

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ATIVAÇÃO DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE NA CONSERVAÇÃO DO
LEITE CRU PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO**

LEANDRO FRAGOSO LINS

**RECIFE - PE
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ATIVAÇÃO DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE NA CONSERVAÇÃO DO
LEITE CRU PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO**

LEANDRO FRAGOSO LINS

**RECIFE – PE
2013**

LEANDRO FRAGOSO LINS

**ATIVACÃO DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE NA CONSERVAÇÃO DO
LEITE CRU PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa – Orientador

Profa. Dra. Ângela Maria Vieira Batista – Co-orientadora

Prof. Dr. José do Egito de Paiva – Co-orientador

**RECIFE - PE
2013**

Ficha catalográfica

L759a Lins, Leandro Fragoso
Ativação do sistema lactoperoxidase na conservação do
leite cru para fabricação de queijo de coalho / Leandro
Fragoso Lins. – Recife, 2013.
93 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia,
Recife, 2013.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Lactoperoxidase 2. Qualidade do leite 3. Queijo
4. Pasteurização I. Barbosa, Severino Benone Paes,
orientador II. Título

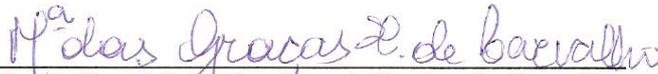
CDD 636

LEANDRO FRAGOSO LINS

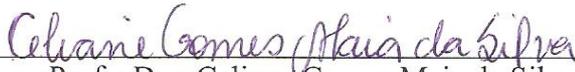
**ATIVACÃO DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE NA CONSERVAÇÃO DO
LEITE CRU PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO**

Dissertação defendida e aprovada pela Comissão Examinadora, 30 de outubro de 2013.

Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho
Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural



Prof. Dra. Celiane Gomes Maia da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Ciências Domésticas



Prof. Dr. José do Egito de Paiva
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Tecnologia Rural



Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Zootecnia
Presidente

**RECIFE - PE
2013**

A minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

*Meus sinceros e profundos agradecimentos à
TODOS que fizeram parte desta etapa da
minha vida.*

*Após tantos obstáculos eu conquistei
o almejado e dedico essa conquista a VOCÊS.*

*“Tudo é apenas detalhe
quando se tem um nascer do sol”*

(Leandro Fragoso)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Introdução geral..... | 08 |
| Capítulo I – Referencial Teórico – Sistema lactoperoxidase..... | 10 |
| 1. O sistema lactoperoxidase..... | 11 |
| 2. Componentes do sistema lactoperoxidase..... | 11 |
| 2.1. Enzima lactoperoxidase..... | 11 |
| 2.2. Íon tiocianato..... | 15 |
| 2.3. Peróxido de hidrogênio..... | 16 |
| 3. Mecanismo de ação..... | 17 |
| 4. Atividade antimicrobiana..... | 19 |
| 5. Aplicação do sistema lactoperoxidase..... | 24 |
| 5.1. Efeito do sistema na preservação do leite..... | 24 |
| 5.2. Efeito do sistema em produtos lácteos..... | 30 |
| 6. Aspectos toxicológicos do sistema lactoperoxidase..... | 34 |
| 7. Aspectos socioeconômicos da utilização do sistema lactoperoxidase..... | 37 |
| Referências..... | 41 |
| | |
| Capítulo II – Artigo | |
| Ativação do sistema lactoperoxidase na conservação do leite cru para fabricação de Queijo de Coalho..... | 55 |
| Resumo..... | 56 |
| Abstract..... | 57 |
| 1. Introdução..... | 58 |
| 2. Material e Métodos..... | 62 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 71 |
| 4. Conclusões..... | 86 |
| Referências..... | 87 |
| | |
| Apêndice | 94 |

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o leite produzido no Brasil é de baixa qualidade se comparado com outros países e, tendo em vista mudanças nesse cenário, foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, no qual o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou, em 2002, a Instrução Normativa Nº 51 (BRASIL, 2002) onde estabeleceu requisitos mínimos de qualidade para o leite cru, incluindo, pela primeira vez na legislação brasileira, limites máximos para contagens microbianas. E, recentemente, novas exigências em limites de contagem de células somáticas e contagem padrão em placas foram atualizadas pela Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2011).

Entretanto, a qualidade insatisfatória do leite ainda é um problema no país, em que fatores de ordem social, cultural e econômica estão envolvidos, afetando assim a qualidade do leite e dos produtos lácteos a serem processados. Como exemplo claro tem-se o Queijo de Coalho produzido na região Nordeste do país.

Sendo um dos queijos mais tradicionais na região há mais de 150 anos e, pela simplicidade de sua produção, é amplamente fabricado e consumido em todo o país. Porém, diversos estudos com Queijo de Coalho têm mostrado níveis de contaminação superiores ao permitido pela legislação vigente (Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996, do MAPA), classificando esses queijos como impróprios para o consumo humano. Esse fato ocorre, porque, apesar da legislação brasileira estabelecer que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização, a maior parte do Queijo de Coalho produzido no Nordeste é proveniente de fabricação artesanal elaborado com leite cru. A própria Legislação Estadual de Pernambuco, na Resolução Nº 002, da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (PERNAMBUCO, 1999), permite que o Queijo de Coalho seja produzido com leite *in natura* (cru).

A fabricação de queijos provenientes de leite sem pasteurização ou em condições artesanais é uma prática comum em muitos países do mundo, principalmente em países em desenvolvimento, os quais destinam uma elevada porcentagem da produção de leite para elaboração dos queijos e cuja qualidade microbiológica nunca

será superior ao leite de origem, o que se faz necessário identificar práticas para melhorar essa condição.

É nesse contexto que o sistema lactoperoxidase e sua ativação exógena no leite tem sido objeto de uma ampla investigação nos últimos 50 anos como um método de conservação complementar e alternativo à refrigeração do leite, sendo aprovado como método de conservação do leite cru pelo Codex Alimentarius (CAC, 1991). Com base em estudos (FAO/WHO, 2006), reconhece-se nesse método um importante potencial de utilização para manter a qualidade inicial da matéria-prima e permitir a fabricação de produtos lácteos de melhor qualidade.

Diante do exposto e pela ausência de estudos nas condições brasileiras para o uso do sistema lactoperoxidase em produtos lácteos, e especificamente, o Queijo de Coalho, é que se objetivou avaliar a adequação do leite cru preservado pelo sistema lactoperoxidase sob diferentes condições de conservação e armazenamento para fabricação do Queijo de Coalho.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

SISTEMA LACTOPEROXIDASE

1. O sistema lactoperoxidase

O sistema lactoperoxidase (LP) é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária e está presente em todos os mamíferos, incluindo o homem. É composto por três elementos básicos: a enzima lactoperoxidase (LP), uma proteína sintetizada na glândula mamária; o íon tiocianato (SCN^-), originado pelo metabolismo hepático; e as moléculas de oxigênio reativas, derivadas da atividade de leucócitos e de outras células (DE WIT; VAN HOOIJDONK, 1996; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000). O sistema LP consiste na adição de tiocianato de sódio (NaSCN) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para reativar a enzima LP, uma enzima que está naturalmente presente no leite. No estado natural, os fatores limitantes do sistema LP são os íons tiocianato e o oxigênio reativo, porque, apesar de serem encontrados invariavelmente no leite, suas concentrações dependem de muitos fatores relacionados ao animal, como a dieta, condições fisiológicas, manejo, entre outros (MATHUR; CHOPRA, 1995; PONCE et al., 1995; FONTEH et al., 2005).

Desde a década de 1920 já era observado que o leite fresco apresentava ação bactericida contra *Bacillus typhosa* e *B. paratyphosa*, e, Hanssen (1924) correlacionou esse efeito com a presença de enzimas oxidantes no leite. Wright e Tramer (1958) verificaram que a enzima LP estava envolvida na inibição de estreptococos lácticos utilizados como enzimas na fabricação de queijos. Portmann e Auclair (1959) notaram que, ao inativar a enzima LP, o efeito inibitório do leite desaparecia, e acrescentando lactoperoxidase pura era restabelecida a atividade inibitória.

Assim, o método do sistema LP tem sido objeto de ampla investigação ao longo dos últimos 50 anos.

2. Componentes do sistema lactoperoxidase

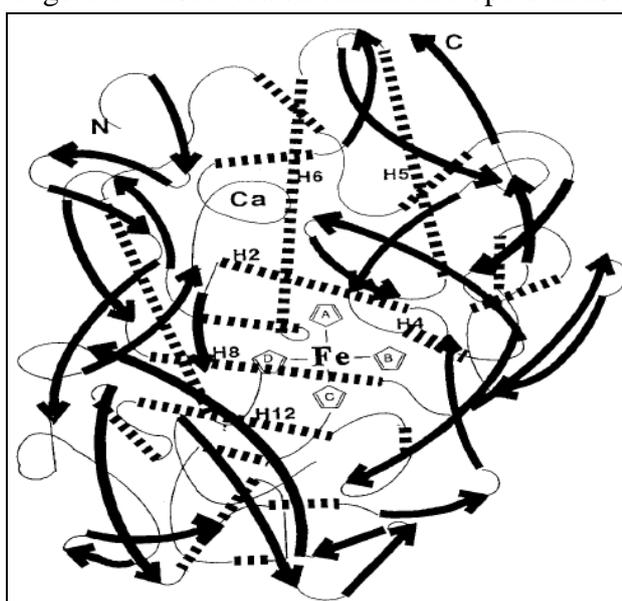
2.1. Enzima lactoperoxidase

A lactoperoxidase pertence à família das peroxidase (EC 1.11.1.7), um grande grupo de enzimas naturais encontradas em plantas e animais, incluindo todos os mamíferos e o homem (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). As peroxidases estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos, encontrando-se nas glândulas mamárias, salivares, lacrimais e da tireoide, bem como na mucosa intestinal e no muco cervical (SLOWEY et al., 1968; SCHINDLER et al., 1976; WOLFSON;

SUMMER, 1993; LINDEN; LORIENT, 1999). A peroxidase isolada a partir do leite, é dado o nome de lactoperoxidase (REITER; HAMULV, 1984). Lactoperoxidase juntamente com mieloperoxidase, peroxidase de eosinófilos e peroxidase da tireóide, constituem a superfamília II da peroxidase de mamíferos que se distingue da superfamília I da peroxidase, que são enzimas de plantas, fungos e bactérias (FURTMULLER et al., 2002).

A lactoperoxidase é uma enzima oxidoreductase secretada em todos os leites de mamíferos, e desempenha um papel importante na proteção da glândula mamária lactante e no trato intestinal de recém-nascidos contra microrganismos patogênicos (PRUITT; KAMAU, 1991; NAIDU, 2000). Esse envolvimento da LP na inibição do crescimento microbiano foi primeiro sugerido por Hanssen (1924). Entretanto, a lactoperoxidase foi purificada (EC 1.11.1.7.) por Theorell e Akesson em 1943. Considera-se uma glicoproteína com uma cadeia peptídica de 612 aminoácidos, com um peso molecular de 78 000 Daltons e tem um teor de 10% de carboidratos (ANGLADE; DUMAS, 1991; BJORCK, 1992; EKSTRAND, 1994; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000). A enzima contém um grupo hemo com uma molécula de ferro para cada mol da proteína, que forma seu centro catalítico, sendo uma proteína básica com um ponto isoelétrico de pH 9,6 (SIEVERS, 1979; TENUOVO, 1985), conforme Figura 1.

Figura 1 – Estrutura da enzima lactoperoxidase



Fonte: Tenuovo (1985)

No leite bovino, a LP é a segunda enzima mais abundante depois da xantina oxidase (PRUITT; KAMAU, 1991; DE WIT; VAN HOOYDONK, 1996). A sua concentração, no leite bovino, é de cerca de 2,0 a 35,0 mg/L com um valor médio de 14,8 mg/L (THEORELL; PEDERSEN, 1944; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000). E, segundo Reiter (1985a), constitui cerca de 1% da proteína do soro de leite.

Em termos de unidades de atividade enzimática UA/mL, varia muito entre as espécies, desde 0,14 até 4,45, e uma média de 1,4 UA/mL em vacas, porém a concentração mínima para a sua ação bactericida é de 0,02 UA/mL, o que garante que, sob qualquer condição do leite cru, há a concentração requerida (SEIFU et al., 2005). A máxima atividade da enzima no leite é alcançada quando as concentrações dos substratos (oxigênio reativo e os íons de tiocianato) estão entre 0,20-0,25 mmol/L, no qual concordam com o estabelecido pelo Codex Alimentarius (1991). No leite de vaca, Kern et al., (1962), Reiter (1985b) e, Kussendrager e Van Hooijdonk, (2000) estabeleceram que a atividade da LP depende do ciclo sexual, período de lactação, estação do ano, dieta e raça do animal. Em geral, a concentração da lactoperoxidase é baixa no colostro, alcança valores máximos aos 4-5 dias pós-parto, para diminuir rapidamente e estabilizar-se no resto do período de lactação (KORHONEN, 1980; REITER, 1985a).

A LP é instável ao calor, assim, a sua presença ou ausência no leite tem sido utilizada para caracterizar o tratamento térmico entre a pasteurização e a ultra elevada temperatura (FOX; MC SWEENEY, 1998). A lactoperoxidase é apenas parcialmente inativada pelo curto tempo de pasteurização a 74°C, deixando uma atividade suficiente para catalisar as reações entre o tiocianato e o peróxido de hidrogênio (WOLFSON; SUMNER, 1993). Segundo Barrett et al., (1999), a pasteurização a 68°C não afeta a LP, a 73°C, durante 15 segundos, reduz a 70%, porém a 80°C, durante 15 segundos, está completamente desativada, igual a temperaturas acima de 100°C. Ponce (2001) relatou uma queda de 85% da atividade da enzima, no leite pasteurizado, a 73°C durante 15 segundos. Uma pesquisa de Marks, Grandison e Lewis (2001) confirma o fato de que a pasteurização normal do leite não desativa a LP no leite. Eles relataram que, após a pasteurização do leite de vaca em 72°C, por 15 segundos, um sistema LP ativo foi

encontrado e com capacidade de manter a qualidade do leite inoculado com *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus thermophilus*.

A enzima resiste à acidez, até um pH igual a 3 (TRAMER; WRIGHT, 1958), e à ação proteolítica do suco gástrico (GOTHEFORS; MARKLUND, 1975; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000). Entretanto, a LP é inativada irreversivelmente por um excesso de peróxido de hidrogênio, ao destruir os radicais superóxido e hidroxila do grupo hemo (KOHLENER et al., 1986). Como também é inativada pela luz na presença de riboflavina e oxigênio (MARTIN-HERNÁNDEZ et al., 1990; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000) ou por excessivo crescimento de microrganismos (KIERMEIER; KAISER, 1960).

A atividade inibidora da lactoperoxidase pode ser revertida por meio da adição de compostos médios com grupos sulfidrilo (AUNE; THOMAS, 1977). Determina-se um limite de 0,02 UA/mL para a capacidade inibidora da lactoperoxidase na presença de tiocianato e do peróxido de hidrogênio (REITER, 1981). Para reverter essa capacidade inibidora, seria necessária uma atividade de catalase de 120 UA/mL não fisiológica (BJORCK, 1978).

Com relação ao significado biológico da LP, nota-se que ela participa do sistema de defesa natural do hospedeiro contra microrganismos invasores (REITER, 1985a). Já a sua função biológica essencial está associada à proteção da glândula mamária e do trato intestinal de recém-nascidos, contra os microrganismos patogênicos presentes no leite (SEIFU et al., 2005). Segundo Reiter e Hamulv (1984), Bjork (1992) e Tenuovo (2002), as células do tecido mamário não são afetadas pela oxidação dos produtos do íon tiocianato, sinalizando que o sistema LP é atóxico para as células humanas, uma vez que protege essas células dos danos do peróxido de hidrogênio e de outras espécies de oxigênio reativo.

Perraudin e Reiter (1998) relataram que o sistema LP atua como um antioxidante, protegendo, assim, as células de mamíferos contra as espécies altamente reativas de oxigênio. Além da sua ação antimicrobiana e a proteção das células animais contra os efeitos do peróxido, a degradação de vários carcinógenos também tem sido relatada (KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000).

2.2. Íon tiocianato

O íon tiocianato (SCN^-) está amplamente distribuído nos tecidos e fluidos corporais, incluindo as glândulas mamárias, salivares, da tireoide, no estômago (secretado pelas células parietais, igual ao ácido clorídrico), no rim e em fluidos biológicos, tais como o plasma ou o líquido cefalorraquidiano (REITER; HAMULV, 1984; KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000).

As fontes de tiocianato são os glucosinolatos e os glicosídeos cianogênicos. As espécies do gênero *Brassica* (família *Cruciferae*), como a couve-flor, repolho e nabos são ricas em glucosinolatos que formam tiocianato durante a sua hidrólise (WOOD, 1975; REITER; HARNULV, 1984; WOLFSON; SUMNER, 1993). Glicosídeos cianogênicos são encontrados em milho, cana de açúcar, ervilhas e feijões. Ao hidrolisar, formam o cianeto, o qual reage com grupos tiosulfato e produtos metabólicos de aminoácidos para se converter em tiocianato. Essa reação de desintoxicação é catalisada pela enzima rodanase que é encontrada no fígado, no rim e na tireoide (REITER; HAMULV, 1984).

A quantidade de íons tiocianato é muito variável. Tanto na saliva como no suco gástrico do ser humano se registram quantidades elevadas de tiocianato, de 50-300 ppm (50-300 mg/L), e 40-50 ppm (40-50 mg/L), respectivamente, e os níveis, no plasma humano, situam-se entre 2 e 3 mg/L (REITER; HARNULV, 1984; WOLFSON; SUMMER, 1993; NAIDU, 2000).

De acordo com Bjorck (1978), Reiter (1985) e Ponce (2001), os níveis de tiocianato, no leite bovino variam entre 0,02 e 0,6 mmol/L. Kusendrager e van Hooijdonk (2000) relatam que as concentrações de tiocianato no leite são reflexo das concentrações sanguíneas, variando com a raça, dieta, saúde do úbere e fatores fisiológicos. Níveis entre 1 e 15 ppm (1-15 mg/L) foram relatados em leite de países europeus (REITER; HAMULV, 1984). Davidson (1997) reportou que o leite de vaca fresco contém 1 a 10 mg de tiocianato por litro, o que nem sempre é suficiente para ativar o sistema de LP.

Segundo Reiter e Harnulv (1984), o excesso de tiocianato, no organismo, pode produzir o bócio ao interferir com o metabolismo do iodo. Entretanto, tanto a quantidade de leite ingerida como a concentração do tiocianato no leite não atingem os limites necessários para afetar a função da tireoide. Seriam necessárias doses de 400mg

de tiocianato para poder produzir alterações nessa função. Assim como necessitaria de quantidades acima de 20 ppm, no plasma humano, para interferir com o metabolismo do iodo (WILSON; MATTHEUS, 1966; IDF, 1988).

A oxidação do tiocianato forma também produtos intermediários (espécies reativas de oxigênio), porém estes são muito instáveis no leite, especialmente sob elevadas temperaturas. Desse modo, o tratamento térmico a 65°C garante que tais elementos não estejam presentes no leite no momento de seu consumo ou da produção de derivados lácteos (REITER; HAMULV, 1984; PONCE, 2007).

2.3. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante, com efeito bactericida e, normalmente, não é detectado no leite cru (PRUITT; KAMAU, 1991; FAO, 1999). Segundo Marshall et al. (1982) existem bactérias que produzem o peróxido de hidrogênio na saliva e no suco gástrico, mas é difícil verificar a sua presença devido a rápida absorção.

As fontes naturais de peróxido de hidrogênio são os leucócitos polimorfonucleares e o metabolismo das bactérias lácticas, Gram-positivas e catalase negativas, tais como os lactobacilos, lactococos e estreptococos que produzem, em condições aeróbicas, suficiente peróxido de hidrogênio para ativar o sistema LP (CARLSSON et al., 1983; WOLFSON; SUMNER, 1993; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000).

Para ativar o sistema LP, deve ser adicionado peróxido de hidrogênio exogenamente, em solução ou na forma sólida (MONNOM et al., 1989). O peróxido de hidrogênio também pode ser fornecido enzimaticamente por meio da ação de enzimas como a glicose oxidase ou a xantina oxidase (KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000).

O peróxido de hidrogênio é o único aditivo aprovado para preservação do leite na ausência de refrigeração, podendo ser adicionado a uma concentração de 100-800 ppm (100-800 mg/L) (FAO, 1957; IDF, 1988). Conforme Bjorck (1992), a ativação do sistema LP requer quantidades mínimas de peróxido de hidrogênio. O critério estabelecido pelo Codex Alimentarius (1991), para ativação exógena do sistema LP, é

pela adição de 8 mg/L de H₂O₂. Tal concentração é cem vezes menor que a utilizada para conservação do leite mediante o uso unicamente do H₂O₂ (500- 800 mg/L).

De acordo com Pérez (1987), o excesso de peróxido inibe a ação da enzima lactoperoxidase, razão pela qual, quando se adiciona água oxigenada no leite, em valores acima de 60 mmoles/L, a enzima se torna inativa.

O peróxido de hidrogênio é altamente tóxico para células de mamíferos. Entretanto, a baixas concentrações e na presença de LP e SCN⁻, as células de mamíferos estão protegidas contra essa toxicidade (PRUITT; KAMAU, 1991), uma vez que o H₂O₂ desaparece pela ação da enzima catalase, que o desdobra rapidamente em água (ARMENTEROS, 2003).

3. Mecanismo de ação do sistema

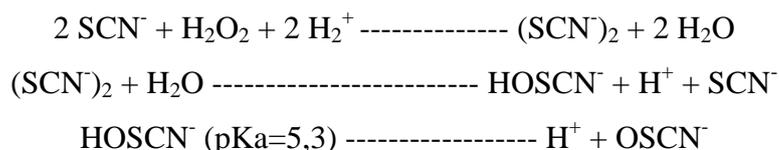
As reações de peroxidação do íon tiocianato são complexas e dependem de vários fatores, incluindo a concentração de peróxido de hidrogênio e a origem da fonte (endógena ou exógena). Entretanto, um primeiro passo é a redução do núcleo hemo da enzima e a formação de um radical livre de oxigênio. Na presença de suficiente composto tiocianato oxidado como doador de elétrons, se forma um componente I, o qual condiciona a ótima ativação da enzima (REITER; HARNULV, 1984; DE WIT; VAN HOOYDONK, 1996).

Thomas (1985) propôs um esquema de reação que se mantém até os dias atuais, indicando a possibilidade de duas vias diferentes de oxidação do íon tiocianato até hipotiocianato:

1- Nessa via, o SCN⁻ pode oxidar-se diretamente a hipotiocianato (OSCN⁻)

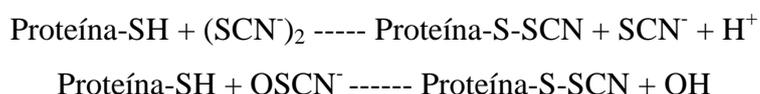


2- Nessa segunda via, a oxidação de SCN⁻, catalisada pela enzima LP, pode dar lugar a tiocianogênio (SCN⁻)₂, que rapidamente se hidrolisa e gera ácido hipotiocianoso (HOSCN) em equilíbrio ácido-base com o OSCN⁻ (pKa=5,3). A esse valor de pH existem quantidades equimolares dos dois compostos.



Em ambas, o metabólito principal e o que se forma em maior quantidade é o hipotiocianato (OSCN^-) (WOLFSON; SUMNER, 1993; KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). No entanto, o sistema da reação é complexo e o hipotiocianato pode não ser o primeiro produto libertado a partir do sítio de ativação da enzima. Outros intermediários de vida curta, que podem ser formados em quantidades variadas, dependendo das condições da reação, incluem tiocianogênio $(\text{SCN}^-)_2$, cianogênios tiocianato (NC-SCN), ácido cianosulfuroso (HO_2SCN) e ácido cianosulfúrico (HO_3SCN) (PRUITT; KAMAU, 1991).

Os produtos oxidados do tiocianato reagem rapidamente com os grupos sulfidrilo das proteínas para gerar sulfenil tiocianato (R-S-SCN), de modo que a ação catalítica da enzima LP incorpora tiocianato dentro das proteínas bacterianas. A reação de $(\text{SCN}^-)_2$ ou OSCN^- com proteínas oxida as proteínas sulfidrilas para derivados de tiocianato de sulfenilo (THOMAS; AUNE, 1978).



Derivados de tiocianato de sulfenilo podem sofrer outras modificações, incluindo a hidrólise reversível para originar os ácidos sulfênicos (THOMAS; AUNE, 1978).



A oxidação do grupo sulfidrilo (SH) de várias enzimas e de outras proteínas microbianas é considerada como a chave para a ação antimicrobiana do sistema LP (REITER; HARNULV, 1984).

4. Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana do sistema LP é atribuída a produtos intermediários da oxidação do tiocianato. Esses produtos são, essencialmente, o íon hipotiocianato (OSCN⁻) que se acumula durante a reação de oxidação do tiocianato catalizada pela lactoperoxidase (BJORCK; CLAEISSON, 1980; MARSHALL; REITER, 1980).

A atividade antimicrobiana do sistema LP tem sido demonstrada por diversos trabalhos (Quadro 1) contra uma vasta gama de microrganismos, incluindo bactérias, vírus HIV-1, bolores, leveduras, protozoários e micoplasma, assim como “culturas starter” não-patogênicas (fermentos, inóculos e culturas lácticas), bactérias deteriorantes, bem como organismos patogênicos que causam infecções gastrointestinais, em humanos, e infecções do úbere, em animais (KORHONEN, 1980; REITER; HARNULV, 1984; IDF, 1991; WOLFSON; SUMNER, 1993; STADHOUDERS; BEUMER, 1994; DE WIT; VAN HOOIJDONK, 1996; VAN HOOIJDONK; KUSSENDRAGER; STEIJNS, 2000; SEIFU; BUYS; DONKIN, 2005; ARMENTEROS et al., 2005; PONCE, 2010).

Quadro 1 – Atividade antimicrobiana do sistema lactoperoxidase contra diversos microrganismos

| Microrganismo | Efeito | Referências |
|---------------------------------|---|---|
| Bactérias Gram-Positivas | | |
| <i>Bacillus cereus</i> | Produção de colagenase | Tenovuo et al., (1985) |
| <i>Lactobacillus casei</i> | Inibição do crescimento | Iwamoto et al., (1972) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Bactericida e bacteriostático | Dennis e Ramet (1989); Seifu, Donkin e Buys (2004) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Absorção de aminoácido | Kamau et al., (1990a) |
| <i>Streptococcus cremoris</i> | Absorção de oxigênio | Modi et al., (1991) |
| <i>Streptococcus lactis</i> | Inibição do crescimento | Marshall e Reiter (1980) |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Transporte do açúcar | Mickelson (1977) |
| <i>Streptococcus mutans</i> | Absorção de glicose; Glicolisettransferase | Loimaranta, Tenovuo e Korhonen (1998); Korpela et al., (2002) |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | Produção de ácido | Carlsson, Iwami e Yamada (1983) |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | Bactericida | Courtois et al., (1995) |

Continuação

| Bactérias Gram-Negativas | | |
|---------------------------------|---|--|
| <i>Actinobacillus</i> | Bactericida | Ihalin et al., (1998) |
| <i>Brucella melitensis</i> | Bactericida | Seifu, Donkin e Buys (2004) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Bactericida | Beumer et al., (1985); Borch et al., (1989) |
| <i>Escherichia coli</i> | Bactericida; Inibição da desidrogenase | Shin et al., (2001); Dunkin e Buys (2004) |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | Bactericida | Ihalin et al., (2001) |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Bactericida | Shin et al., (2002) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Bactericida e bacteriostático | Reiter et al., (1976); Pitt, Harden e Hull (2000) |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Bactericida | Thalin et al., (2001) |
| <i>Prevotella loescheii</i> | Bactericida | Fadel e Courtois (2001) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bactericida | Reiter et al., (1976) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Bactericida | Bjorck et al., (1975) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Bactericida e bacteriostático | Farrag, ElGazzar e Marth (1992) |
| Fungos | | |
| <i>Candida albicans</i> | Perda de viabilidade | Lenander (1992) |
| <i>Rhodotorula rubra</i> | Bacteriostático | Popper e Knorr (1997) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Bacteriostático | Popper e Knorr (1997) |
| <i>Byssoschlamys fulva</i> | Bacteriostático | Popper e Knorr (1997) |
| <i>Aspergillus niger</i> | Bactericida | Jacob et al., (2000) |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Bactericida | Jacob et al., (2000) |
| Vírus | | |
| Polio and Vaccinia viruses | Viricida | Belding, Klebanoff e Ray (1970) |
| HIV-1 | Perda da replicação viral; Inibição da transcriptase reversa | Yamaguchi et al., (1993) |

Fonte: Elaborado pelo autor a partir de Seifu, Buys e Donkin (2005) e Ponce et al. (2005)

A expressão da atividade do sistema LP pode ser bacteriostática e/ou bactericida, o que dependerá da susceptibilidade dos microrganismos, do tipo de doador de elétrons nas proteínas da membrana, da temperatura e do pH (REITER; HARNULV, 1984; NAIDU, 2000).

A atividade antimicrobiana do sistema LP pode ocasionar lesões ou modificações nas diversas estruturas da célula microbiana (parede celular, membrana citoplasmática, sistema de transporte, enzimas glicolíticas, ácidos nucleicos) e, em consequência, ocasionar a morte ou a inibição do crescimento ou do metabolismo dos microrganismos afetados (CLAESSON, 1993; NAIDU, 2000). Segundo Farrag et al. (1992) e Pitt et al. (2000), o dano causado na estrutura das proteínas bacterianas, consequência da ação oxidativa do grupo sulfidrílo sobre a membrana citoplasmática, resulta na perda de íons de potássio, aminoácidos e polipeptídeos para o meio. Consequentemente, altera-se o consumo de glucose, aminoácidos e purinas, o que afeta a síntese de proteínas pelos bloqueios concomitantes das funções do DNA e RNA (REITER; HARNULV, 1984).

Diferentes grupos de bactérias mostram um grau variável de sensibilidade ao sistema LP. Nas bactérias Gram-negativas, catalase positivas como coliformes, pseudomonas e salmonelas, o sistema possui ação não somente inibidora como também bactericida, dependendo das condições do meio, como o pH, temperatura e tempo de incubação (REITER et al., 1976; BJORCK, 1978; WILKINS; BOARD, 1989; KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000). Conforme os mesmos autores, as bactérias Gram-positivas, catalase negativa, como *Streptococos*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são mais resistentes e, nesse caso, o sistema LP possui somente ação inibidora sobre seus crescimentos. Essa diferença de sensibilidade ao sistema LP pode provavelmente ser explicada pelas diferenças na estrutura da parede celular e suas propriedades, assim como pelos compostos inibidores gerados pelas mesmas (REITER; HAMULV, 1984; DE WIT; VAN HOOYDONK, 1996). A membrana interna das bactérias Gram-negativas parece ser mais danificada pelo tratamento do sistema LP que a de espécies Gram-positivas (MARSHALL; REITER, 1980).

A atividade antimicrobiana do sistema LP contra *E. coli* parece estar relacionada com a oxidação de sulfidríla bacteriana (THOMAS; AUNE, 1978). A oxidação de sulfidríla, para derivados de sulfenilo, inibe a respiração bacteriana. Porém, de acordo com Shin, Hayasawa e Lonnerdal (2001), o efeito inibitório do sistema LP, contra *E. coli*, está relacionado com a inibição de desidrogenases na cadeia respiratória da *E. coli*. A atividade antimicrobiana do sistema LP, contra *E. coli* 0157:H7, também foi relatada (HEUVELINK et al., 1998).

O sistema LP exerce ambas as atividades bacteriostática e bactericida contra as cepas de *Salmonella* (PURDY et al., 1983; WOLFSON; SUMNER, 1994). No estudo de Wolfson e Sumner (1994), a atividade bactericida foi dependente da permeabilidade da parede celular bacteriana e do nível de inóculo inicial. Níveis de inóculo de 10^2 UFC/mL foram eliminados aos 37°C, em oposição a atividade bacteriostática com níveis de inóculo 10^6 - 10^7 UFC/mL.

Campylobacter jejuni é a causa de enterite aguda no ser humano e no leite tem sido associada a vários surtos de *C. jejuni* (PRUITT; KAMAU, 1991). O efeito bactericida do sistema LP contra a *C. jejuni*, no leite, já foi avaliado positivamente por Beumer et al. (1985). Segundo os autores, o efeito bactericida do sistema LP, contra este microrganismo, é mais expressivo a temperaturas mais elevadas.

A inibição de *Bacillus cereus*, pelo sistema LP, foi relatada por Tenovuo, Makinen e Sievers (1985). A inibição do crescimento foi diretamente proporcional à quantidade de íons OSCN^- presentes. Essa inibição foi associada com a liberação extracelular reduzida da atividade de colagenase das células. Da mesma forma, Zajac, Bjorck e Classon (1981) testaram o efeito antibacteriano do sistema LP contra células vegetativas e esporos de quatro cepas diferentes de *Bacillus cereus* isolados a partir de leite de vaca. O efeito antibacteriano foi substancial contra as células vegetativas de todas as cepas testadas. No entanto, pouco efeito foi observado contra os esporos.

Staphylococcus aureus é um importante agente causador da mastite bovina e representa um problema de saúde pública, uma vez que esse patógeno pode ser eliminado no leite (HUNTER, 1984). Embora o *S. aureus* seja prontamente destruído pela pasteurização apropriada, enterotoxinas produzidas, por cepas desse patógeno, podem suportar a pasteurização e causar intoxicação alimentar, na ausência de células viáveis (SMITH; BUCHANAN; PALUMBO, 1983). O sistema LP é simultaneamente bactericida e bacteriostático, contra *S. aureus*, no leite (KAMAU; DOORES; PRUITT, 1990).

Listeria monocytogenes é um agente patogênico intracelular capaz de sobreviver e crescer dentro de fagócitos, uma característica associada com a virulência (WILDER; EDBERG, 1973). Infecções por *Listeria* podem causar septicemia, meningite e aborto, e os principais grupos de risco são recém-nascidos, mulheres grávidas e outros indivíduos imunocomprometidos (MARTH, 1988). O risco de

listeriose é ainda maior pela capacidade que a *L. monocytogenes* tem em crescer a temperaturas de refrigeração e pela sua resistência ao calor relativamente mais elevado em comparação com outras bactérias (DOYLE et al., 1987). O sistema LP é simultaneamente bactericida e bacteriostática contra *L. monocytogenes* (SIRAGUSA; JOHNSON, 1989; KAMAU; DOORES; PRUITT, 1990). O efeito bactericida depende da concentração inicial do inóculo, meio de cultura e temperatura de armazenamento (DENNIS; RAMET, 1989), e o efeito inibitório é inversamente proporcional à temperatura de incubação (DENNIS; RAMET, 1989).

O efeito inibitório do sistema LP, em *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e, em particular, a taxa de produção de ácido e de consumo de oxigênio pelas células intactas, a atividade de enzimas glicolíticas e os níveis de glicolíticas intracelular foram relatados por Carlsson et al. (1983). A produção de ácido, a absorção de oxigênio e, conseqüentemente, a excreção H₂O₂ foram inibidas em todas as cepas pelo sistema LP.

Em vários outros estudos experimentais, o efeito bacteriostático ou bactericida do sistema LP tem sido demonstrado contra vários outros microrganismos patogênicos, como *Aeromonas hydrophila* (SANTOS et al., 1995), *Candida albicans* (LENANDER-LUMIKARI, 1992) e *Helicobacter pylori* (SHIN et al., 2002).

O efeito antifúngico do sistema LP e a capacidade para degradar aflatoxina, na presença de cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio, já foram relatados por Doyle e Marth, (1978). Aumentando a quantidade de LP de 50 para 500 UA/mL resultou no aumento da taxa de degradação da aflatoxina de 3,6 para 5,1%. Quando quantidades comparáveis de LP estavam presentes, a aflatoxina G1 foi degradada cerca de 1,5 vezes mais rápido que a aflatoxina B1. Jacob et al. (2000) relataram que a lactoperoxidase do leite de cabra apresentou alta atividade antifúngica e antibacteriana. O sistema LP, em leite de cabra, foi eficiente para inibir o crescimento e proliferação de várias espécies de fungos, tais como *Aspergillus flavus*, *Trichoderma spp.*, *Corynespora cassicola*, *Phytophthora meadii* e *Corticium salmonicolor*.

Quanto ao efeito antiviral do sistema LP, a lactoperoxidase mostra-se eficiente ao destruir tanto o poliovírus como o vírus da vacinação, com halogenetos como doadores de elétrons (BELDING et al., 1970). Esses vírus particulares são mais resistentes que muitos outros em relação aos efeitos de secagem, aquecimento e

desinfecção. Yamaguchi et al. (1993) relataram que a LP e a glicose-oxidase são viricidas para HIV-1 na presença de iodeto de sódio, conforme avaliado pela perda de replicação viral ou pela inibição do efeito citopático sobre as células infectadas. Esses resultados *in vitro* demonstram que o sistema LP proporciona uma atividade viricida potente contra o HIV-1. Wang, Ye e Ng (2000) também mostraram que o sistema LP inibe a atividade enzimática da transcriptase reversa do vírus HIV-1.

De acordo com Bjorck et al. (1979), é importante destacar que a duração da fase de latência da ativação do sistema LP é dependente da temperatura do leite e do nível inicial de contaminação. Além disso, as bactérias encontradas, na fase estacionária, são TNAs sensíveis ao sistema LP que as bactérias que se encontram na fase de crescimento e que são metabolicamente ativas (SANDHOLM et al., 1988). Por sua vez, são mais suscetíveis à inibição de células que crescem anaerobicamente que as que realizam o metabolismo aeróbio (PRUITT; REITER, 1985).

5. Aplicação do sistema lactoperoxidase

5.1. Efeito do sistema na preservação do leite

A aplicação industrial mais difundida do sistema LP, na produção de alimentos, é na indústria de laticínios para a preservação do leite cru, durante o armazenamento e/ou transporte para plantas de processamento.

Em 1957, a FAO estabeleceu em documento (FAO 57/11/8655) o uso de peróxido de hidrogênio em quantidades de 300-500 ppm para conservação do leite cru. No entanto, a utilização do peróxido de hidrogênio requer grande cuidado, uma vez que é um poderoso agente oxidante. Foi comprovado que afeta, nessas quantidades, certas propriedades do leite e que altera o sabor e a textura do queijo, com perdas no valor nutritivo das proteínas (BJORCK et al., 1975). Em muitos países, a exemplo do Brasil, está proibida a adição de peróxido de hidrogênio ao leite.

Posteriormente, demonstrou-se que baixas concentrações de peróxido de hidrogênio ativavam o sistema LP, dando origem a um efeito antibacteriano, quando adicionada uma quantidade equivalente de tiocianato (15 ppm), que eram suficientes para manter a qualidade microbiológica do leite cru durante a armazenagem (BJORCK et al., 1975; REITER et al., 1976).

A International Dairy Federation (IDF) publicou o “Código de práticas para a preservação do leite cru pelo sistema lactoperoxidase”, especialmente na ausência de refrigeração (IDF N°. 234, 1988).

Em 1991, a Comissão do Codex Alimentarius adotou as "Diretrizes para a conservação de leite cru pelo uso do sistema lactoperoxidase" – CAC/GL 13-1991, que focam na aplicação do sistema LP, para prevenir a deterioração do leite cru, durante a coleta e transporte para a planta de processamento de leite, em condições em que a refrigeração adequada não é viável (CAC, 1991). A orientação é baseada em uma série de estudos científicos, a partir do final da década de 70, que elucidam os princípios de funcionamento do método e fornecem provas (REITER et al., 1976; BJORCK, 1978; BJORCK; CLAEISSON; SCHULTHESS, 1979).

Desde a adoção das diretrizes do Codex Alimentarius, uma quantidade substancial de dados sobre a eficácia do sistema LP tem sido gerada, não só a partir de estudos de laboratório e de campo, mas também a partir da experiência com a utilização em grande escala de produção de leite comercial em alguns países. Trabalhos mostram resultados de muitos países como, por exemplo, Cuba, Colômbia, Peru, Venezuela, Camarões, Quênia, Uganda, Paquistão e outros (Quadro 2), cobrindo uma vasta gama de diferentes condições de produção.

Quadro 2 – Estudos de laboratório e de campo sobre a utilização do sistema lactoperoxidase em diversos países

| País/Referências | Tipo de avaliação | Resultados |
|--|---|--|
| Bolívia: PNUD-IDEASS (2004) | Avaliação de campo com produtores e indústria. | Manutenção da qualidade entre 8-16 horas no leite cru entre 24-34°C. |
| Colômbia: PNUD-IDEASS (2004); Antolinez e Tobon (1994). | Tese de graduação e vários ensaios para avaliar produtos lácteos e outros. Em fazendas, centros de coleta e plantas de processamento. | Manteve a qualidade inicial desde 8-72 horas, dependendo da temperatura e da qualidade inicial. A melhoria da qualidade do leite UHT em sachê, queijos frescos e iogurte. Importante medida de manejo e higiene. |
| Costa Rica: Bran e Mora (1999) | Tese de graduação para título de Engenheiro Agrônomo. | Obteve-se 18 horas de conservação no leite quente com mais de 30°C. Não afetou a qualidade de queijos nem de iogurte. |
| México: García, Pardo e Wauszewski (1984); Toledo e García (1991); Saldade (1999). | Avaliação de instituições reguladoras e outros. | Redução de bactérias mesófilas e coliformes. Não afeta a composição química nem o conteúdo de substâncias redutoras. Não se detectou inibidores. Atende as Boas Práticas de Higiene na ordenha. |

Continuação

| | | |
|--|--|--|
| Cuba: Soler (2004) | Ensaio em 9 meses, em condições de campo: chácaras, fazendas grandes e caminhões-tanque. Volumes de 50 e 500 de litros de leite fresco de uma mistura homogênea a uma temperatura de 30°C. | Estabilidade de resultados durante os 9 meses. Acidez titulável e contagem de mesófilos viáveis dentro dos limites aceitos até pelo menos 8 horas |
| República Dominicana: Ponce et al., (2004) | Avaliação em fazendas e queijarias. | Manteve a qualidade inicial pelo menos por 8 horas a temperaturas superiores a 32°C. Melhoria da qualidade de queijos frescos. |
| Equador: Saltos (1996); Santos (2004) | Tese de Doutorado em Medicina Veterinária. Experimentos controlados. | Efeito positivo até 9 horas com leite quente. Redução na contagem de coliformes. Não afetou condições do leite e do queijo fresco. |
| Honduras: Zúñiga (2002) | Tese de graduação para Engenheiro Agrônomo. | Efeito benéfico por mais de 8 horas no transporte de leite quente. Não afetou a qualidade de queijos. |
| Nicaragua: PNUD-IDEASS (2003) | Curso teórico-prático com produtores. Ensaio no estado de León. Ativação em 50 litros e misturas de 500 litros. Leite para queijos frescos, vendas diretas e outros usos. | Foi demonstrada a eficácia da ativação dentro dos tempos estabelecido pelas diretrizes. Tempos mínimos de conservação de 8 horas. Melhora da qualidade dos queijos. |
| Perú: Albuja, Ludeña e Castillo (2003); Biovet SAC (2001) | Avaliação em fazendas e fabricas. | Efeito entre 12-30 horas em leite quente e 120 horas em leite refrigerado. Melhoria da qualidade e vida de prateleira de produtos lácteos. |
| Venezuela: Ponce, Capdevila e Alcalá (2002); GLP/FAO (2005); Mara (2007) | Avaliação de organismos reguladores. | Efeito benéfico em fazendas e centros de coleta. Redução de mesófilos e coliformes. Melhorou o leite refrigerado e queijos curado. |
| Albania: PNUD-IDEASS (2005) | Experimento de 9 meses. Lotes de leite de ovelha, volume de 40 a 500 litros, alíquotas de controle e ativado até 12 horas. Temperatura ambiente (26-33°C). | Acidez titulável abaixo de 18° Dornic entre 8-12 horas após a ativação. Não foram observadas alterações na qualidade dos queijos. |
| Venezuela, Colômbia e México: GLP-FAO (2000) | Avaliação em fazendas e fábricas com capacitação e treinamento prático. Leite quente e frio, de vaca e cabra. Análise em 0, 4, 8, 12, 16 horas. Ativação com Stabilak após a ordenha. | Tempos de conservação entre 5-16 horas para leite quente e 5 dias para leite refrigerado, dependendo da qualidade inicial e temperatura. Melhoria da qualidade do leite UHT, queijos e iogurte. Necessidade de manter medidas de higiene na ordenha. |

Fonte: Adaptado de Ponce et al. (2005)/ Traduzido pelo autor

Em geral, esses dados confirmam a eficácia do sistema LP para prevenir a deterioração do leite cru não refrigerado, dentro do quadro definido nas orientações do Codex Alimentarius (1991), ou seja:

- Os princípios de boas práticas de higiene na produção de leite devem ser respeitados, a fim de garantir uma boa qualidade microbiológica inicial do leite cru;
- O efeito inibitório do tratamento é dependente da temperatura de armazenamento do leite tratado com sistema LP.

O efeito antibacteriano do sistema LP é inversamente proporcional à temperatura e diretamente proporcional à qualidade microbiológica inicial do leite (HARNULV; KANDASAMY, 1982).

A temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o crescimento microbiano. O papel da refrigeração e da cadeia do frio, para manter a qualidade e a segurança do leite cru e pasteurizado, é bem reconhecido. Muitas bactérias são mesófilas, crescendo melhor em temperaturas de 30 a 40°C. Segundo Ponce et al. (2005), estudos de campo recentes têm sido realizados com leite cru tratado pelo sistema LP e armazenados a 30-35°C, mostrando uma inibição consistente do crescimento microbiano durante 4 a 7 horas. Porém, as bactérias psicrotróficas e psicrófilas podem crescer em baixas temperaturas, com algumas cepas capazes de sobreviver e crescer em temperaturas abaixo de 0°C. No entanto, em produtos como o leite, que tem uma microflora diversificada, isso normalmente seria superado pelas bactérias de deterioração psicrotrófica, tais como os membros do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*.

Questões atuais de preocupação, com relação à baixa temperatura de armazenamento, incluem a formação de proteases estáveis ao calor por psicrotróficos *Pseudomonas spp.* e o crescimento de agentes patogênicos, tais como *Listeria monocytogenes* e alguns *Bacillus cereus spp.* Nessa extremidade da escala de temperatura, vários estudos indicam que a ativação do sistema LP pode retardar o crescimento de bactérias psicrotróficas no leite e, assim, retardar a deterioração do leite por vários dias em comparação ao que pode ser conseguido com a refrigeração apenas. Por exemplo, estudos realizados, em Taiwan, indicam uma extensão de seis dias do período de armazenamento livre de deterioração do leite cru a 4°C ativado pelo sistema LP (LIN; CHOW, 2000). Outro estudo demonstrou que o sistema LP impediu o crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, durante cinco dias, a 4°C e, por três dias, a 8°C (ZAPICO et al., 1995).

Uma breve comparação sobre a utilização do sistema LP, da refrigeração e uma combinação do sistema LP com a refrigeração pode ser observada no Quadro 3.

Quadro 3 – Utilização: sistema LP, refrigeração e a combinação de sistema LP com refrigeração

| | Risco/Segurança | Desempenho microbiológico | Utilização |
|---|---|--|--|
| Sistema lactoperoxidase | Sem risco para a saúde pública, quando utilizado de acordo com as diretrizes do Codex Alimentarius. | 1. Principalmente bacteriostático para muitos microrganismos patogênicos do leite e outros; 2. Mantém a qualidade inicial do leite por 4-7 horas (30 a 35°C) e até 24-26 horas a 15°C; 3. Não melhora a qualidade do leite; 4. Sem resistência microbiológica em longo prazo. | * Em leite de todas as espécies. * Pode interferir com a fermentação quando o leite não é adequadamente tratado pelo calor. * Sem efeitos adversos significativos sobre as características químicas, físicas ou sensoriais do leite cru e de produtos lácteos. |
| Refrigeração | Sem risco para a saúde pública. | 1. Principalmente bacteriostático para muitos microrganismos patogênicos do leite e outros; 2. Mantém a qualidade inicial do leite por vários dias (depende da temperatura de refrigeração e da qualidade microbiana inicial do leite); 3. Não melhora a qualidade do leite. | * Em leite de todas as espécies. * Efeitos físicos e químicos negativos limitados. |
| Refrigeração com Sistema lactoperoxidase | Sem risco para a saúde pública, quando utilizado de acordo com as diretrizes do Codex Alimentarius. | 1. Principalmente bacteriostático para muitos microrganismos patogênicos do leite e outros; 2. Mantém a qualidade inicial do leite por 5-6 dias a 4°C; 3. Não melhora a qualidade do leite; 4. Sem resistência microbiológica a longo prazo. | * Em leite de todas as espécies. |

Fonte: FAO/WHO (2006) / Traduzido pelo autor

Além da sua importância na conservação de leite cru, o sistema LP também pode ser usado para estender o tempo de prateleira de leite pasteurizado (MARTINEZ et al., 1988; BARRETT; GRANDISON; LEWIS, 1999). Sarkar e Misra (1994) mostraram que, quando o leite cru foi ativado pelo sistema LP antes da pasteurização, uma melhoria na qualidade do leite pasteurizado foi observada, provavelmente devido à redução da resistência ao calor de alguns microrganismos, como resultado do

tratamento com sistema LP. Kamau, Doores e Pruitt (1991) relataram que o sistema LP ativado, em conjunto com a pasteurização, prolongou o tempo de prateleira do leite de vaca, mantido a 10°C por mais de 20 dias, em comparação com o leite não tratado. Eles descobriram que o crescimento da microflora sobrevivente, natural do leite, iniciou, após 12 dias, em leite tratado com sistema LP, em comparação com 4 dias em leite cru e tratado só com peróxido de hidrogênio. Após 22 dias, a contagem de microrganismos viáveis, no leite não tratado e tratado com peróxido de hidrogênio, atingiu 10^6 - 10^7 células por mL em comparação com cerca de 10^3 células por mL, no leite tratado pelo sistema LP.

As diretrizes do Codex Alimentarius (CAC, 1991) afirmam que “devido ao efeito bacteriostático principal do sistema, não é possível disfarçar a má qualidade do leite, o qual originalmente continha uma população bacteriana elevada, por meio da aplicação deste método”, e que “o uso do sistema LP não exclui a necessidade da pasteurização do leite antes do consumo humano”. Também não exclui as precauções normais e rotinas de manipulação aplicadas para garantir um alto padrão de higiene do leite cru.

Os estudos microbiológicos realizados, ao longo dos últimos 15 anos, sustentam essa visão. Indiscutivelmente, a eficácia antibacteriana do sistema LP é inversamente correlacionada com a densidade das células bacterianas. A eficácia antibacteriana do sistema LP é baixa a concentrações elevadas de bactérias, principalmente bacteriostática, em concentrações intermediárias, e, principalmente, bactericida em baixas concentrações. Isso decorre tanto de observações de laboratório com culturas puras de bactérias patogênicas ou bactérias de deterioração suspensas em solução tampão ou caldo (EL-SHENAWEY; GARCIA; MARTH, 1990; GARCIA-GRAELLS et al., 2003), e a partir de estudos de campo em leite com seu mix natural de microflora (PONCE, 2005; ALBUJAR; LUDENA; CASTILLO, 2005). Por conseguinte, salvaguarda uma elevada qualidade bacteriológica do leite, antes da aplicação do sistema LP, por meio da adoção de boas práticas de higiene, é fundamental para a eficácia do sistema. A esse respeito, a utilização do sistema LP para preservar a qualidade do leite, antes da pasteurização, não difere do uso da refrigeração para a mesma finalidade (PONCE, 2005). É importante salientar que a finalidade de ambos os métodos é evitar a deterioração do leite, depois da ordenha e antes da pasteurização, e

não para tornar o leite seguro para o consumo, o que só é conseguido pela pasteurização.

Assim, a eficácia do sistema LP, na melhoria da qualidade microbiológica do leite cru, depende de vários fatores:

- Quantidade e tipo de microrganismos;
- Natureza da alimentação (dieta) e do meio ambiente;
- Concentrações molares de tiocianato e peróxido de hidrogênio;
- Temperatura do leite;
- Tempo de ativação do sistema após a ordenha;
- Atividade catalase positiva dos microrganismos.

5.2. Efeito do sistema em produtos lácteos

Segundo alguns autores, compostos antimicrobianos formados pelo sistema LP podem interferir na atividade das “culturas starter” não patogênicas (fermentos, inóculos e culturas lácticas) e afetar a qualidade do produto final. A ativação/reação do sistema LP, durante a fabricação de produtos lácteos fermentados, pode causar problemas de fabricação (SARKAR; MISRA, 1994). Um produto intermediário da oxidação (OSCN⁻), produzido no leite, ativado pelo sistema LP, provoca a inibição do crescimento e redução da produção de ácido láctico pelas “culturas starter” (REITER, 1978; ROGINSKI et al., 1984).

Sarkar e Misra (1992) definem alguns fatores que podem afetar a utilização bem sucedida de leite tratado pelo sistema LP para a fabricação de produtos lácteos fermentados:

- Tipo de leite usado;
- Tipo de cepas de “culturas starter” usadas;
- Nível de tiocianato e peróxido de hidrogênio no leite e usados para ativar o sistema;
- Temperatura de aquecimento do leite ativado;
- Compostos antibacterianos formados;
- Tempo e temperatura de incubação;
- Taxa de inoculação da “cultura starter”.

Há um certo entendimento sobre a inibição de culturas lácticas devido à atividade da lactoperoxidase, resultando na redução da produção de ácido e problemas de coagulação com produtos ácidos gelificados. Além disso, a interação da lactoperoxidase com grupos sulfidrilo de proteínas pode alterar a textura dos produtos gelificados, por exemplo, a redução na interação β -lactoglobulina/ β -caseína. A sensibilidade das bactérias de culturas lácticas, com a ação do sistema LP, depende, principalmente, da susceptibilidade das cepas específicas. Segundo Seifu, Buys e Donkin (2005), essa susceptibilidade pode ser categorizada em três grupos, da seguinte forma:

- (i) os grupos mais sensíveis de organismos, gerando H_2O_2 , por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, três cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (1373, LBr);
- (ii) os organismos que são sensíveis à inibição pelo sistema LP, mas não têm a capacidade de gerar H_2O_2 e requerem uma fonte extrínseca de H_2O_2 , por exemplo, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* (3201);
- (iii) os organismos resistentes à inibição pelo sistema LP como, por exemplo, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus lactis* e uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (1243).

No entanto, o efeito do sistema LP sobre o comportamento de “culturas starter” utilizadas na indústria de laticínios, para a fabricação de queijos e outros, vem sendo investigado desde a década de 80 e as evidências para esses fenômenos são controversas (Quadro 4).

A possibilidade de fazer uma variedade de queijos, a partir de leite tratado pelo sistema LP, tem sido relatada por alguns estudos (Quadro 4). Zall et al. (1983a e 1983b) fabricaram queijos Cottage e Cheddar, a partir de leite conservado por 8 dias com o sistema LP e depois pasteurizado em 73°C/16s. O queijo Cottage, feito a partir de leite tratado, teve um rendimento 2% maior do que o controle. As características organolépticas dos queijos Cottage e Cheddar tratados foram diferentes dos controles, embora eles não tenham apresentado problemas (ZALL et al., 1983a). O queijo Cheddar, feito a partir do leite tratado, apresentou uma coalhada mais fraca e com produção de ácido mais lenta que no controle, retardando o soro em 2 horas a mais, para chegar à acidez desejada para utilizar a coalhada (ZALL et al., 1983b).

Quadro 4 – Efeito do sistema lactoperoxidase na fabricação de derivados lácteos

| Produto | Condições | Efeito | Referências |
|--------------------|--|--|---|
| Leite cru | Ativação em tempos diversos sobre as concentrações de gordura, proteína e lactose. E efeito sobre componentes menores. | Concentrações estáveis de proteína, gordura e lactose. Evidenciado a inibição de proteólise e lipólise. Nenhuma mudança significativa em ácidos graxos. As concentrações de vitamina foram mantidas. | Ahrne e Bjork (1985); Ponce, López e Martínez (1987); Kumar e Mathur (1989); Sharma e D. Raj (1999) |
| Leite pasteurizado | Ativação antes de pasteurizar | Aumento da vida de prateleira. Sem alterações nas suas propriedades físico-químicas e organolépticas. | Kamau, Doores e Pruitt (1991); Sarkar e Misra (1994) |
| Leite UHT | Ativação antes de esterilizar | Aumento do tempo de vida de prateleira. Menos ocorrências de alterações no tempo. | Solanky, Chopra e Mathur (1994); de Wit e van Hooydonk (1996) |
| Leite fermentado | Ativação e tratamento térmico | Melhoria dos parâmetros de qualidade. Inibe o desenvolvimento da acidez e prolonga a vida de prateleira, sem alterar as suas características biológicas. | Zall, Chen e Dzurec (1983); Sarkar e Misra (1992); Albuja, Ludeña e Castillo (2003) |
| Iogurte | Leite de vaca e búfala. Análise sensorial | Nenhuma diferença na composição química, nem nas qualidades organolépticas. | Zall et al., (1983); Kumar e Mathur (1989); Hirano (1998) |
| Queijo fresco | Ativação do leite sem pasteurizar. Leite de vaca | Retardar o desenvolvimento de ácidos, baixa retenção de umidade, textura satisfatória. | Zall et al., (1983) |
| Queijo Cheddar | Ativação do leite. Leite de vaca | Atraso na produção de ácido, e aumenta o tempo de fabricação (cerca de 2 horas), coalhada fraca no corte, ligeiramente menor rendimento, maturação mais lenta. | Zall et al., (1983) |
| Queijo Cottage | Ativação do leite. Leite de vaca | Sabor e aroma de queijo experimental ligeiramente diferente do controle, aumento do rendimento do queijo. | Zall et al., (1983) |
| Queijo Mussarela | Ativação do leite. Leite de búfala. | Não houve diferença na recuperação de sólidos do leite, uma menor retenção de umidade, desenvolvimento lento de ácido, tempo maior (2 h) para atingir o ponto. | Kumar e Mathur (1989) |
| Queijo em conserva | Ativação do leite. Leite de vaca e búfala. | Foi possível a fabricação de queijo de pasta mole em conserva, com diminuição da consistência da coalhada, diminuição da acidez e qualidade satisfatória. | Hefnawy, Ewais e Abd EISalam (1986); Abdou et al., (1996) |

Fonte: Elaborado pelo autor a partir de Ponce et al. (2005) e Ponce (2010)

Lara et al. (1987) relataram que os rendimentos de queijo tipo fresco (medido em base de matéria seca ou umidade) de leite de vaca tratado pelo sistema LP foram

significativamente maiores que o queijo feito com leite controle. Eles indicam que a transição de gordura do leite LP ativado, para o queijo, ocorreu completamente, enquanto que apenas 85% foi retida no queijo feito a partir de leite não tratado. Mais de 2 kg de queijo extra podem ser recuperados por meio da utilização do sistema LP por cada 100 kg de leite. Eles também apontaram que as contagens microbiológicas, pH e aparência também foram favoráveis para os queijos fabricados a partir do leite com sistema LP ativado.

Earnshaw et al. (1989) ativaram o sistema LP no queijo Cottage, mediante a adição dos componentes de ativação no leite, para estudar, em especial, as alterações provocadas pelo gênero *Pseudomonas*. O sistema foi eficaz na redução dos níveis de *Pseudomonas*, *E. coli* e *Staphylococcus*, aumentando a vida de prateleira e a estabilidade do queijo. O tratamento não afetou nem o pH nem as propriedades sensoriais do queijo.

Em estudos com queijo Mussarela, não foram observadas diferenças significativas na recuperação dos sólidos, a partir de leite de búfala ativado pelo sistema LP. No entanto, foi registrada uma menor retenção de umidade e lenta taxa de desenvolvimento do ácido láctico (KUMAR; MATHUR, 1989).

De acordo com Sarkar e Misra (1994), a atividade reduzida das culturas lácticas, em leite com sistema LP ativado, são observadas, mas as características organolépticas e químicas são equivalentes em iogurte, queijos Cottage e Cheddar produzidos a partir do leite tratado.

Santos et al. (1995) também relataram que a ativação do sistema LP, em leite pasteurizado, utilizado para a fabricação de queijo fresco, pareceu ser um método útil para controlar os efeitos indesejáveis associados com os microrganismos tolerantes ao frio (proteólise excessiva por proteinases de psicotróficos Gram-negativo).

Abdou et al. (1996) demonstraram que o tratamento de leite de vaca e búfala com LP e peróxido de hidrogênio aumentou o rendimento do queijo. Também relataram que o tratamento com LP produziu queijos com qualidade satisfatória que apresentou pontuação melhor em testes organolépticos.

Ramet (2004) descobriu que o enriquecimento do leite cru, com os reagentes utilizados, para a ativação do sistema LP, não modifica as propriedades sensoriais do leite tratado em relação ao leite controle. Conforme Seifu, Buys e Donkin (2005), o

sabor do leite fermentado e do queijo podem realmente ser melhorado como resultado da ação da lactoperoxidase alterando o equilíbrio da microflora.

Quanto aos outros produtos lácteos fermentados, o iogurte feito de leite tratado pelo sistema LP não apresentou diferenças significativas na composição química ou nas propriedades organolépticas comparado ao iogurte controle (ZALL et al., 1983b; MEHANNA; HEFNAWY, 1988). A qualidade do Dahi (origem indiana), iogurte e leite acidificado, feito a partir de leite de vaca ou de búfala, ativado pelo sistema LP, não foi drasticamente afetada, mas uma baixa taxa de produção de ácido foi encontrada ao utilizar leite LP ativado (SARKAR; MISRA, 1994). Basaga e Dik (1994) também relataram que a ativação do sistema LP atrasou o tempo de coagulação e reduziu a atividade das “culturas starter” usadas para a produção de iogurte. Sobre isso, Ozer et al. (2003) relataram alguns efeitos limitantes da ativação do sistema LP na textura do iogurte, enquanto Revol-Junelles e Milliere (2005) e Seifu, Buys e Donkin (2005) analisaram o assunto e descobriram algumas evidências de coagulação mais lenta do coalho e geis mais fracos no queijo, no entanto os efeitos foram geralmente muito limitados.

Em resumo, os efeitos da ativação do sistema LP, no processamento do leite, são bastante limitados e não há evidências de que a ativação do sistema LP resulta em quaisquer efeitos negativos graves para o leite ou para os produtos derivados. Assim como evidências de estudos da América Latina sugerem que o sistema LP não tem efeitos negativos sobre a qualidade do queijo e produtos fermentados, quando o leite tenha sido submetido a um tratamento térmico adequado, após a utilização do sistema LP (PONCE et al., 2005).

Deve-se ressaltar que o uso do sistema LP, com o objetivo de tentar manter a qualidade microbiológica inicial do leite, para o processamento, deve gerar produtos de qualidade superior e isso vem sendo confirmado por alguns ensaios de campo da FAO sobre os diferentes produtos fermentados (FAO, 2004a).

6. Aspectos toxicológicos do sistema lactoperoxidase

O sistema LP difere unicamente de outros sistemas de preservação na medida em que é um sistema de proteção biológica natural nos animais. Ele funciona como um mecanismo de proteção antimicrobiana no tecido da mucosa, incluindo a cavidade oral,

e do pulmão (TENOVUO, 1985; GEISZT et al., 2003). A esse respeito, o sistema LP não introduz substâncias no leite que não são metabólitos humanos normais.

Como observado acima, os componentes ou metabólitos do sistema LP, ou seja, a lactoperoxidase, o íon tiocianato e hipotiocianato são detectados normalmente em tecidos e secreções animais e humanos, incluindo o leite. Os níveis de peróxido de hidrogênio introduzidos no leite, via percarbonato de sódio, são inferiores aos anteriormente considerados aceitáveis pela Articulação FAO/WHO do Comitê Especialista em Aditivos Alimentares – JECFA (FAO/WHO, 1990) e não são, portanto, de preocupação. A avaliação da segurança do uso do sistema LP, no leite, pelo JECFA foi limitada pelos termos de referência para a aplicação do sistema "quando a refrigeração é praticamente impossível", e pelas diretrizes elaboradas pela Articulação FAO/WHO do Comitê de Governo Especialista no Código de Princípios Preocupantes sobre Leite e Produtos Lácteos.

A utilização do sistema LP não requer a adição de mais lactoperoxidase acima dos níveis da enzima que ocorre no leite cru. Como não há nenhuma alteração nas concentrações de enzimas, naturalmente presentes no leite, esse componente não é considerado de importância toxicológica. Segundo Siva et al., (1991), há pouco ou nenhum efeito adverso sobre o leite ou produtos lácteos tratados com sistema LP, por causa do seu baixo nível de toxicidade. Também não foram observados efeitos secundários indesejáveis, pois os componentes são os mesmos que aqueles presentes no leite natural (HADDADIN et al., 1996).

Nesse contexto, tem sido amplamente demonstrado que o leite tratado com o sistema LP é adequado para consumo humano (SARKAR; MISRA, 1994; JACOB et al., 2000; FERNANDEZ; MARRERO; CAPDEVILA, 2005). Evidências de efeitos indesejáveis não foram observadas na população que consome leite ativado com o sistema LP durante mais de 10 anos (FERNANDEZ; MARRERO; CAPDEVILA, 2005).

Em estudos clínicos com tiocianato de sódio no leite, os efeitos negativos sobre o metabolismo de iodo foram observados apenas em concentrações de 200-400 mg/L (VILKKI; PIIRONEN, 1962; MEYERS et al., 1978; KISHORE et al., 1997). Além disso, experimentos em indivíduos saudáveis, com a ingestão de leite tratado, em doses repetidas, por tempo prolongado (12 semanas), contendo 20 mg/L (que corresponde a

uma dose diária de 8 mg de SCN⁻), em 400 mL de leite, não mostraram nenhuma mudança nos níveis de T4, T3 e TSH (função da tireoide), embora os níveis sérico e urinário aumentaram (DAHLBERG et al., 1985).

Um bioensaio de toxicidade/carcinogenicidade crônica de tiocianato de sódio (isoladamente ou em combinação com nitrito de sódio) foi conduzido, durante dois anos, em ratos. Os animais receberam o tiocianato de sódio a um nível de 3,2 g/L em água potável. Os resultados desse estudo levaram à conclusão de que o tiocianato de sódio não é carcinogênico para ratos (LIJINSKY; KOVATCH, 1989).

Os níveis normais de tiocianato, no leite, dependem dos níveis de tiocianato e seus precursores na dieta dos animais, incluindo tioglicosídeos (glicosinolatos) e glicosídeos cianogênicos. As concentrações foram relatadas, variando entre 2,3 e 35 mg/L, no leite das vacas individuais, e de cerca de 8 mg/L em leite de tanque coletivo (PONCE et al., 2005). Quando utilizado de acordo com as diretrizes do Codex Alimentarius, o nível de suplementação de tiocianato de sódio, para ativar o sistema LP, é de 10-15 mg/L, de modo que os níveis globais, em leite de tanque ativado, seriam da ordem de 20 mg/L, um fator de 10-20, inferior aos relatados para levar a efeitos sobre o metabolismo do iodo. É por isso que o teor total de tiocianato, uma vez que o sistema LP é ativado em uma mistura de leite, não ultrapassa a concentração máxima natural em qualquer leite de vaca (PONCE et al., 2005). Além disso, segundo Thomas Jefferson e Bates (1980), o produto da oxidação do tiocianato tem um tempo de vida muito curto no leite, de modo que os níveis residuais de leite tratado com o sistema LP não representam um risco toxicológico. Os produtos de degradação são considerados inócuos.

Além de ser encontrado em animais, tecidos humanos e fluidos, que é parte do sistema de defesa, o tiocianato também está presente nos alimentos de origem vegetal e é formado no corpo humano ou animal, a partir de substâncias, e em plantas como glucosinolatos ou glicosídeos cianogênicos. Tiocianato está presente no feijão cru (100-3100 mg/kg), tubérculos de mandioca (10-462 mg/kg), caroço de frutas e sorgo (2500 mg/kg) (FAO, 1990). Desse modo, o consumo adicional de tiocianato de sódio, a partir de um copo (200 mL) de leite tratado pelo sistema LP, corresponderia a 3 miligramas de tiocianato de sódio, que também está presente em 30 gramas de couve crua, 1 grama de feijão cru ou 8 gramas de mandioca crua.

No que diz respeito à adição de peróxido de hidrogênio, apenas é requerido quantidades mínimas de H_2O_2 (8 mg/L) em comparação com o método tradicional de se preservar o leite diretamente com H_2O_2 , o que requer entre 500 e 800 mg/L (CAC, 1991). Além disso, o peróxido é facilmente utilizado na oxidação enzimática do SCN⁻.

Sendo assim, as vantagens do sistema LP resultam principalmente da redução significativa de perdas de deterioração do leite e uma maior disponibilidade de leite, como uma boa fonte de nutrientes na dieta, e beneficiando, assim, os produtores de leite e os consumidores. E, claramente, a toxicidade aguda não é um aspecto relevante da exposição por meio do leite tratado pelo sistema LP.

7. Aspectos socioeconômicos da utilização do sistema lactoperoxidase

Preservar o leite usando o método mais prático e econômico, mantendo a sua qualidade inicial, é uma consideração necessária para aumentar a produção total de leite e sua comercialização. Isso é especialmente relevante para os países em desenvolvimento por meio da redução de perdas, pós ordenha do leite, uma vez que o Banco Mundial estima que 20% do leite dos países em desenvolvimento é desperdiçado, após a ordenha, por diversos fatores (FAO/WHO, 2006).

Como se trata de estabelecer alterações que permitam a melhoria, a análise inicial deve considerar que a refrigeração é o método de conservação do leite utilizado universalmente. No entanto, nem sempre é possível usá-la, segundo a FAO/WHO (2006), por razões de natureza diversas:

- Falta da existência de uma rede de energia elétrica;
- Alto custo dos equipamentos de refrigeração associado a pouco incentivo e de difícil acesso ao investimento;
- Grande número de produtores tem pequeno número de animais em lactação no rebanho e o volume de leite não justifica a obtenção de um equipamento de refrigeração;
- Não é necessário o resfriamento de leite para os fins de sua utilização (por exemplo, fabricação de queijos artesanais não pasteurizados);
- Existem os equipamentos e a rede elétrica de energia, mas acontecem falhas por várias razões;

- O leite é recolhido em caminhões térmicos refrigerados, imediatamente após a ordenha ser concluída, mas há falhas no horário da coleta;
- A relação entre o preço dos equipamentos de refrigeração e o ganho líquido obtido, com a venda de um pequeno volume de leite, não permite retorno do investimento;
- A falta de estradas e sistemas de transporte adequados para o transporte do leite.

Essas situações ocorrem tanto em nível de fazenda, centros de recepção intermediários e até mesmo em unidades de processamento, em todos os países do terceiro mundo e mesmo em alguns países desenvolvidos. Embora os custos de produção do leite sejam baixos, em países em desenvolvimento, pode haver altas perdas de leite, em que as temperaturas são altas e a cadeia de mercado do leite carece de infraestrutura e recursos para refrigeração, e onde há problemas com fornecimento de energia elétrica. A oportunidade de aumentar a produção de leite e gerar renda adicional, para os produtores, também é limitada pela capacidade restrita de absorção do mercado, falta de instalações para armazenar o leite (leite da ordenha da manhã e da noite), e dificuldades para entregar o leite na hora para os centros de coleta/ plantas de processamento.

A refrigeração é o meio mais adequado de conservação do leite, mas requer elevados investimentos de capital e pode incorrer em altos custos de funcionamento e manutenção. Assim sendo, a utilização do sistema LP é um método confiável e econômico de preservar o leite cru, bem como a refrigeração, em fazendas e empresas de laticínios de pequeno porte, juntamente com uma boa higiene e sanitização (CAC, 1991).

Quando se considera a relação custo-benefício da preservação pelo sistema LP, isso é mais barato e não necessita de um grande dispêndio de material e equipamentos de refrigeração (BARRAQUIO et al., 1994). O custo de uso do sistema LP se compara favoravelmente ao da refrigeração, especialmente para pequenos produtores de leite. Tem sido demonstrado que o sistema LP é mais rentável que a refrigeração, em zonas que as quantidades de leite são pequenas ou não há energia elétrica, ou seu fornecimento é irregular (SOLER, 2004). Essa é também a melhor maneira de melhorar o fluxo de leite da fazenda para os mercados, criando assim uma renda adicional para os produtores.

De acordo com Ponce et al. (2005), em Cuba, por exemplo, mais de 50% do leite não é refrigerado devidamente, entre outras razões, ao elevado custo dos equipamentos de refrigeração e de falta de energia elétrica. No entanto, o uso do sistema LP permitiu quantidades significativas de leite na cadeia alimentar, no valor de 100 milhões de dólares ao longo de 13 anos, o que de outra forma teria sido perdido. O sistema LP provou ser eficaz na cadeia leiteira, por manter a qualidade inicial do leite, a partir do nível da fazenda até a fábrica de laticínios. Ainda segundo o mesmo autor, na América Latina, 30 milhões de litros de leite foram ativados usando o sistema LP entre 2000 e 2005. Cinquenta por cento do leite que, de outra forma seriam perdidos, são salvos por meio da utilização do sistema LP, totalizando um valor de cerca de 3 milhões de dólares. Na região latino-americana, o custo de resfriamento de um litro de leite pode variar de US\$ 0,05 a US\$ 0,1 por litro, em comparação com um custo de US\$ 0,0025 a US\$ 0,05 por litro, para aplicação do sistema LP, ainda sem considerar o grande desembolso de capital para investir nos equipamentos de refrigeração e a sua manutenção (FAO/WHO, 2006).

Não se trata de demonstrar que o uso do sistema LP é menos dispendioso e, por conseguinte, um substituto para a refrigeração, uma vez que a refrigeração já é definida como um método universalmente reconhecido para essa finalidade. No entanto, uma alternativa viável em termos técnico, econômico e social, quando as condições não permitirem a refrigeração (CLAESSON, 1993; FAO/WHO, 2006).

Uma das preocupações da indústria de laticínios e de organizações internacionais, relacionadas com a ativação do sistema LP, tem sido a dúvida se o uso do método poderia ser um ponto contrário à implementação das Boas Práticas Leiteiras e até mesmo se poderia levar ao abandono dessas práticas (GLP/FAO, 2001; PONCE et al., 2004; FAO/WHO, 2006). Portanto, a recomendação do Comitê de Especialistas da FAO sobre o sistema lactoperoxidase é de que essa prática se insira em um programa para melhorar a qualidade do leite (FAO/WHO, 2006). Assim como provam que a capacidade de conservação se incrementa, na medida que o leite é obtido com uma melhor qualidade inicial, seu uso é portanto um fator estimulante para a melhoria e não um elemento que prejudica as boas práticas de ordenha e higiene do leite.

Os resultados da utilização do sistema LP têm sido avaliados positivamente pelas organizações internacionais da FAO, através do Grupo Global Lactoperoxidase

(GLP/FAO, 2001) e do Comitê de Especialistas da FAO/WHO (FAO/WHO, 2006). E pontuam os benefícios econômicos diretos ao uso do sistema LP por apresentar vários aspectos de consideração de ordem social e de organização da produção leiteira, a saber:

- Permite realizar a produção de leite, em áreas de difícil acesso, que não têm infraestrutura de refrigeração, nem possibilidade de coleta adequada;
- Facilita a dupla ordenha em rebanhos que, pelo seu potencial genético, condição corporal e o número de animais, podem realizá-lo, mas a falta de refrigeração limita essa prática;
- É um incentivo para a implementação de programas de qualidade em sistemas rústicos com ordenha manual;
- Possibilita desenvolver queijos artesanais e outros produtos com melhor qualidade e durabilidade do produto final;
- Facilita uma organização racional da coleta do leite, independentemente das diferenças de infraestrutura, tamanho do rebanho, nível de modernização das instalações de refrigeração e o uso ou não da refrigeração.

Em países subdesenvolvidos, os pequenos produtores de leite desempenham papel importante no fornecimento de leite fresco e produtos lácteos para os centros urbanos, e para garantir o fornecimento da quantidade necessária de leite, as políticas de desenvolvimento do setor precisam ter escolhas de opções adequadas para a conservação do leite, que podem ser adotadas pela indústria nacional de leite (MURIUKI et al., 2003). Logo, a consideração do uso do sistema LP, dentro de uma política de desenvolvimento do setor lácteo nacional, é, portanto, essencial para atender às necessidades de grupos de produtores, intermediários e processadores de leite e derivados, particularmente nos países subdesenvolvidos e em transição, em que a refrigeração não é uma opção imediatamente viável e prática.

REFERÊNCIAS

ALBUJAR, R.; LUDEÑA F.; CASTILLO L. Evaluación de la conservación de la leche cruda en distintas regiones del Perú mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. In: TALLER INTERNACIONAL SOBRE CALIDAD DE LA LECHE. **Proceedings...** CENSA, La Habana. p. 19-23, 2003.

ARMENTEROS M. et al. Análisis de riesgo de exacerbación de patógenos asociados a intoxicaciones alimentarias a partir de leche de vaca activada con el sistema lactoperoxidasa. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE SALUD ANIMAL 2007. **Proceedings...** La Habana, p. 10-13, 2007.

ARMENTEROS, M. Experiencia nacional e internacional en el control de la mastitis bovina. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE SALUD ANIMAL 2003. **Proceedings...** La Habana: CENSA, p. 24-26, 2003.

AUNE, T. M.; THOMAS, E. L. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate ion. **European Journal of Biochemistry**. v.80, p. 209-214. 1977.

BARRAQUIO, V. L. et al. Preservation of raw milk with lactoperoxidase /hydrogen peroxide/thiocyanate system, hydrogen peroxide system and by refrigeration. **The Asian International Journal of Life Sciences**, v. 3, p. 1-10, 1994.

BARRETT, N.; GRANDISON, A.; LEWIS, M. J. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 73-80, 1999.

BASAGA, H.; DICK T. Effect of the lactoperoxidase system on activity of starter cultures for yoghurt production. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 144-146, 1994.

BEUMER, R. R. et al. Antibacterial action of the lactoperoxidase system on *Campylobacter jejuni* in cow's milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.39, p. 107-114, 1985.

BIBI, W.; BACHMANN, M. R. Antibacterial effect of tite lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on the growth of *Listeria* spp. in skimmilk. **Milchwissenschaft**. v. 45, p. 26-28, 1990.

BJORCK L.; CLAESSION O. Correlation between the concentration of hypotiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. **J. Dairy Sci.** v. 63, p. 919-922, 1980.

BJORCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 45, p.109-118, 1978.

BJORCK, L. et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. **Applied Microbiology**, v. 30, p.199-204, 1975.

BJORCK, L. **Lactoperoxidase. Advances in Dairy Chemistry Protein.** v. 1. P.O. Fox editor, London, Elsevier. 1992, p. 332- 338.

BJORCK, L.; CLAESSION, O.; SCHUUFHESS, W. The lactoperoxidase/thiocyanate/ hydrogen peroxide system as a temporary preservative for raw milk in developing countries. **Milchwissenschaft**, v.34, p. 726-729, 1979.

CARLSSON, J.; IWAMI, Y.; YAMADA, T. Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. **Infection and immunity**, v. 40, p.70-80, 1983.

CLAESSION, O. **The use of the lactoperoxidase system in preservation of raw milk at ambient temperatures.** Harare, Zimbabwe. 1993. p. 12-16.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC. **Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system** (CAC GL 13/1991). Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/29/CXG_013e.pdf>. Acesso em: 01 jun 2012.

DAHLBERG, P. et al.. Effect of thiocyanate levels in milk on thyroid function in iodine deficient subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, p.1010–1014, 1985.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: **Food microbiology: Fundamentals and frontiers.** ASM Press, Washington, DC. Fifth Edition, 2001, p.520-556.

DE WIT, J. N.; VAN HOOIJDONK, C. C. M. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 50, p. 227–244, 1996.

DENNIS, F.; RAMET, J. P. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 706–711, 1989.

DOYLE, M. P. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1433-1438, 1987.

EARNSHAW, R. G. et al. The preservation of Cottage cheese by an activated lactoperoxidase system. **Food Microbiology**, v. 6, p. 285-288, 1989.

EKSTRAND, B. Lactoperoxidase and lactoferrin. In: V. M. Dillon, & R.G. Board (Eds.), **Natural antimicrobial systems and food preservation**. Wallingford: CAN International, 1994, p.15-63.

EL-SHENAWY, M. A.; GARCIA, H. S.; MARTH, E. H. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by the lactoperoxidase system in raw milk, buffer or a semi-synthetic medium. **Milchwissenschaft**, v. 45, p. 638-641, 1990.

FAO/WHO. **Benefits and potencial risks of the Lps of raw milk preservation**. Informe de encontro técnico FAO/WHO. Roma: FAO, 2006. 55 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/dairy.html>>. Acesso em: 02 jun 2012.

FAO/WHO. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. 35° Relatório da Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 789. WHO, Geneva. 1990.

FARRAG, S. A.; EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Use of lactoperoxidase system to inactivate *Escherichia coli* 0157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. **Milchwissenschaft**, v.47, p. 15-17, 1992.

FERNÁNDEZ, O.; MARRERO, E.; CAPDEVILA, J. Z. Safety considerations on lactoperoxidase system use for milk preservation. **Revista Salud Animal**, v.27, n.3, p.205–209, 2005.

FONTEH, F. A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Factors affecting lactoperoxidase activity. *Inter. J. of Dairy Techn.*, v. 58, p. 233–236, 2005a.

FONTEH, F. A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. The keeping quality of LPS-activated milk in the western highlands of Cameroon. **Liv. Res. Rural Dev**, v.17, p.1-9, 2005b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Manual on the use of the LP-system in milk handling and preservation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Milk and dairy products, post-harvest losses and food safety in sub-Saharan Africa and the Near East**. 2004b. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/projects/en/pfl/home.html>>. Acesso em: 02 jun 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Report on the meeting on the use of hydrogen peroxide and other preservatives in milk. Interlaken, Switzerland, September 23-27, 1957. Rome: Italy (documento inédito mimeografado FAO/57/11/8655), 1957.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Roots, tubers, plantains and bananas in human nutrition**. Rome, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The lactoperoxidase system of milk preservation**. Field application. 2004a. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/documents/LPS/dairy/mpv/Lactoperoxidase/field.htm>. Acesso em: 02 jun 2012.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic Professional, 1998.

FURTMULLER, P. G. et al. Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. **Biochemistry**, v.41, p.11895-11900, 2002.

GARCIA-GRAELLS, C. et al. The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p. 211–221, 2003.

GEISZT, M. et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defence. **The FASEB Journal**, v. 17, p.1502–1504, 2003.

GLOBAL LACTOPEROXIDASE PROGRAMME – GLP-FAO. **Resúmenes de la Tercera Reunión Anual del Grupo de Expertos Lactoperoxidasa**. La Habana, Cuba, p.26-29, 2001.

GOTHEFORS, L.; MARKLUND, S. Lactoperoxidase activity in human milk and in saliva of new born infants. **Infection and Immunity**, v. 11, p. 1210-1215, 1975.

GUIRGUIS, N.; HICKEY, M. W. Factors affecting the performance of thermophilic starters. 2. Sensitivity to the lactoperoxidase system. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.42, p. 14-26, 1987.

HADDADIN, M. S.; IBRAHIM; S. A.; ROBINSON, R. K. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. **Food Control**, v. 7, p. 149-152, 1996.

HANSSEN, F. S. The bactericidal property of milk. **British Journal of Experimental Pathology**, v.5, p. 271-280, 1924.

HARNULV, B. G.; KANDASAMY, C. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: results from Sri Lanka. **Milchwiss**, v. 37, p. 454-457, 1982.

HEUVELINK, A. E. et al. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1597–1601, 1998.

HUNTER, A. C. Microflora and somatic cell content of goat milk. **Veterinary Record**, v. 114, p. 318-320, 1984.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. Code of practice for preservation of raw milk by lactoperoxidase system. **Bulletin of the International Dairy Federation**. n. 234, p.1-15, 1988.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 264, p.2–19, 1991.

JACOB, B. M. et al. Thiocyanate: mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. **Life Sciences**, v. 66, p. 2433-2439, 2000.

KAMAU, D. N.; DOORES, S.; PRUITT, K. M. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 1010–1014, 1990.

KAMAU, D. N.; DOORES, S.; PRUITT, K. M. Activation of the lactoperoxidase system prior to pasteurization for shelf-life extension of milk. **Milchwissenschaft**, v. 46, p. 213-214, 1991.

KIERMEIER, F.; KAYSER, C. Milk peroxidase. IV. Inactivation of milk peroxidase by microorganisms. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v.113, p. 203-213, 1960.

KISHORE, B. et al. Effect of thiocyanate through milk on thyroid hormone homeostasis in women. **Brit. J. Nutrit**, v. 78, p. 679-681, 1997.

KOHLER, H.; HUWILER, M.; JENZER, H. **Irreversible inactivation of lactoperoxidase by excess hydrogen peroxide involving cleavage of the catalytic heme moiety**. In: *Frontiers in Thyroidology* (Editores: Medeiros-Neto, G. & Gaitan, E.), Plenum Publishing Corp.: New York, 1986.

KORHONEN, H. A new method for preserving milk - the lactoperoxidase antibacterial system. **World Animal Review**, v. 35, p. 23–29, 1980.

KUMAR, S; MATHUR, B. N. Incidence of Lp-system on the nutritional quality of milk proteins. **Indian J. Dairy Sci.** v. 42, p. 198-202, 1989.

KUSSENDRAGER, K. D.; VAN HOOIJDONK A. C. M. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.** v. 84, p. 519-525, 2000.

LARA, R. et al. Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of fresh-type cheese. **Milchwissenschaft**, v. 42, p. 773-775, 1987.

LENANDER-LUMIKARI, M. Inhibition of *Candida albicans* by the peroxidase thiocyanate hydrogen peroxide system. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 7, p. 315–320, 1992.

LIJINSKY, W.; KOVATCH, R. M. Chronic toxicity tests of sodium thiocyanate with sodium nitrate in F344 rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 5, p.25–29, 1989.

LIN, G.; CHOW, C. Studies on the lactoperoxidase system and its use in extending the storage period of cow's raw milk. **Journal of the Chinese Society of Animal Science**, v. 29, p. 89–99, 2000.

MARKS, N. E.; GRANDISON, A. S; LEWIS, M. J. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized skim milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 735–741, 2000.

MARSHALL, V. M.; PHILIPS, S. M.; TURVEY, A. Isolation of a hydrogen peroxide-producing strain of *Lactobacillus* from calf gut. **Research in Veterinary Science**, v. 32, p. 259-260, 1982.

MARSHALL, V. M.; REITER, B. Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 120, p. 513-516, 1980.

MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, Ill., US, v. 42, p. 165-168, 1988.

MARTINEZ, C. E. et al. Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, v. 51, p. 558-561, 1988.

MARTIN-HERNANDEZ, M. C.; MARKWIJK, B.W.; VREEMAN, H. J. Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, NL, v. 44, p. 213-231, 1990.

MATHUR, B. N.; CHOPRA R. Current issues concerning safety of Lp-system for preservation of raw milk. **Ind. Dairyman**, v. 47, p. 4-1 1, 1995.

MEHANNA, N. M.; HEFNAWY, S. A. Effect of thiocyanate- lactoperoxidase-hydrogen peroxide system on tite manufacture and properties of yoghurt. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, EG, v. 16, p. 55-63, 1988.

MEYERS, F. H.; JAMETZ, E.; GOLDEN, A. Thyroid and antithyroid drugs. In Review of Medical Pharmacology. **Large Medical Publications**. p. 349, 1978.

MONNOM, D. et al. Le système lactoperoxydase. **Annales de Médecine Vétérinaire**, Bruxelles, BE, v. 133, p. 125-140, 1989.

MURIUKI, H. et al. **The Policy Environment in the Kenya Dairy Sub-Sector: A Review**. Nairobi, MoA/KARI/ILRI Colaborative Research Report. Smallholder Dairy (Research and Development) Project, 2003.

NAIDU, A. S. **Lactoperoxidase: in natural food antimicrobial system**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. p. 103-132.

OZER, B. A. et al. Effects of lactoperoxidase and hydrogen peroxide on rheological properties of yoghurt. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, Inglaterra, GB, v. 70, n. 2, p. 227-232, 2003.

PEREZ, L. O. Efecto de inhibición del peróxido de hidrógeno sobre la enzima lactoperoxidasa de origen bovino y caprino. **Revista Biología**, La Habana, CU, v. 1, p. 13-20, 1987.

PERRAUDIN, J. P.; REITER, B. The role of lactoferrin and lactoperoxidase in reducing the activity of free radicals. In: INTERNATIONAL WHEY CONFERENCE, 2., 1997, Chicago, USA. **Proceedings...** Brussels: International Dairy Federation, 1998.

PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, H. R. Investigation of the antimicrobial activity of raw milk against several foodborne pathogens. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, n. 55, p. 249-252, 2000.

PONCE, C. P. Reports of field studies from Cuba and other South-American and central- American countries presented at the technical meeting on the benefits and potential risks of the LP-system of raw milk preservation. Rome, 28 Nov – 2 Dec, 2005.

PONCE, C. P. et al. Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda. **Unidad de Análisis y Tendencias en Salud**, La Habana, Cuba, v. 9, n. 5, Sept./Oct. 2005. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.htm>. Acesso em: 02 jun 2012.

PONCE, P. **Experiencia nacional e internacional de Cuba en la aplicación del sistema lactoperoxidasa para la conservación de leche cruda**. In: GLOBAL LACTOPEROXIDASE PROGRAME – Reunion Anual del grupo de Expertos Lactoperoxidasa, 2001, Havana: Cuba, 2001.

PONCE, P. La investigación e innovación tecnológica en el sector lechero: un enfoque en las condiciones del trópico americano. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE SALUD ANIMAL, 2., 2007, La Habana. **Resúmenes...** La Habana:, 2007. p. 10-13.

PONCE, P. et al. **Programa Integral para la mejora de la producción y calidad de la leche**. Registro de direito de autoria. CENSA, n. 363, 2004.

PORTMANN, A.; AUCLAIR, J. E. Relation entre la lacténine L₂ et la lactoperoxydase. **Lait, Les Ulis**, Franca, FR, v. 39, p. 147-158, 1959.

PRUITT, K. M.; KAMAU, D. N. The lactoperoxidase system of bovine and human milk. In *Oxidative Enzymes in Foods*. **Elsevier Appl. Sci**, p. 133-174, 1991.

PRUITT, K. M.; REITER, B. Biochemistry of peroxidase system antimicrobial effects. In: PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. (Ed.). **The Lactoperoxidase system: chemistry and biological significance**. New York: Marcel Dekker, 1985.

PURDY, M. A. et al. Effect of growth phase and cell envelop structure on susceptibility of *Salmonella typhimurium* to the lactoperoxidasehydrogen peroxide system. **Infection and Immunity**, Washington, US, n. 39, p. 1187-1195, 1983.

RAMET, J. P. Influence of sodium thiocyanate and percarbonate on the freezing point and on the sensory properties of milk. Ecole Nationale Superieur Agronomie et des Industries Agro limentaire (ENSAIA), Nancy, France. Technical paper presented at the Fifth Global Lactoperoxidase Experts Meeting. Capetown, South Africa, Nov. 2004.

REITER, B. Protective proteins in milk- biological significance and exploitation. **IDF Bulletin**, London, GB, n. 191, p. 1-35, 1985b.

REITER, B. Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, Inlaterra, GB, n. 45, p. 131-147, 1978.

REITER, B. The Contribution of milk to resistance to intestinal infection in the newborn. En: LAMBERT, H. P.; WOOD, C. B. S. (Ed.). **Immunological aspects of infection in the fetus and Newborn**. London: Academie Press, 1981.

REITER, B. The Lactoperoxidase system of bovine milk. En: PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. (Ed.). **The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance**. New York: Marcel Dekker, 1985a.

REITER, B. et al. Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. **Infection and Immunity**, Washington, US, n. 13, p. 800-807, 1976.

REITER, B.; HÄRNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, n. 47, p. 724-732, 1984.

REVOL-JUNELLES, A. M.; MILLIERE, J. B. **The lactoperoxidase system (LP-s) on milk preservation**: its use, antimicrobial activity and effects on milk products. Monograph, 2005.

ROGINSKI, H. et al. Non-phage inhibition of group N streptococci in milk II. The effect of some inhibitory compounds. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, Australia, AU, v. 39, p. 28, 1984.

SANDHOLM, M. et al. Glucose oxidase (GOD) as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antibacterial effect of the GOD-LPO system against mastitis pathogens. **Journal of Veterinary Medicine, Séries B**, Berlin, DE, n. 35, p. 346-352, 1988.

SANTOS, J. A. et al. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* and psychrotrophs during the manufacturing of the Spanish sheep fresh cheese Villalón. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, v. 50, n. 12, p. 690-692, 1995.

SARKAR, S.; MISRA, A. K. Implication of LP system on manufacture of fermented milk products. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, IN, v. 47, p. 133-139, 1994.

SARKAR, S.; MISRA, A. K. Utilization of milk preserved by LP system for manufacture of cultured milk products. **Indian Dairyman**, New Delhi, IN, v. 44, p. 536-540, 1992.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, Inglaterra, GB, n. 16, p. 137-154, 2005.

SHIN, K. et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and its urease activity to the peroxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system. **Journal of Medical Microbiology**, London, GB, n. 51, p. 231-237, 2002.

SHIN, K.; HAYASAWA, H.; LONNERDAL, B. Inhibition of *Escherichia coli* respiratory enzymes by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate antimicrobial system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 90, p. 489-493, 2001.

SIEVERS, G. The prosthetic group of milk lactoperoxidase is protoheme IX. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 579, p. 181, 1979.

SIIRTOLA, T. V. A. Report from field studies in Uganda presented at the technical meeting on the benefits and potential risks of the LP-system of raw milk preservation, Rome, 28 Nov – 2 Dec. 2005.

SIRAGUSA, R.; JOHNSON, M. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide antimicrobial system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, n. 55, p. 2802-2805, 1989.

SIVA, C. V.; UPADHYAY, K. G.; SANNABHADTI, S. S. Lactoperoxidase/thiocyanate/ H₂O₂ system, its uses and implications in manufacture of dairy products. **Indian Dairyman**, New Delhi, IN, n. 43, p. 240-246, 1991.

SLOWEY, R. R.; EIDELMAN, S.; KLEBANOFF, S. J. Antibacterial activity of the purified peroxidase from human parotid saliva. **Journal of Bacteriology**, v. 96, p. 575, 1968.

SMITH, J. L.; BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, v. 46, p. 545-555, 1983.

SOLER, D. M. **Desarrollo y evaluación de una nueva formulación farmacéutica del Stabilak a partir de una dosis menor de tiocianato**. 2004. Tesis (Doctor en Ciencias Veterinarias) – CENSA, La Habana.

STADHOUDERS, J.; BEUMER, R. R. Actual and potential applications of the natural antimicrobial agents of milk in the dairy industry. In: IDF SEMINAR ON INDIGENOUS ANTIMICROBIAL AGENTS OF MILK- RECENT DEVELOPMENTS, 1993. **Proceedings...**, Sweden, 1994. p. 175-197.

TENOVUO, J. O. The peroxidase systems in human secretions. In: PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. (Ed.). **The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance**. New York: Marcel Dekker Inc., 1985. p. 101-122.

THOMAS, E. L. Products of lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate and halides. In **The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance**. Marcel Dekker: New York. 1985, p. 31-53.

THOMAS, E. L.; AUNE, T. M. Lactoperoxidase, peroxide, thiocyanate antimicrobial system: correlations of sulfhydryl oxidation with antimicrobial action. **Infection and Immunity**, Washington, US, n. 20, p. 456-463, 1978.

THOMAS, E.; BATES, K.; JEFFERSON, M. Hypothiocyanate ion: detection of the antimicrobial agent in human saliva. **Journal of Dental Research**, Washington, US, n. 59, p. 1466-1472, 1980.

VAN HOOIJDONK, A. C. M.; KUSSENDRAGER, K. D.; STEIJNS, J. M. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrums involved in non-specific defence. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, Inglaterra, GB, v. 84, p. S127-134, 2000. Suppl. 1.

VILKKI, P.; PIIRONEN, E. Studies on the goitrogenic influence of cow's milk on man. **Annales Academiae Scientiarum Fennicae, Chemica, Series A 2**, Helsinki, FI, n. 110, p. 3-14, 1962.

WANG, H.; YE, X.; NG, T. First demonstration of an inhibitory activity of milk proteins against human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and the effect of succinylation. **Life Sciences**, Local, v. 67, n. 22, p. 2745-2752, 2000.

WILKINS, K. M.; BOARD, R. G. Natural antimicrobial systems: In: **Mechanisms of action of the food preservation procedures**. Elsevier Appl. Sci. London, 1989, p. 285-362.

WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, n. 56, p. 887-892, 1993.

WOOD, J. L. Biochemistry. En: NEWMAN, A. A. (Ed.). **Chemistry and biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives**. London : Academic Press, 1975.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Factors influencing the activity of cheese starters. The role of milk peroxidase. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, Inglaterra, GB, n. 25, p. 104-118, 1958.

ZAJAC, M.; BJORCK, L.; CLAEISSON, O. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Bacillus cereus*. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, v. 36, p. 417-418, 1981.

ZALL, R. R.; CHEN, J. H.; DZUREC, D. J. Effect of thiocyanate and hydrogen peroxide in cultured products. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, v. 38, p. 264-266, 1983b.

ZALL, R. R.; CITEN, J. H.; DZUREC, D. J. Effect of thiocyanate-lactoperoxidase- hydrogen peroxide system and farm heat treatment on the manufacturing of Cottage cheese and Cheddar cheese. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, v. 38, p. 203-206, 1983a.

ZAPICO, P. et al. Activity of goat's milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, US, n. 58, p. 1136-1138, 1995.

CAPÍTULO II

ARTIGO

ATIVAÇÃO DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE NA CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU PARA FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO

Ativação do sistema lactoperoxidase na conservação do leite cru para fabricação de Queijo de Coalho

Leandro Fragoso Lins¹, Severino Benone Paes Barbosa², Ângela Maria Vieira Batista², José do Egito de Paiva³

¹ Aluno Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil.

² Prof. Dr. Depto de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil

³ Prof. Dr. Depto de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil

RESUMO – Baseando-se na qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil e nas melhorias necessárias na qualidade higiênico-sanitária para atender à legislação vigente no país e colocar no mercado produtos de qualidade adequada, objetivou-se avaliar a adequação do leite cru preservado pelo sistema lactoperoxidase sob diferentes condições de conservação e armazenamento para fabricação de Queijo de Coalho. Foram realizadas três coletas distintas de leite cru, proveniente de uma propriedade leiteira da Zona da Mata de Pernambuco, e submetido a diferentes condições de conservação e armazenamento – ativação do sistema lactoperoxidase, refrigeração e pasteurização, totalizando oito tratamentos que foram processados para a fabricação de Queijo de Coalho. Foram analisados os efeitos da ativação do sistema lactoperoxidase e das condições de conservação e armazenamento sobre a atividade microbiana no leite e em seguida avaliados seus efeitos no rendimento da fabricação do queijo, nas propriedades físico-químicas e contagens microbiológicas de Coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*. Os tratamentos tiveram seus efeitos significativos determinados por análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. O sistema lactoperoxidase determinou efeito significativo ($P < 0,05$) apenas para *Staphylococcus* coagulase positiva no leite, com uma média 38,36% menor. Não foi observado efeito do sistema no rendimento da fabricação do queijo, porém sua interação com a refrigeração afetou o rendimento técnico e diminuiu a média do extrato seco. O sistema também provocou efeito ($P < 0,05$) na carga microbiana do queijo que apresentou médias de 14,13 a 30,02% menor quando fabricado a partir do leite preservado pelo sistema lactoperoxidase.

Palavras-chave: Lactoperoxidase, Pasteurização, Qualidade do leite, Queijo.

Activation of the lactoperoxidase system in raw milk preservation for manufacturing fresh cheese

Leandro Fragoso Lins¹, Severino Benone Paes Barbosa², Ângela Maria Vieira Batista²,
José do Egito de Paiva³

¹ Aluno Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil.

² Prof. Dr. Depto de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil

³ Prof. Dr. Depto de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil

ABSTRACT – Based on the poor quality of the milk produced in Brazil and in the necessary improvements in the sanitary conditions to meet the Brazilian legislation and market products of adequate quality, this study aimed to evaluate the adequacy of raw milk preserved by the lactoperoxidase system under different conditions of preservation and storage for manufacturing "Queijo de Coalho", a fresh cheese from northeastern of Brazil. Were performed three distinct collections of raw milk from a dairy farm in the Brazilian state of Pernambuco and submitted to different conditions of preservation and storage - activation of lactoperoxidase system, refrigeration and pasteurization, totaling eight treatments that were processed to manufacture cheese. Were analyzed the effects of the activation of the lactoperoxidase system and of the conditions of preservation and storage on microbial activity in milk and then evaluated its effects on the yield of cheese manufacturing, physico-chemical composition and in the microbiological counts of Coliforms at 45 °C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The treatments had significant effects determined by analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% significance. The lactoperoxidase system has determined a significant effect ($P < 0.05$) for *Staphylococcus* coagulase positive in milk with mean 38.36% lower. There was no effect of the system lactoperoxidase on the yield of cheese manufacturing, but its interaction with the refrigeration affected the technical yield and decreased the mean of the dry matter content. The system also caused an effect ($P < 0.05$) in the microbial load of the cheese that showed mean of 14.13 to 30.02% lower when produced from milk preserved by the lactoperoxidase system.

Keywords: Lactoperoxidase, Pasteurization, Quality of milk, Cheese.

1. Introdução

O queijo foi utilizado ao longo do tempo como uma forma de preservação do leite e, atualmente, é o derivado lácteo mais produzido mundialmente. Com um processo básico de fabricação comum a quase todos os tipos de queijos, porém com variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação, é produzida uma variedade de queijos. A Food and Agriculture Organization – FAO (1990), em uma publicação sobre tecnologia de produtos lácteos tradicionais produzidos em países em desenvolvimento, cita o Queijo de Coalho como um produto originado no Nordeste do Brasil, sendo fabricado principalmente nos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte. Produzido há mais de 150 anos em vários estados da Região Nordeste (CAVALCANTE et al., 2007), o Queijo de Coalho é um dos mais tradicionais e, pela simplicidade de sua tecnologia, é amplamente fabricado e consumido em todo o país.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, publicado na Instrução Normativa N° 30, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001b), “entende-se por Queijo de Coalho, o produto que se obtém da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação”. E, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, publicado na Portaria N° 146, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), o leite destinado à fabricação do queijo deverá obrigatoriamente ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico

equivalente, combinado ou não com outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto.

Apesar da legislação brasileira estabelecer que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização (BRASIL, 1996), somente as unidades produtoras sob inspeção federal é que promovem o tratamento térmico do leite. Porém, a fabricação de Queijo de Coalho em indústrias regulamentadas não é realizada de forma permanente; uma vez que nelas predominam a fabricação de queijos padronizados tipos Minas, Prato e Mussarela (ANDRADE, 2006). A maior parte do Queijo de Coalho produzido no Nordeste, segundo Sena et al. (2000), é proveniente de fabricação artesanal elaborado com leite cru em pequenas unidades, sem inspeção, ou em médias empresas, regulamentadas e inspecionadas por órgãos estaduais. Araújo e Nassu (2002) também confirmaram a falta de padronização nas operações de elaboração do Queijo de Coalho, assim como a ampla variação físico-química do leite utilizado na sua fabricação, o qual não sofre nenhum tipo de padronização. A própria Legislação Estadual de Pernambuco, na Resolução Nº 002, da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (PERNAMBUCO, 1999), permite que o Queijo de Coalho seja produzido com leite *in natura* (cru).

No Brasil, coliformes e *Escherichia coli* são detectados com frequência em vários tipos de queijos. Em Queijo de Coalho, a ocorrência de coliformes fecais em níveis superiores ao permitido pela legislação (BRