram contagem acima do estabelecido por legislação, para aeróbios mesófilos e, considerando microrganismos termorresistentes esporulados,

.

todos apresentaram desenvolvimento. Em trabalho realizado por Zacarchenco et al. (2000), encontrou que, os sistemas por aquecimento direto, apresentaram melhores resultados para contagem destes microrganismos.

O resultado da avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT mostrou que apenas 2,40%, ou seja, uma amostra; estava fora do máximo permitido pela legislação nacional vigente para estes microrganismos, que é de 100 UFC/mL, conforme Brasil (1997).

O resultado encontrado neste trabalho foi melhor do que o obtido por Coelho et al. (2001) que, das 40 amostras analisadas, apenas 15, ou seja, 37,5% estavam dentro deste padrão permitido para AM. Em outra pesquisa, conduzida por Zacarchenco et al. (2000) resultou em uma percentagem maior, em um total de 100 amostras analisadas, 45,0% estavam em desacordo com a legislação. Essas discrepâncias podem ser explicadas pela aparente melhoria da qualidade da matéria-prima por causa da implantação da IN 51 em 2006 pelo MAPA, que estabeleceu limites de contagem para este grupo de microrganismos em leite cru, já que, anteriormente não havia limites, melhorando dessa forma a qualidade microbiológica do leite UAT processado (BRASIL, 2002; MILKPOINT, 2008).

Outra possível melhoria deste leite pode ser devido ao Sistema UltraFresh™, visto que, além da melhoria sensorial relatada por algumas empresas, existe a possibilidade do tratamento térmico ser mais eficiente na destruição dos microrganismos (MILKNET, 2009; TETRAPAK, 2009). Avaliando o tempo de estocagem dessas amostras, não houve um padrão de desenvolvimento, pois; houve oscilações quanto à contagem de aeróbios mesófilos durante todo o período em que foram analisadas as amostras de todas as marcas (Figura 5).

Em outro estudo realizado no estado de São Paulo (BARROS et al., 2006), em que 65 amostras de leite UAT foram coletadas e analisadas, observou-se que, 10,76% das amostras estavam em desacordo com o máximo de AM estabelecido pela legislação nacional, um resultado um pouco maior que o encontrado neste trabalho, porém bem menor que de outros trabalhos comentados acima.

.

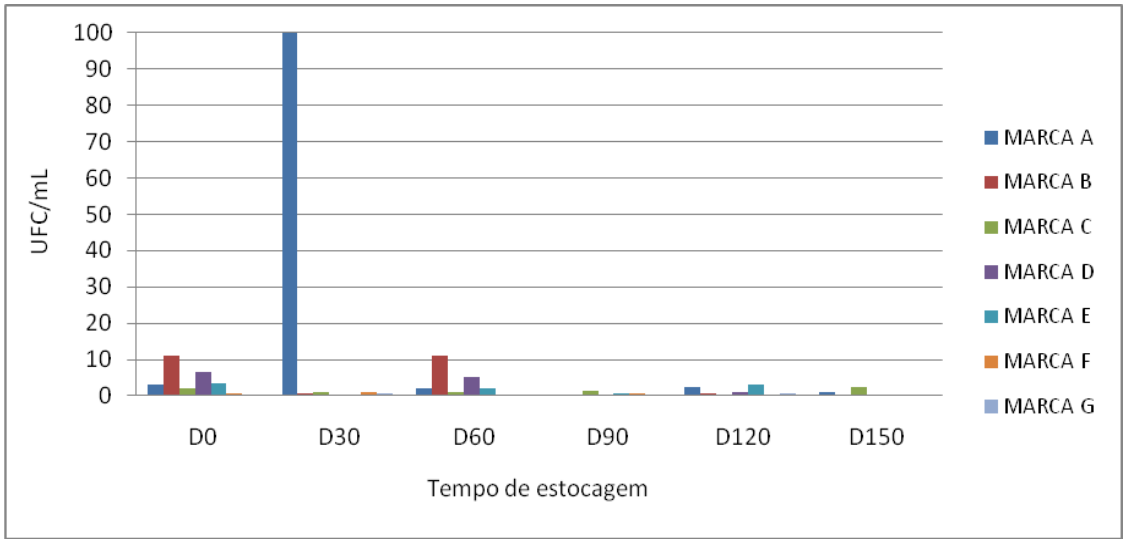


Figura 5. Análise de AM em leite UAT durante a vida-de-prateleira.

Considerando a presença de microrganismos termorresistentes; como o BSP (*B. sporothermodurans*), verificou-se que 66,7% das amostras estavam contaminadas com este tipo de microrganismos. Este valor é mais alto que o encontrado por Busatta et al. (2005), que encontrou o oposto, em 44 amostras (36,5%) estavam contaminadas.

Esta alta contaminação por este tipo de microrganismo pode ser devido à má higienização de equipamentos envolvidos no processamento UAT podendo ocorrer contaminação no produto final. Ainda, esta contaminação pode ser devido ao erro operacional, apesar de todo cuidado microbiológico no preparo dos meios e de manipulação.

Resultado semelhante foi obtido em estudo realizado por Montanari et al. (2004), que, de 199 amostras coletadas, em um período de dois anos, 62,81% obtiveram algum desenvolvimento de microrganismos termorresistentes.

Levando em conta, a contagem de microrganismos termorresistentes, ao longo da vida de prateleira do produto, observou-se que, assim como ocorreu na contagem para AM, houve oscilações nesta contagem. A explicação para este fato é que os esporos que sobreviveram ao tratamento térmico, podem ter se desenvolvido ao longo do tempo em momentos diferentes, assim; ocasionando diferentes contagens ao longo de todo o tempo, oscilando, como ocorreu nesta pesquisa (PETTERSSON et al., 1996).

O BSP parece resistir às condições de tempo e temperatura de processamento térmico empregadas atualmente no sistema UAT, pelo método de injeção de vapor, fato que desperta preocupação pela possibilidade de prejuízos com a condenação de lotes do produto, acrescida do fato do consumo de leite em embalagens laminadas (tipo “longa

.

vida”), aumentou significativamente no Brasil, conforme dados da Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV, 2008). Como relatado durante a pesquisa bibliográfica deste trabalho, assim como mencionado por Zacarchenco et al e Busatta et al., por se tratar de um problema relativamente recente, há escassez de dados técnicos a respeito desta bactéria na literatura internacional e nacional, principalmente com relação a seu comportamento, suas características fisiológicas e bioquímicas, mecanismos do processo de deterioração dos produtos, sua resistência térmica, características ecológicas, níveis de contaminação e técnicas de isolamento, necessitando de mais estudos.

.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

5.2.1 Microrganismos Psicrotróficos

Conforme a coloração de Gram, dos 70 isolados, provenientes de leite cru refrigerado nesta pesquisa, observou-se a predominância no isolamento de bactérias Gram - positivas, com 82,85% resultado este, que difere do obtido em outros estudos, que mostram que bactérias Gram-negativas são as consideradas mais freqüentemente isoladas em leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008; ENEROTH et al., 1998).

Considerando a morfologia dos isolados, a maior parte foi de bastonetes, representando 58,6% dos isolados e destes a maior parcela foi de Gram - positivos (68,3%). Na Tabela 8, encontra-se a proporção de microrganismos Gram - positivos e Gram - negativos quanto à sua morfologia.

Tabela 8. Identificação morfológica e tintorial de microrganismos isolados de leite cru refrigerado.

Morfologia	**Coloração de Gram (n[1]/%[2])**		**Total**
	Gram +	**Gram -**	
Cocos	28/100%	-	28/40,0%
Bastonetes	28/68,3%	13/31,7%	41/58,6%
Outros[3]	1/100%	-	1/1,4%
Total	57/81,43%	13/18,57%	70/100%

[1]nº de isolados, [2]percentagem, [3]Levedura.

Foi realizada a identificação dos microrganismos psicrotróficos isolados do leite cru refrigerado em nível de gênero conforme o Manual Bergey de Identificação Bacteriana (9ª edição, 1994), sendo representado na Tabela 10.

O resultado da caracterização de microrganismos por testes bioquímicos segundo o Manual Bergey possibilitou identificar 6 grupos de isolados no leite produzido no Estado de Goiás, sendo:

.

- **Grupo 4 -** constituído pelos microrganismos em forma de bastonetes/cocos Gram - negativos aeróbios/microaerófilos. Alguns exemplos desse grupo são *Acitenobacter*, *Pseudomonas* e *Acetobacter*.
- **Grupo 5 -** este grupo é formado pelos bastonetes Gram - negativos, anaeróbios facultativos. Exemplos desse grupo são os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, tais como *Klebsiella* e *Aeromonas* respectivamente.

- **Grupo 17 -** formado pelos cocos Gram - positivos. Alguns microrganismos que fazem parte deste grupo são o *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

- **Grupo 18 -** constituído pelos microrganismos Gram - positivos formadores de esporos, sejam eles em forma de bastonetes ou cocos. Os principais microrganismos deste grupo são o *Bacillus* e o *Clostridium*.

- **Grupo 19 -** composto por bastonetes regulares, Gram - positivos não formadores de esporos. Exemplos desse grupo são *Lactobacillus* e *Listeria*.
- **Grupo 20 –** este grupo é formado pelos bastonetes irregulares Gram - positivos não formadores de esporos. Alguns microrganismos que fazem parte desse grupo são *Actinomyces*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*.

Como pode ser visto na Tabela 10, os microrganismos mais isolados foram, *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., seguido de *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp. Apenas 3 (4,28%), dos 70 isolados foram identificadas como *Pseudomonas* spp., valor menor do que o referido em muitos trabalhos que isolaram microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado; como o realizado por Eneroth, Ahrné e Molin (2000) que observaram que 72 a 77% dos isolados eram do gênero *Pseudomonas* spp.

.

Tabela 9. Caracterização das colônias isoladas em leite cru refrigerado produzido em Goiás no ano de 2008.

Cultura	Número de isolados (n)	Percentagem (%)	Grupo a que pertence*
Staphylococcus spp.	15	21,43	Grupo 17
Klebsiella spp.[a.1]	2	2,85	Grupo 5 (Enterobacteriaceae)
Bacillus spp.	9	12,85	Grupo 18
Corynebacterium spp.	15	21,43	Grupo 20
Pseudomonas spp.	3	4,28	Grupo 4
Streptococcus spp.	9	12,85	Grupo 17
Micrococcus spp.	3	4,28	Grupo 17
Enterococcus spp.	1	1,43	Grupo 19
Aeromonas spp.[a.2]	4	5,70	Grupo 5 (Vibrionaceae)
Shigella spp./*Yersinia* spp.[a.3]	3	4,28	Grupo 5 (Enterobacteriaceae)
Lactobacillus spp.[a.4]	1	1,43	Grupo 19
Oscillospira spp.	1	1,43	Grupo 18
Grupo do *Bacillus* spp.	3	5,71	Grupo 18
Levedura	1	1,43	-
Total	70	100,00	-

*Conforme Manual Bergey. [a] Através dos testes bioquímicos realizados, foi possível identificar a espécie ([a.1] *K. pneumoniae*, [a.2] *A. veronii* e *A. salmonicida* – duas colônias isoladas de cada, [a.3] *S.sonnei* ou *Y.pestis*, [a.4] *L. fermenti*).

Em outro trabalho mais recente realizado na região da Zona da Mata em Minas Gerais, por Arcuri et al. (2008), dos 308 isolados de microrganismos psicrotróficos, dos 250 que foram identificados como Gram - negativos, a maioria foi identificada como *Pseudomonas* spp., representando 43,2% dos isolados e destas, 87,0% foram identificadas através dos kits API 20E como sendo *Pseudomonas fluorescens*. Resultados semelhantes foram obtidos por Jayarao e Wang (1999) em que, dos 234 isolados de leite cru, dos 205 isolados que puderam ser identificados, 49,6% foram identificados como *Pseudomonas* spp. O mesmo ocorreu com experimento conduzido

.

por Pinto, Martins e Vanetti, os quais dos 153 isolados, 66 (43,14%) pertenciam ao gênero *Pseudomonas* spp.

Umas das explicações para tamanha diferença pode ser devida à microbiota autóctone do leite cru produzido no Estado de Goiás neste período, podendo levar a predominância de outros tipos de microrganismos psicrotróficos, apesar de que, de acordo com Muir (1996), espécies do gênero *Pseudomonas* são mais comuns em leite cru refrigerado, representando em torno de 50%, pois seu tempo de geração é menor que de outros grupos de microrganismos, contudo, este crescimento, se torna mais eficiente, após 72h de refrigeração do leite cru, tornando os psicrotróficos predominantes na microbiota do leite cru refrigerado (SANTOS; FONSECA, 2003).

Outra possível explicação foi a refrigeração do leite ter sido submetida a menos de 72h, em que, a *Pseudomonas* spp. não ter apresentando um crescimento mais eficiente, bem como alguma possível falha no processo de refrigeração desse leite cru até sua chegada à indústria, visto que, temperaturas maiores, proporcionarem melhor meio de crescimento de outros microrganismos, como os aeróbios mesófilos, por exemplo, *Staphylococcus aureus* (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; MORENO; VIALTA; VALLE, 2002; MUIR, 1996; CUNHA; BRANDÃO, 2000; PINTO et al., 2006; SANTOS et al., 2009; SANTOS; FONSECA, 2003).

Pode-se ver também, que neste trabalho isolou quantidade menor de colônias, pois somente foi possível realizar uma repetição com o leite cru de cada laticínio, o que pode ter influenciado também no resultado; no entanto, como todas são baseadas na proporção em percentagem de colônias isoladas, esta hipótese, talvez possa ser descartada.

5.2.2 Microrganismos Termorresistentes

Segundo os resultados da coloração de Gram, dos 157 isolados de leite UAT, a maior parte, 63,70% foi de microrganismos Gram - positivos (Figura 10). Quanto à morfologia, apenas 52,87% dos isolados foram identificados como bastonetes (Figura 11), destes, apenas 37,35% foram Gram-positivos, dos quais foram submetidos a provas de identificação, a fim de identificar de *B. sporothermodurans* (BSP).

Na Tabela 10 encontra-se a relação entre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos quanto à sua morfologia. Com relação à identificação, separaram-se os bastonetes Gram-positivos, devido à importância destes em alimentos submetidos a processos térmicos rigorosos (JAY, 2005; PETTERSSON et al., 1996; SCHELDEMAN

.

et al., 2006), como é o caso do leite UAT; com a intenção de identificação de BSP, de acordo com Brasil (2003).

Tabela 10. Identificação morfológica e tintorial de microrganismos isolados de leite UAT.

Morfologia	Coloração de Gram (n[1]/%[2])		Total
	Gram +	Gram -	
Cocos	56/91,80%	5/8,20%	61/38,85%
Bastonetes	31/37,35%	52/62,65%	83/52,87%
Outros[3]	11/100%	-	1/8,28%
Total	100/63,70%	57/36,30%	157/100%

[1]nº de isolados, [2]percentagem, [3]Leveduras e coco-bacilos.

Das 157 colônias isoladas de leite UAT, como pode ser observado na Tabela 11, apenas 31 (37,35%) isolados foram identificados como bastonetes Gram-positivos, portanto, apenas nestes isolados foram realizadas provas bioquímicas segundo Brasil (2003), para identificação de *B. sporothermodurans* (BSP). Além deste, também foi considerado trabalho realizado por Pettersson et al., (1996), sendo o primeiro trabalho a nomear este microrganismo, apenas um (3,25%), dos 31 isolados submetidos à identificação, foi identificado como este microrganismo, uma quantidade abaixo do esperado.

Contudo, através da cepa adquirida da Fundação André Tosello (FAT), de identificação CCT 6247, DSMZ 10599, cujo código foi o mesmo que Pettersson et al. (1996) enviou ao banco de culturas da Alemanha; obtiveram-se alguns resultados diferentes quanto à fermentação da glicose e crescimento em anaerobiose, apresentando resultado positivo e presença de crescimento, respectivamente. Novos testes foram realizados e o mesmo sempre foi obtido.

Devido a isso, foram consultados profissionais da FAT para realização destes testes em seus laboratórios, pois; poderia ter ocorrido contaminação através do manuseio, visto que, neste experimento, muitos microrganismos foram necessários na condução deste. Contudo, chegou-se aos mesmos resultados obtidos por este trabalho, havendo desacordo com o relatado pela literatura quanto ao seu desenvolvimento em anaerobiose e fermentação da glicose. Foi relatado também que este microrganismo tem sido utilizado e pedido por diversas instituições, e nenhum problema grave foi relatado

.

por ela, mas ainda é possível que as condições do teste, principalmente o meio de cultura utilizado possa explicar parcialmente estas variações segundo Scheldeman et al. (2006).

Levando em consideração tal fato, já que Montanari et al. (2004), com cultura de BSP DSMZ 10599 (a mesma utilizada), também foi capaz de produzir ácido através da fermentação da glicose. Então, foi realizada uma nova caracterização, baseando-se nos resultados que a cultura de BSP obtida tenha atravessado por alguma alteração metabólica ou mutação. Então, obteve-se um resultado de dois (6,45%) isolados como sendo BSP dos 31 submetidos à identificação, não alterando muito o resultado. Em mesma pesquisa, em um período de dois anos, obtiveram 199 amostras de leite UAT (UHT) e isolaram 248 bactérias, também em ágar BHI, as quais foram identificadas como *B. sporothermodurans*, utilizando técnica de biologia molecular na seqüência 16S rRNA, porém; 13 cepas foram identificadas com comportamentos bioquímicos um pouco diferente.

Alteração nas características metabólicas do BSP foi constatada por vários autores, (KLIJN et al., 1997; MONTANARI et al., 2004; PETTERSSON et al., 1996), dificultando a identificação fenotípica correta deste microrganismo, até por kits como o API 50 CHB, sendo explicada pelo pobre crescimento deste; com exceção da hidrólise da esculina, que é positiva. Isto por causa da enorme diversidade genética deste microrganismo, que em pesquisas mais recentes (GUILLAUME-GENTIL et al., 2002; MONTANARI et al., 2004; VAEREWIJCK et al., 2001), demonstra não apresentar as mesmas descrições relatadas por Pettersson et al. (1996), os quais foram isolados muitos instáveis de leite UAT, de acordo com Scheldeman et al. (2006).

Por causa disso, são necessários métodos mais definitivos, como as várias metodologias de biologia molecular, para a identificação mais correta possível deste microrganismo, tais como utilização de técnicas de tipagem baseadas em PCR baseado no 16S rDNA, amplificação polimórfica aleatória do DNA, elementos palindrómicos extragênico repetitivos (REP-PCR) e ribotipagem (GUILLAUME-GENTIL et al., 2002; KLIJN et al., 1997; SCHELDEMAN et al., 2002; SILVA et al., 1998).

Trabalho conduzido por Busatta, Valdruga e Cansian (2005) em que analisaram 44 amostras de leite UAT no Rio Grande do Sul, 16 destas ou 36,5%, apresentou-se contaminadas com o BSP, no entanto, apenas foi analisado microscopicamente quanto à coloração e morfologia. Levando em consideração apenas este aspecto, valor muito semelhante seria encontrado, aos quais 37,35% dos isolados apresentaram morfologia

.

semelhante ao relatado por Pettersson et al. (1996), ou seja, forma de bacilos longos e filamentosos com coloração Gram - positiva desigual.

Em outra pesquisa, realizada por Zacarchenco et al. (2000) 300 colônias foram isoladas em ágar BHI-E e identificadas segundo morfologia típica, teste de oxidase, fermentação de glicose até 72h e até 7 dias e hidrólise de esculina, e a maioria (87,4-100%) apresentaram-se segundo relatado pela literatura (PETTERSSON et al., 1996), com exceção da fermentação da glicose em 7 dias, obtendo um resultado inferior, de 11,9-17,6%.

O BSP é de descoberta relativamente recente, relatado no final da década de 80 e início de 90, sendo os primeiros relatos na Itália, Áustria e Alemanha e depois se alastrou pela Europa e outros continentes como América do Sul e Ásia (GUILLAUME-GENTIL et al., 2002; SCHELDEMAN et al. 2006). Conhecido preliminarmente como "Highly Heat-Resistant Spores" (HHRS ou HRS), ou seja, microrganismos produtores de esporos altamente resistentes ao calor; mas definitivamente foi nomeado por *Bacillus sporothermodurans* (BSP) um pouco mais tarde, em 1996 por Pettersson et al. (1996).

Foi isolado pela primeira vez em leite UAT e leite esterilizado, porém pode estar presente em outros produtos, tais como creme de leite UAT, achocolatados dos mais diferentes tipos, leite em pó e leite evaporado ou reconstituído (KLIJN et al., 1997). Relata-se que, o melhor isolamento para esse microrganismo em leite UAT é o meio BHI, já que em leite cru, este isolamento é difícil, pois devido a alta competição microbiana e suas características de pobre crescimento, torna difícil seu isolamento, apesar de já ter sido relatado o isolamento (SCHELDEMAN et al., 2002). Melhor seleção ainda seria suplementando com vitamina B_{12} e/ou autoclavar (em torno de 120-121 °C) a amostra por 5 minutos ou então aquecê-la a 100 °C por 30-40 minutos. Depois realizar o plaqueamento e incubar a 35 ± 2 °C por 48 horas (PETTERSSON et al., 1996; SCHELDEMAN et al., 2006). Em pesquisa realizada por Zacarchenco e Leitão (1999), constataram que, a adição de esculina e o plaqueamento por superfície obtiveram melhor resultado para o isolamento do BSP.

O baixo isolamento do BSP em leite UAT neste trabalho talvez seja por causa desta falta de suplementação com vitamina B_{12} ou ainda pela esculina, segundo identificação realizada.

A fonte de contaminação deste microrganismo, segundo alguns pesquisadores, está relacionada com a alimentação dos animais, como silagem, feno, capim e principalmente alimentos concentrados, conhecido como ração; com isso, pode ocorrer

.

a contaminação no leite cru. Outra forma de contaminação por esse microrganismo é na indústria através do reprocessamento de produtos contaminados, como leite em pó e lotes de leite (VAEREWIJCK et al., 2001; SCHELDEMAN et al., 2002).

Filogeneticamente o BSP é muito próximo de outros *Bacillus*, como *B. oleronius*, *B. lentus*, *B. firmus* e *B. benzoevorans* e é altamente resistente (esporos), possuindo valores para D_{140} de 3,4 a 7,9 segundos, dependendo da estirpe analisada, mais ainda que o *Geobacillus stearothermophilus* (formalmente conhecido por *B. stearothermophilus*) por ser um dos microrganismos que produzem um dos esporos mais termorresistentes, que possui um D140 de 0,9 segundos (SCHELDEMAN et al., 2006; HUEMER et al., 1998).

O maior problema relatado em relação a este microrganismo seria o aumento da contagem total, podendo ultrapassar o limite estabelecido por legislação, tanto nacional como internacional (por exemplo, na Europa), com probabilidade de prejuízos econômicos, por condenação do lote em que estiver em desacordo, já que foi relatado; não ser patogênico, nem alterar, normalmente a estabilidade e a qualidade sensorial do produto (BARROS et al., 2006; BUSATTA; VALDRUGA; CANSIAN, 2005; KLIJN et al., 1997; SCHELDEMAN et al., 2006; ZACARCHENCO et al., 2000).

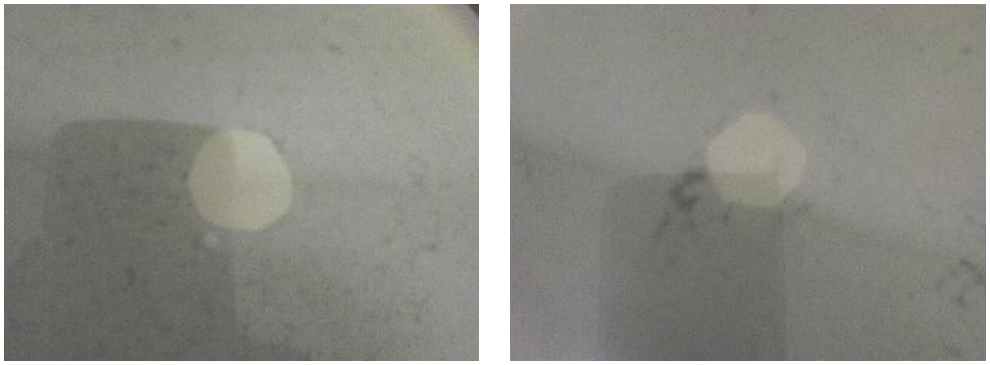
5.3 DESENVOLVIMENTO DE FILME ATIVO

5.3.1 Atividade da nisina na inibição do microrganismo *B. sporothermodurans* (BSP)

Os resultados obtidos nos testes de avaliação do halo de inibição mostraram efetividade antimicrobiana, porém, não proporcionalmente à concentração da solução de nisina, não havendo diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (α=0,05), apesar de os halos formados pela maior concentração testada (5%), visualmente serem maiores.

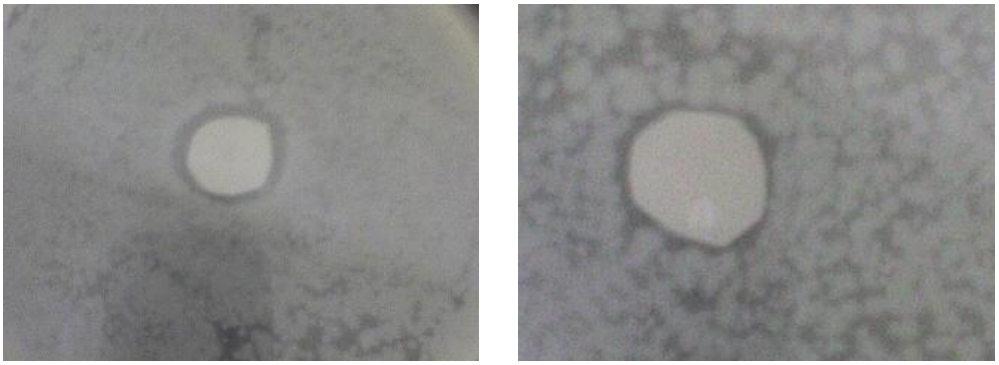
As Figuras 6 a 8 ilustram o halo de inibição do crescimento do BSP, com medida do halo após 24h. Na Tabela 11 encontram-se as dimensões dos raios dos halos de inibição do crescimento do BSP nas diferentes concentrações testadas.

.



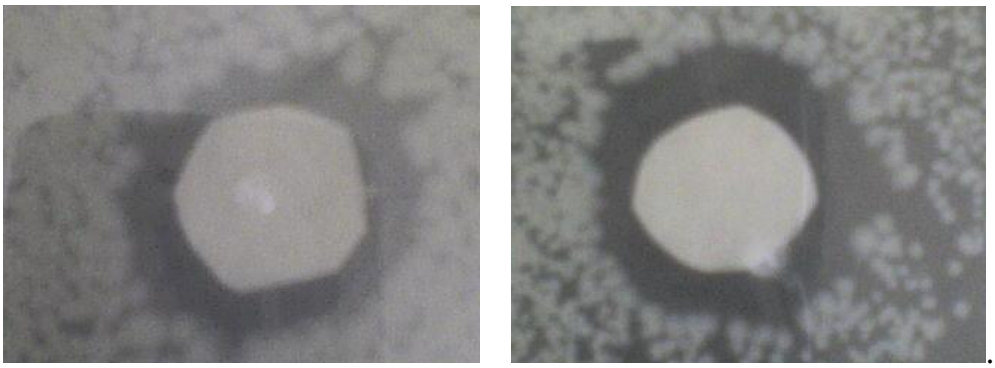
Controle Controle (com HCl)

Figura 6. Teste do halo em disco de papel-filtro sem adição de solução de nisina.



Solução com 0,5% de nisina Solução com 1,0 % de nisina

Figura 7. Teste do halo de inibição do BSP, em disco de papel-filtro com solução de nisina (concentrações de 0,5 e 1,0%).



Solução com 5,0 % de nisina

Figura 8. Teste do halo de inibição do BSP em disco de papel-filtro com solução de nisina (concentração de 5,0%).

.

A formação do halo em testes de ação antimicrobiana é dependente da difusão do antimicrobiano e da velocidade de crescimento do microrganismo; sendo estes parâmetros influenciados pelo estado fisiológico da cultura indicadora, umidade do ágar e difusão do antimicrobiano antes do início do crescimento do(s) microrganismo(s) estudado(s) (TOLEDO, 2000; MELO, 2003).

Tabela 11. Dimensões do halo de inibição do crescimento do BSP em meio BHI com papel-filtro inoculado com diferentes concentrações de nisina.

	Concentração de nisina no papel-filtro (%)					
Raio do halo (mm)	Controle 1 (x ± s)[1]	Controle 2 (x ± s)[1]	0,25% (x ± s)[1]	0,5% (x ± s)[1]	1,0% (x ± s)[1]	5,0 % (x ± s)[1]
Bacillus sporothermodurans	0,0 ± 0,0[a]	0,0 ± 0,0[a]	13,1 ± 0,02[b]	14,4 ± 0,04[b]	15,2 ± 0,08[b]	16,5 ± 0,12[b]

[1] Média de três repetições em quintuplicata; Controle 1 – somente disco de papel-filtro; Controle 2- com solução de HCl 0,01M. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (Tukey, α=0,05).

Em experimento conduzido por Pirttijärvi et al. (2001), a fim de verificar o efeito da nisina sobre diversas espécies de *Bacillus*, inclusive o BSP, em amidos industriais; verificou-se que, a maioria dos *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. sterothermophilus*, *B. flexus*, *B. spothermodurans*, entre outros) foram inibidos por concentrações muito baixas de nisina, em torno de 0,025 a 0,125 pg de nisina mL^{-1}, que foi espalhado pela superfície do ágar.

Portanto, assim como foi verificado nesse trabalho, por meio destes testes, existe ação antimicrobiana da nisina sobre o crescimento do BSP.

5.3.2 Seleção do filme incorporado com nisina

Por não ter sido observado diferença significativa entre as diferentes concentrações de nisina sobre o BSP, foi utilizada as concentrações de 0,5; 1; 5 e até 10% para o teste do halo, enquanto que para o teste de inibição da curva de crescimento

.

a concentração selecionada foi a intermediária dos filmes produzidos, ou seja, de 5% de nisina (0,2 g de nisina em 4 g de acetato), alcançando uma concentração final média de 50 mg de nisina por grama de acetato, para realização dos testes com os filmes. Nesta concentração o filme apresentou-se com coloração esbranquiçada, boa flexibilidade e baixa resistência ao rasgo.

5.3.3 Ação antimicrobiana do filme pelo método de difusão em disco

Os resultados obtidos nos testes de avaliação do halo de inibição não mostraram efetividade antimicrobiana nas concentrações de nisina testadas do filme incorporado com nisina, contudo, onde estava localizado o disco, não houve desenvolvimento microbiano, ou seja, apresentou inibição contra o BSP apenas por meio de contato (Figuras 15 e 16).

Isto indica que não houve migração/difusão da nisina do filme para a superfície do meio, não ocorrendo a formação do halo como era esperado, apesar da ação antimicrobiana conhecida da nisina contra vários microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. dentre outros, seja ela associada ou não com outras substâncias e/ou tratamentos físicos, (FANG; CHEN; CHEN, 1997; LOPEZ-MENDOZA; RUIZ; MATA, 2007; RODRÍGUEZ et al., 1997; TU; MUSTAPHA, 2002). A nisina também apresenta ação contra *Bacillus* spp., inclusive contra o *B. sporothermodurans*, e até mesmo contra esporos (MANSOUR et al., 1998; McAULIFFE et al., 2001; NISSEN et al., 2001; PIRTTIJÄRVI et al., 2001; POL; SMID, 1999; RAHEEM; SARIS, 2009).

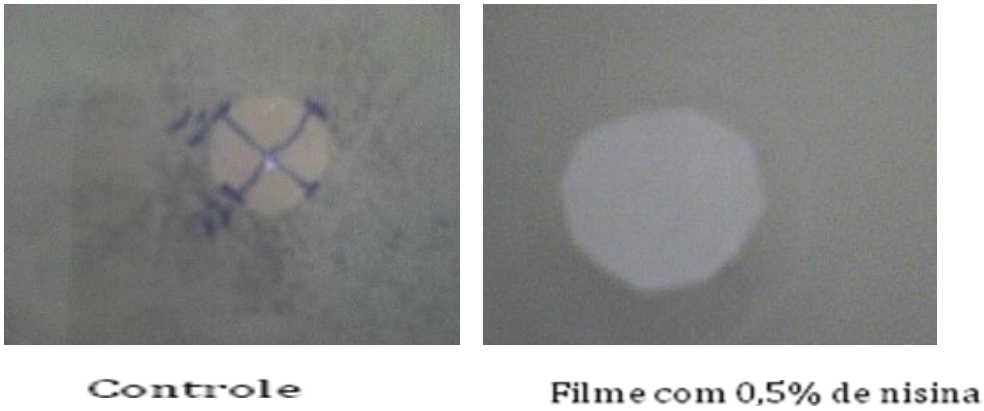
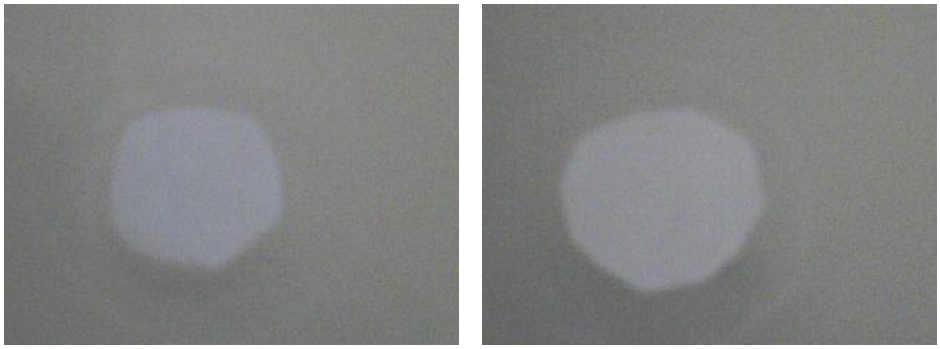


Figura 9. Teste do halo de inibição com filmes sem e com 0,5% de nisina.

.



Filme com 1,0% de nisina Filme com 5,0% de nisina

Figura 10. Teste do halo de inibição com filmes com 1,0 e 5,0% de nisina.

Sabe-se que, a formação de halo é dependente da difusão da bacteriocina e da velocidade de crescimento do microrganismo, em que, tais parâmetros são influenciados pelo estado fisiológico do microrganismo, umidade do ágar, tempo de difusão do agente antimicrobiano anterior ao início do crescimento de cultura e do próprio meio de cultura (TOLEDO, 2000). Com isso, o crescimento do microrganismo em um meio rico, teria sua velocidade aumentada, como no meio BHI, não permitindo que a nisina fosse difundida pelo ágar, a tempo de inibir o desenvolvimento microbiano e assim não formando halo.

Em experimento realizado por Scannell et al. (2000), ocorreu resultado semelhante, ao qual imergiram os filmes de polietileno/poliamida e celulose em solução de nisina, para que ocorresse adsorção desta para os filmes. Foi verificado que o filme de polietileno/poliamida apresentou inibição no crescimento do microrganismo indicador somente na superfície de contato com o meio de crescimento, assim como ocorreu nessa pesquisa; contudo, somente o filme de celulose apresentou formação de halo, o que não ocorreu nesse trabalho.

Trabalho realizado por Melo (2003), em que visava também verificar a eficiência antimicrobiana de filme de acetato de celulose incorporado com nisina, porém avaliando-se crescimento de *Staphylococcus* sp., observou que também não houve formação de halo, utilizando pedaços com 1,5 x 1,5 cm, em meio BHI. Entretanto, utilizando-se outros meios como PCA e Baird-Paker, observou-se a formação de halo. No entanto, uma concentração bem maior foi utilizada, sendo a utilizada para o teste de 50% de nisina.

.

5.3.4 Ação antimicrobiana do filme por inibição da curva de crescimento em meio líquido

Os resultados obtidos nos testes de inibição da curva de crescimento podem ser observados na Figura 11. Utilizando-se a regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento, foi possível calcular as respectivas velocidades específicas de crescimento microbiano (µ) e avaliar se houve aumento ou não da fase *lag*. Na curva, a sigla BSP representa o crescimento do microrganismo sem filme.

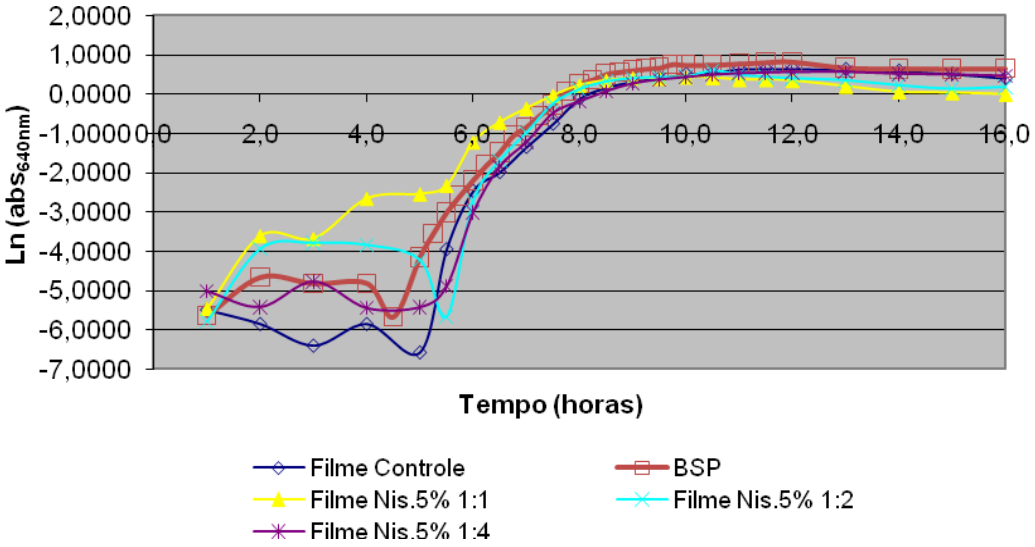


Figura 11. Curva de crescimento de *B. sporothermodurans* em meio BHI, na presença de filmes com diferentes concentrações/área incorporado com nisina.

Os resultados obtidos nas curvas de crescimento foram avaliados pela alteração na velocidade de crescimento do microrganismo (µ), utilizando apenas os pontos que compõem a parte linear da fase exponencial. A aplicação de regressão linear a estes pontos permite a obtenção da inclinação da reta e, quanto maior o valor, maior a velocidade de crescimento. Caso haja algum efeito inibidor do filme sobre a velocidade de desenvolvimento do microrganismo, o valor de µ é diminuído.

Observa-se na Figura 11, alterações na curva de crescimento, principalmente com relação a fase *lag* (ou de adaptação) e *log* (ou exponencial de crescimento), contudo, após a estabilização do crescimento do microrganismo, não houve diferenças significativas quanto a população microbiana ao final do tempo (16 horas). No entanto, levando em consideração às velocidades de crescimento, aplincado-se regressão linear à

.

fase exponencial de crescimento do gráfico de cinética de crescimento de *B. sporothermodurans* (Figura 11), constatou-se que, a velocidade para o filme Tratamento C (menor concentração de nisina), foi a que teve o menor coeficiente (μ), como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 12. Média das velocidades específicas de crescimento (μ) de *B. sporothermodurans* em meio BHI com os diferentes tratamentos dos filmes de acetato de celulose incorporados com nisina.

Tratamento	**Média μ (h^{-1})***
A	1,5758[a]
B	1,2784[b]
C	0,8240[c]
D	1,5046[a]
E	2,1027[d]

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Legenda: Trat. A = Sem filme; Trat B = Filme controle; Trat. C = Filme 5% Nisina 1:1; Trat. D = Filme 5% Nisina 1:2; Trat. E = Filme 5% Nisina 1:4.

Os valores da velocidade específica de crescimento (μ) mostraram que, estatisticamente, a presença do filme incorporado com nisina influenciou na fase de crescimento do microrganismo, com exceção do Tratamento D (concentração intermediária de nisina), que não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) pelo teste de Duncan, com o tratamento sem filme.

O filme controle (sem nisina), apresentou um μ menor que os tratamentos sem filme e 5% de nisina 1:2; enquanto que, o tratamento E (maior concentração de nisina), foi o que apresentou o pior resultado, obtendo o maior μ ($p<0,05$), como pode ser observado na Tabela 12.

Uma provável explicação para o valor menor, observado no filme controle se comparado com o sem filme é que algumas colônias do microrganismo podem ter aderido ao filme de acetato de celulose, diminuindo a leitura da densidade ótica, pois com experimentos anteriores, constatou-se que, a porosidade para este filme é de aproximadamente 100 μm de diâmetro, podendo “capturar” microrganismos do meio (MELO, 2003; SOARES, 1998).

.

Outra hipótese, para os filmes com maior quantidade de cupons, e dessa forma maior concentração, seria que, o aumento de cupons dos filmes nos erlenmeyers não exerceu ação, pois; em vez de aumentar a área, esta foi diminuída, já que muitos destes cupons estavam grudados/enrolados entre si, aumentando a espessura do filme.

Em estudo realizado por Silveira (2005), relacionou-se a espessura do filme com a eficiência do antimicrobiano (ácido sórbico), para a conservação de massa de pastel. Verificou-se que, o aumento da espessura do filme, não necessariamente aumentou a eficiência da atividade do antimicrobiano; pois, o aumento da espessura, pode dificultar a migração do agente antimicrobiano para a superfície, já que, a efetividade depende do contato direto com o microrganismo.

Em trabalho realizado por Melo et al (2006), utilizando filme de acetato incorporado também com nisina, com concentração de 50%, para o controle de *Staphylococcus* sp., submetidos a lavagem ou não com NaCl, obteve resultado semelhante neste trabalho, quanto a contagem na fase *lag* dos tratamentos com filme serem maiores que o sem filme. Entretanto, considerando a fase *log*, se observa um "desaceleramento" proporcionado pelos filmes (controle e com nisina) com significância estatística; semelhante a observada nos Tratamentos B e C desta pesquisa. Finalmente, considerando o tempo final, ambas pesquisas, obtiveram resultados semelhantes quanto à população microbiana, sendo que, neste experimento, obteve-se um resultado ligeiramente menor.

Em mesma pesquisa (MELO, 2003), utilizou-se estes filmes para controle de *Staphylococcus* sp. em queijo de coalho com alta contagem inicial deste microrganismo, os quais foram estocados por 20 dias e analisados em intervalos de 5 dias. Foi observado uma maior eficiência do filme com 50% de nisina, nos primeiros 5 dias, diminuindo de 1-2 ciclos logarítimicos. Mesmo considerando contagem inicial alta, este filme apresentou inibição, acredita-se que, com contagens inferiores, esta inibição seja maior, proporcionando um aumento na vida-de-prateleira do produto.

Em estudo realizado por Guerra et al. (2005), confeccionou um revestimento de celofane com nisina que envolveu pedaços de carne, sendo que, através desta embalagem, obteve redução na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, cerca de 1,5 unidade logarítmicas; resultando em aumento da vida de prateleira deste produto em temperatura de refrigeração.

Em pesquisa realizada por Mauriello at al. (2005), foram feitos filmes antimicrobianos incorporado com nisina com a intenção de inibição de *Micrococcus*

.

luteus em TSB e em leite cru e pasteurizado. O resultado mais significante foi observado em leite cru e pasteurizado, com redução, respectivamente de; 0,9 e 1,3 ciclos logarítmicos. A liberação da nisina do filme foi avaliada em forma de precipitado; sendo favorecido em baixo pH e alta temperatura.

Em estudo realizado por Coma et al. (2001), utilizando-se adição de nisina em filmes celulósicos, constataram que, este filme antimicrobiano inibiu o crescimento de microrganismos Gram-positivos e em pesquisa feita por Ko et al. (2001) também registraram atividade antimicrobiana de nisina adicionada a filmes à base de proteína de soro de leite, que aumentou com a elevação da concentração de nisina e com a redução do pH; o inverso que ocorreu nesta pesquisa que, com o aumento da concentração de nisina, houve diminuição da eficiência.

.

6 CONCLUSÃO

- Observou-se alta contagem de aeróbios mesófilos em leite cru refrigerado na maioria das indústrias analisadas;
- Os microrganismos mais isolados do leite cru refrigerado de sete indústrias do Estado de Goiás foram microrganismos Gram-positivos, *(Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp.);
- O leite UAT produzido em sete indústrias do Estado de Goiás estava em conformidade com a legislação nacional;
- Nas contagens de microrganismos termorresistentes encontrou-se alta percentagem de contaminação por esporos;
- Apenas dois (6,45%), dos 31 isolados de bastonetes Gram-positivos foram *B. sporothermodurans* (BSP) pela identificação bioquímica;
- A nisina apresentou eficiência na inibição do BSP em todas as concentrações testadas, mas sem diferença estatística significativa;
- O filme incorporado com nisina não apresentou eficácia no controle do *B. sporothermodurans* - BSP em meio BHI.

.

7 SUGESTÕES

Como sugestão para aprimoramento desta pesquisa desenvolvida, alguns pontos podem ser observados:

- ✓ Isolamento de microrganismos termorresistentes visando percentagem maior de *B. sporothermodurans* seguindo propostas de suplemento do meio BHI com vitamina B12 e/ou esculina;
- ✓ A fim de uma identificação mais apurada, utilizar métodos de identificação por biologia molecular;
- ✓ Realizar testes de proteólise e lipólise dos microrganismos isolados, tanto de leite cru, como em leite UHT;
- ✓ Para confecção dos filmes incorporados com nisina, realizar testes em meio sólido e líquido, com concentrações maiores de nisina, como 20, 30, 40 e 50%;
- ✓ Para os filmes já produzidos, realizar testes em leite e/ou derivados, os quais foram relatados contaminação por *B. sporothermodurans*, a eficiência na contagem deste microrganismo ao longo do tempo, além de observar se há alguma deterioração do(s) mesmo(s);
- ✓ Alterar metodologia de incorporação da nisina ao filme de acetato de celulose;
- ✓ Testar outro agente antimicrobiano na inibição de *B. sporothermodurans*.

.

APÊNDICES

Apêndices 1. Tabelas de análise estatística.

Apêndice 1.1. Resumo da análise de variância da atividade de nisina contra BSP.

Fonte de variação	**Grau de liberdade (G.L)**	**Quadrado Médio**	**Valor de F**
		Solução de nisina	
Papel-filtro	5	1,79	40,53
Resíduo	12	0,04	
CV (%)		21,29	

Apêndice 1.2. Resumo da análise de variância da ação do filme incorporado com nisina em meio sólido.

Fonte de variação	**Grau de liberdade (G.L)**	**Quadrado Médio**	**Valor de F**
		Solução de nisina	
Filme	5	109,46	1876,56
Resíduo	12	0,05	
CV (%)		3,09	

.

Apêndice 1.3. Resumo da análise de variância do crescimento do *Bacillus sporothermodurans* em meio líquido (fase *log*).

Fonte de variação	**Grau de liberdade (G.L)**	**Quadrado Médio**	**Valor de F**
		Solução de nisina	
Crescimento BSP	4	5,39	2,02
Resíduo	100	2,67	
CV (%)		85,18	

Apêndice 1.4. Resumo da análise de variância do crescimento do *Bacillus sporothermodurans* em meio líquido (média da velocidade μ).

Fonte de variação	**Grau de liberdade (G.L)**	**Quadrado Médio**	**Valor de F**
		Solução de nisina	
Crescimento BSP	4	0,579	75,55
Resíduo	10	0,007	
CV (%)		5,895	

.

Apêndices 2 . Fotos do *Bacillus sporothermodurans*.

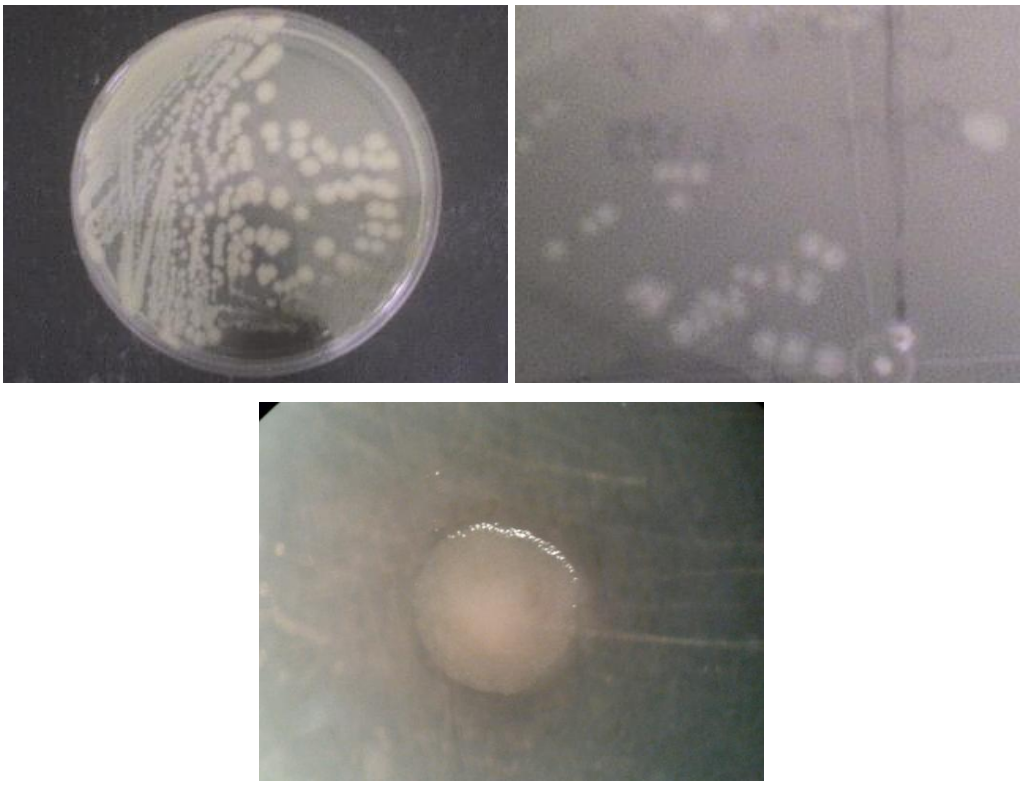


Foto 2.1. Crescimento de colônias de *B. sporothermodurans* (aspecto macroscópico).

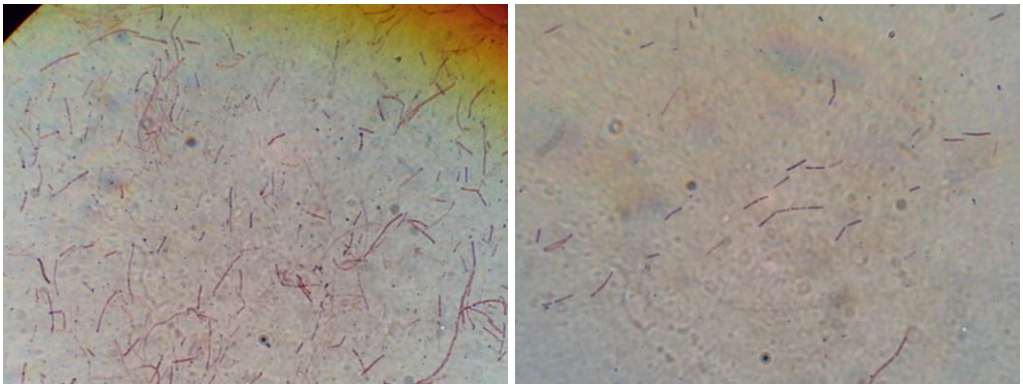


Foto 2.2. Colônias de *B. sporothermodurans* em forma de bastonetes, coloração Gram-positivo (aspecto microscópico).

.

Apêndices 3. Figuras de crescimento e regressão linear aplicada aos tratamentos com e sem filme antimicrobiano (fase *log*).

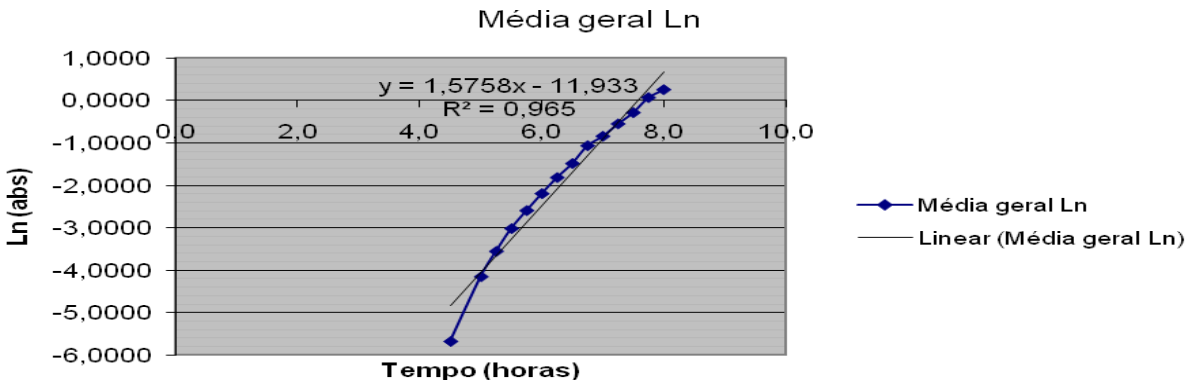


Figura 3.1. Crescimento de *B. sporothermodurans* sem filme.

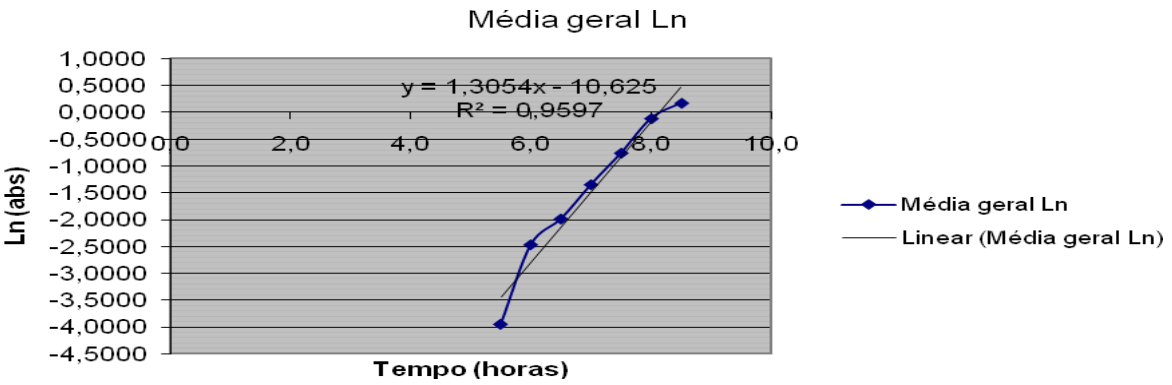


Figura 3.2. Crescimento de *B. sporothermodurans* com filme controle.

.

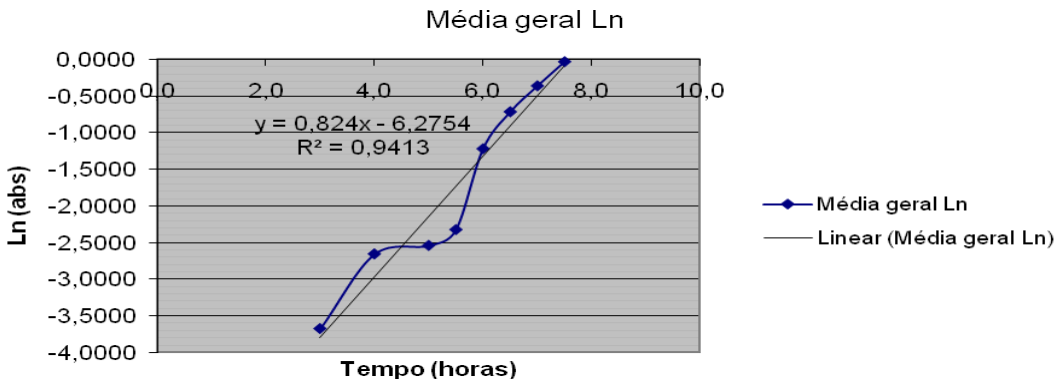


Figura 3.3. Crescimento de *B. sporothermodurans* com filme incorporado com nisina (1:1).

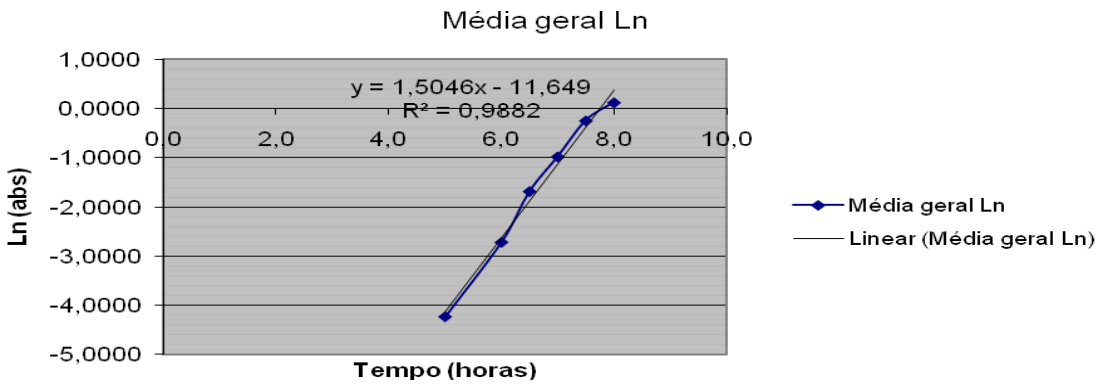


Figura 3.4. Crescimento de *B. sporothermodurans* com filme incorporado com nisina (1:2).

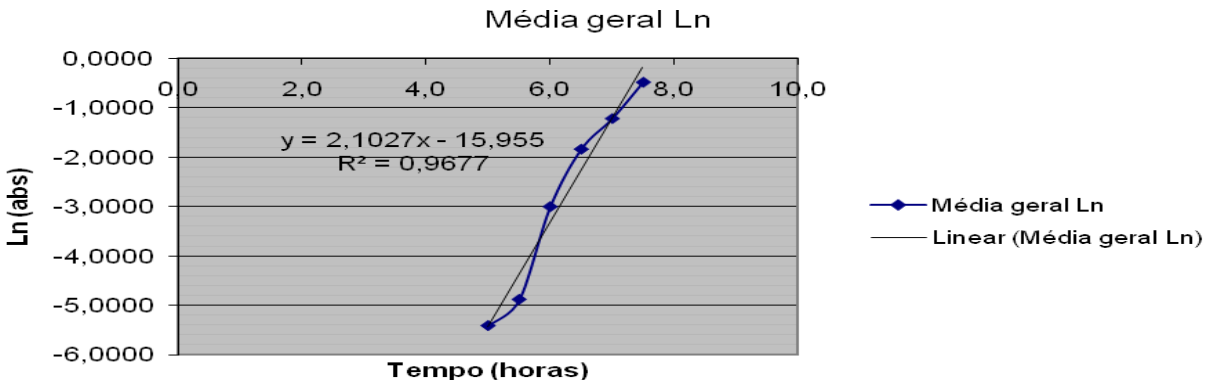


Figura 3.5. Crescimento de *B. sporothermodurans* com filme incorporado com nisina (1:4).

.

REFERÊNCIAS

ABLV – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO LEITE LONGA VIDA. Disponível em: <http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida>, Acesso em: 03 set 2008.

ALMEIDA, A. A. P.; FILHO, J. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v.48, n.287, p.36- 40, 1993.

ALVIM, R.S. **Impactos da crise mundial no mercado de lácteos**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). Disponível em: <www.cna.org.br>, Acesso em: 16 set. 2009.

ANDERSON, J. B.; SHUSTER, T. A.; HANSEN, K. E.; LEVY, A. S.; VOLK, A. A camera's view of consumer food-handling behaviors. **Journal of the American Dietetic Association**, v.104, n.2, p.186-191, 2004.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v.3, p. 113-126, 2002.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1 ed., Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora Ltda, 2003, p. 105-115.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. L. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Saúde Pública**, v.30, n.6, p.549-552, 1996.

BARBANO, D. M. Raw milk quality: Milk quality improvement in the United States. **The Australian Journal Dairy Technology**, v.47, p.89–90, 1992.

.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.15-19, 2006.

BARROS, V. R. M.; PANETTA, J. C.; TELLES RAMOS, E. O.; VILLAREAL, L. Y. B.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Isolamento e identificação de Bacillus spp. de leite UHT: detecção de toxina. **Higiene Alimentar**, v.20, n.142, p.72-78, 2006.

BARROW, G. L.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 331p.

BELMONTE, E. A.; LAGO, N. C. M. R. Pesquisa de microrganismos indicadores em leite pasteurizado integral comercializado nas cidades de Ribeirão Preto e Sertãozinho, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Rio Grande do Sul. **Anais...** Passo Fundo: Sociedade Brasileira de Qualidade do Leite, 2004. 1 CD-ROM.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIAKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

Bergeys' manual determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994. 787p.

BONFOH, B.; WASEM, A.; TRAORE, A. N.; FANE, A.; SPILLMANN, H.; SIMBE, C. F.; ALFAROUKH, I. O.; NICOLET, J.; FARAH, Z.; ZINSSTAG, J. Microbiological quality of cow's milktank on at different intervals from the udder to the selling point in Barnako (Mali). **Food Control**, v.14, p.495-500, 2003.

BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: Looking to the future. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1–11, 2001.

BOOR, K. J.; BROWN, D. P.; MURPHY, S. C.; KOZLOWSKI, S. M.; BANDLER, D. K. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1743-1748, 1998.

BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A.; BOTHWELL, M. K.; McGuire, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: *in vitro* and *in vivo* evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v.25, p.81-90, 2002.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **The microbiology of Milk**. 2 ed. London: UK: Elsevier Science Publishers, 1990. p.163-208.

BRASIL, Decreto-Lei no 30.691, de 29 de março de 1952. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União, Rio de Janeiro, p.10.785, 07 jul. 1952.

.

BRASIL. Instrução Normativa n. 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.14, 18 set. 2003. Seção 1.

BRASIL. Portaria n. 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos (anexo)... **Diário Oficial da União**, Brasília, p.11937, 17 ago. 1993. Seção 1.

BRASIL. Portaria n. 29, de 22 de janeiro de 1996. Aprova a extensão de uso da NISINA com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5mg/kg. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. , 22 jan. 1996a.

BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.3977, 11 mar. 1996b. Seção 1.

BRASIL. Portaria n° 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1997.

BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal** – RIISPOA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 1980. 116p.

BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Industrial application of an antilisterial strain of Lactobacillus sakei as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.66, p. 191–196, 2001.

BRODY, A. L.; STRUPINSKY, E. R.; KLINE, L. R. **Active packaging for food applications**. Boca Ratón: CRC Press, 2001.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; MANSUR, J. R. G.; NEVES, R. B. S. Parameters of microbiological quality of raw milk and water in dairy farms in Goiás state - Brazil. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, São Paulo. **Anais...** Ribeirão Preto: CPQLCM, 2002. 1 CD-ROM.

BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIAN, R. L. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT integral e desnatado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.3, p.408-411, 2005.

.

CARLOS, V. S.; OSCAR, R. S.; IRMA, Q. R. E. Occurrence of Listeria species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, v.18, p.177-181, 2001.

CARVALHO, G. R.; OLIVEIRA, A. F. O setor lácteo em perspectiva. Boletim **de Conjuntura Agropecuária**. Campinas: Embrapa – Monitoramento por Satélite, setembro de 2006, 23 p.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Diagnosis and Management of Foodborne Illness**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/>, Acesso em: 29 set. 2009.

CHAMBERS, J. V. The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2002, p. 39-90.

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

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

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v.21, p.535-541, 2004.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, L. M. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

COELHO, P. S.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V.; SIQUEIRA, A. P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.2, p.12-17, 2001.

COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; DESCHAMPS, A.; PICHAVANT, F.H. Antimicrobial edible packaging base on celulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.470-475, 2001.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additives for Polymers**, v.8, p.6-10, 2001.

COTTON, L. N.; WHITE, C. H. Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica and Salmonella in dairy plants environments. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.1, p.51-57, 1992.

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

.

CRIELLY, E. M., LOGAN, N. A., ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**., v.77, p.256-263, 1994.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotróficas. **Indústria de laticínios**. Jul/ago, p. 71-73, 2000.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de Alimentos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 114-119, 2003

DE MARTINIS, E. C. P.; PÚBLIO, M. R. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/producao>, Acesso em: 15 set. 2009.
ENDO, E.; SOARES, N. F. F.; SANTOS, D. A. A.; BORGES, S. V.; FONTES, E. A. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Uso de filmes ativos na conservação de batata minimamente processada. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.2, p.349-360, 2008.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination site in the production line of pasteurized milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v.8, p.829- 834, 1998.

ENTICOTT, G. Risking the rural: nature, morality and the comsumption of unpasteurised milk. **Journal of Rural Studies**, v.19, p.411-424, 2003.

FANG, T. J.; CHEN, CHUN-YUAN, CHEN, H. H. L. Inhibition of Staphylococcus aureus and Bacillus cereus on a vegetarian food treated with nisin combined with either potassium sorbate or sodium benzoate. **Journal of Food Safety**, v.17, n.2, p.69-87, 1997.

FIORENTINI, A. M.; ERNANI, S. S.; PORTO, A. C. S.; JACIARA, Z. M. AND FRANCO, B. D. G. M. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-lie of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.42-46, 2001.

FOX, P. F. Heat-induced changes in milk proceding coagulation. **Journal Dairy Science**, v. 64, p. 2127-2137, 1981.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006. 196p.

.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; GELLI, D. Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M.; BIER, J. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker: New York, 2003, p.733-743.

FRENZEN, P. D. Deaths due to unknown foodborne agents. **Emerging Infectious Diseases**,
v.10, n.9, p.1536-1543, 2004.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LUCAS-LÓPEZ, R.; BEN-OMAR, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 261-270, 1997.

GOMES, S.T. **Efeitos da Globalização na Produção de Leite no Brasil**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1999. 15p.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. **Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 1987.

GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; WEST, I. G.; MUIR, D. D. The effect extend low - temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. **Food Microbiology,** v. 5, p. 75-87, 1988.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.2, p.245-250, 2005.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, n.2, p.106-110, 2005.

GUILLAUME-GENTIL, O.; SCHELDEMAN, P.; MARUGG, J.; HERMAN, L.; JOOSTEN, H.; HEYNDRICKX, M. Genetic heterogeneity in Bacillus sporothermodurans as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic PCR fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4216–4224, 2002.

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

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**, volume I. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.

HAN, J. H. Antimicrobial Food Packaging. **Food Technology**, v.54, n.3, p.56-65, 2000.

.

HAN, J. H. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In: GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**, Boca Ratón, FL, CRC Press, 2002. p.485-499.

HAN, J. H.; FLOROS, J. D. Modelling the growth inhibition kinetics of Baker's yeast by potassium sorbate using statistical approaches. **Journal of Food Science**, v.63, p.12-14, 1998.

HAREL, Z.; RIGGS, S.; VAZ, R.; WHITE, L.; MENZIES, G. Adolescents and calcium: What they do and do not know and how much they consume. **Journal Adolescents Health**, v.22, p.225-228, 1998.

HELANDER, I.M., SANDHOLM, T.M. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v.60, n.2-3, p.153-161, 2000.

HOTT, M.C.; CARVALHO, G.R. **Análise espacial da concentração da produção de leite no Brasil e potencialidades geotecnológicas para o setor**. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Florianópolis, Brasil, 21-26 abril 2007, INPE, p. 2729-2736.

HUEMER, I. A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, W. J.; LANGEVELD, P. M. Thermal death kinetics of spores of Bacillus sporothermodurans isolated from UHT milk. **International Dairy Journal**, v.8, p.851-855, 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>, Acesso em: 15 set. 2009.

ITURRINO, R.P.S., NADER FILHO, A., DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, v.10, p.25-27, 1996.

JACKMAN, L. A.; MILLANE, S. S.; MARTIN, B. R. Calcium retention in relation to calcium intake and postmenarcheal age in adolescent females. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 66, p. 327-333, 1997.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. Gaithersburg: ASPEN Publishers., 2005. 854p.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, p.2157-2162, 2001.

JAYARAO, B.M.; WANG, L. A study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2620-2624, 1999.

JOERGER, R. D. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. **Packaging Technology and Science**, v.20, n.4, p.231-273, 2007.

JONES, T. F.; GERBER, D. E. Perceived etiology of foodborne illness among public health personnel. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.5, p.904-905, 2001

.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p.1205–1213, 1998.

KLIJN, N., HERMAN, L., LANGEVELD, L., VAEREWIJCK, M., WAGENDORP, A.A., HUEMER, I., WEERKAMP, A.H. Genotypical and phenotypical characterization os Bacillus sporothermodurans strains, surviving UHT sterilisation. **International Dairy Journal**, v.7, p. 421-428, 1997.

KO, S.; JANES, M.E.; HETTIARACHCHY, N.S.; JOHNSON, M.G. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 7, p. 1006-1011, 2001.
KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS, I. S.; DAVIES, E. A.; DELVES-BROUGHTON, J.; ADAMS, M. R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal Food Science and Technology**, v.34, p.81-85, 1999.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de Staphylococcus sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LIMJAROEN, P.; RYSER, E.; LOCKHART, H.; HARTE, B. Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. **Journal of Plastic & Shee**ting, v.19, p.95-109, 2003.

LIU, W.; HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by Lactococcus lactis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.8, p.2551-2558, 1990.

LÓPEZ-MENDOZA, M. C.; RUIZ, P.; MATA, C. M. Combined effects of nisin, lactic acid and modified atmosphere packaging on the survival of Listeria monocytogenes in raw ground pork. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, n.5, p.562-566, 2007.

LOURENÇO, L. F. H.; SILVA, M. S. S. Análises físico-química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza**. Livro de Resumos...** Fortaleza: CBCTA, 2000. v.1, p. 3.153.

LUES, J. F. R.; VENTER, P.; WESTHUIZEN, H. V. Enumeration of potencial microbiological hazard in milk from a marginal urban settlement in central South Africa. **Food Microbiology**, v.20, p.321-326, 2003.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M.; BOOR, K. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, n.83, p.264–274, 2000.

.

MANSOUR, M.; LINDER, M.; MILLIÈRE, J.-B., LEFEBVRE, G. Combined effectes of nisin, lactic acid and potassium sorbate on Bacillus licheniformis spores in milk. **Le Lait**, v.7, p.117-128, 1998.

MARTÍNEZ, B., BRAVO, D., RODRIGUEZ, A. Consequences of the development of nisin-resistant Listeria monocytogenes in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2383–2388, 2005.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; AVIDES, M. C.; VICENTE, A. A. Shelf Life Extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.3, p.1884-1891, 2010.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of proteolytic psychrotrophic sporeforming bacteria from milk. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 49, p.695-699, 1996.

MAURIELLO, G., DE LUCA, E., LA STORIA, A., VILLANI, F., ERCOLINI, D. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. **Letters in Applied** Microbiology, v.41, p.464–469, 2005.

McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.285-308, 2001.

MEIRELES, A. J. **Planejamento, qualidade e globalização na indústria de laticínios**. São Paulo: Editores Associados, 2000.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de** Staphylococcus sp. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; LIMA, D. V.; PIRES, A. C. S. Avaliação da eficiência de filme antimicrobiano incorporado com nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus* sp. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n.1, p.91-95, 2006.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, n.303, p.921-938, 2005.

MELO, N. R.; WURLITZER, N. J.; BASTOS, M. S. R.; SOARES, N. F.; MACEDO, V. F. Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes incorporados com lactato de sódio em salchichas embaladas a vácuo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre**. Livro de Resumos...** Porto Alegre: CBCTA, 2002. v.1, p. 3.153.

MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**, v.13, n.66/67, p.122-126, 1999.

.

MILKNET. Industriais de diversos países visitam linha de produção do novo leite UHT da Shefa. Disponível em:< http://www.milknet.com.br/>, Acesso em: 06 out. 2009.

MILKPOINT – REDE AGRIPOINT. IN 51 e uma história de sucesso. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br>, Acesso em: 04 set. 2008.

MILKPOINT – REDE AGRIPOINT. GO: produção deve recuar 4% este ano, aponta Faeg. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br>, Acesso em: 17 set. 2009.

MONTANARI, G.; BORSARI, A.; CHIAVARI, C.; FERRI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L. Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.4, p.802-809, 2004.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J. L. E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Revista Fazer Melhor**, v.19, p.72-75, set/out. 2002.

MOURA, C. J.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M.; ROSSI, D. A.; CARVALHO, E. P.; PINTO, S. M. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com Pseudomonas fluorescens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, n.308, p.3-8, 1999.

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

MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **The Australian Journal Dairy Technology**, v.39, p.7–16, 1984.

MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, p. 606-611, 2000.

NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.471-478, 2008.

NISSEN, H.; HOLO, H.; AXELSSON, L.; BLOM, H. Characterization and growth of Bacillus spp. in heat-treated cream with and without nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.1, p.78-87, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. L. V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. Brazilian Journal of Food Technology, v.7, p.161-165, 2004.

PADGETT, T.; HAN, L. Y.; DAWSON, P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1330-1335, 1998.

.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E. E PRIEST, F. G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n.3, p.759-764, 1996.

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

PIRTTIJÄRVI, T. S. M.; WAHLSTRÖM, G.; RAINEY F. A.; SARIS, P. E. J.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.3, p. 107-114, 2001.

POIATTI, M. L.; PARO, F. M.; SCHOCKEN, P. F. L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Características microbiológicas do leite tipo B "in natura" e pasteurizado em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 10., 1999, Salvador. **Livro de Resumos...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.381.

POL, I. E.; SMID, E. J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.3, p.166-170, 1999.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; POLÔNIO, A. L. C.; HONAGA, M. Y. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN51 - MARA. Parte 2: leite individual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Rio Grande do Sul. **Anais...** Passo Fundo: SBQL, 2004. 1 CD-ROM.

PRATA, L.F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Higiene Alimentar**, v.12, p.10-15, 1997.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London:Mosby, 1999. 648p.

QUINTANA, R.C.; CARNEIRO, R.C. Avaliação do leite in natura comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, Go. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.3, p.194-198, 2006.

QUINTAVALLA, S.; VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**, v.62, p.373-380, 2002.

RAHEEM, D.; SARIS, P. E. J. Inhibition of toxicogenic *Bacillus licheniformis* 553/1 in Nigerian Wara soft cheese by nisin-producing *Lactococcus lactis* LAC309. **International Journal of Food Science & Technology**, v.44, n.2, p.363-368, 2009.

REZENDE, N. C. M.; ROSSI Jr., O. D.; AMARAL, L. A. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, p.162-166, 2000.

.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática:** roteiro e manual – bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu, 1998. 112p.

ROSSI JÚNIOR, O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; BÜRGUER, M.V.; CARDOZO, M.V.; CORTEZ, A.L.L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.27-32, 2006.

RODRÍGUEZ, E.; TOMILLO, J.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, n.3, p. 389-395, 1997.

RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v. 8, p. 7-9, 1999.

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

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. Dairy Science**, v.86, p.2491–2503, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v.19, n.1, p.1215, 2003.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, p.1237-1245, 2009.

SCANNELL, A.G.M.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MARX, S.; HARTMEIER, W.; ARENDT, E.K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and Nisaplin®. **Journal of Food Microbiology**, v.60, p.241-249, 2000.

SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; FOSTER, S.; HEYNDRICKX, M. Bacillus sporothermodurans and other highly heat-resistant spore formers in milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.542-555, 2006.

SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; GORIS, J.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Polymerase chain reaction identification of Bacillus sporothermodurans from dairy sources. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.983–991, 2002.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of**
Food Microbiology, v.78, p.3-17, 2002.

.

SEBTI, I.; COMA, V. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. **Carbohydrate polymers**, v. 49, n. 2, p. 139-144, 2002.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, Muenchen, v.49, p.432-437, 1994.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing.
International Journal of Food Microbiology, v.81, p.241-248, 2001.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT**: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação. 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C.; NADRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel, **Revista Brasileira de Plantas Médicas**, v.6, n.1, p.63-70, 2003.

SILVA, W. P., DESTRO, M. T., LANDGRAF, M., FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian Dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.103-106, 2000.

SILVA, S.; PETTERSON, B.; DE MURO, M.A.; PRIEST, F.G. A DNA probe for the detection and identification of Bacillus sporothermodurans using the 16S-23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of Bacillus which form highly heat resistant spores. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, p.398–407, 1998.

SILVEIRA, M. F. A. **Filme antimicrobiano de acetato de celulose incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. 2005. 64 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SMILTWELL, N.; KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bactéria in pasteurized Milk: problems with shelf life. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.28-31, 1995.

SOARES, N. F. F. **Bitterness reduction in citrus juice though naringinase immobilized into polymer film**. 1998. 130f. Ph. D. Dissertation – Cornell Univertsity, New York, 1998.

SOARES, N. F. F.; RUTISHAUSER, D. M.; MELO, N.; CRUZ, R. S.; ANDRADE, N. J. Inhibition of microbial growth in Bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**, v.15, p.129-132, 2002.

.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUZA, C. P. Bacteriocins: molecules of fundamental impacto n the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.4, p.559-566, 2005.

SPREER, E.; QUEVEDO, O. T. D. **Lactologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 1996. 623p.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-37, 1997.

TEEGARDEN, D.; WEATER, C. M. Calcium supplementation increases bone density in adolescent girls. **Nutrition Reviews**, v.52, p.171-173, 1997.

TEEGARDEN, D.; LYLE, R. M.; PROULX, W. R.; JOHNSTON, C. C.; WEAVER, C. M. Previous milk consumption is associated with greater bone density in young women. **The American Journal Clinical Nutritional**, v.69, p.1014-1017, 1999.

TETRAPAK. Equipamentos para produtos lácteos - Ultrafresh. Disponível em: <http://www.tetrapak.com.br/ >, Acesso em: 06 out. 2009.

TKAEZ, M.; FEDALTO, L. M.; PEDRASSANI, D.; THIEM, E. M. B. Níveis microbiológicos e físico-químicos do leite in natura de produtores do estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Rio Grande do Sul. **Anais...** Passo Fundo: SBQL, 2004. 1 CD-ROM.

TOLEDO, M. M. **Crescimento de** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* **NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

TU, L.; MUSTAPHA, A. Reduction of Brochothrix thermosphacta and Salmonella Serotype Typhimurium on Vacuum-Packaged Fresh Beef Treated with Nisin and Nisin Combined with EDTA. **Journal of Food Science**, v.67, n.1, p.302-306, 2002.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTIESSER, D. F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 3. ed. Washington: American Public Health Association, 2000, 1218 p.

VAEREWIJCK, M. J. M.; DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHELDEMAN, P.; HOSTE, B.; HEYNDRICKX, M. Occurrence of Bacillus sporothermodurans and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.1074–1084, 2001.

VIANA, L. R.; HENZEL, A.; SPRICIGO, D. A.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; VARGAS, A. C. Qualidade do leite in natura recebido pela usina escola de laticínios da UFSM. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Rio Grande do Sul. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.

.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI-JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.396-400, 2005.

VILLADIEGO, A. M. D. **Desenvolvimento de revestimento comestível antimicrobiano a base de amido de inhame com quitosana na conservação de cenoura minimamente processada**. 2004. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

WALKER, S. J. Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 41, p. 91-92, 1988.

WHER, M. **Standard Methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association Publication (APHA), p.59-83, 2004.

WESTHOFF, D.C., DOUGHERTY, S.L. Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk**. Journal of Dairy Science**, v.64, p.572-578, 1981.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <www.who.int/>, Acesso em: set. 2009a.

WHO – World Health Organization. Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível em: <www.who.int/>, Acesso em: set. 2009b.

WURLITZER, N. J. **Desenvolvimento e avaliação de propriedades físicas e antimicrobianas de filmes de poli (cloreto de vinilideno) incorporados com triclosan**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F. Avaliação e otimização da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans*. Evaluation of methodology to quantify *Bacillus sporothermodurans***. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"., Dairy Journal of "Candido Tostes"Institute. Anais do XVI Congresso Nacional de Laticínios,** v. 54, n. 309, p.134-140, 1999.

ZACARCHENCO, P. B.; LEITÃO, M. F. F.; DESTRO, M. T.; ANDRIGHETO, C. Ocorrência de Bacillus sporothermodurans em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.51-57, 2000.

ZAPICO, P.; PAZ, M.; MEDINA, M; NUÑEZ, M. The effect of homogenization of whole Milk, skim Milk and Milk fato on nisin activity against *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.151-157, 1999.

.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo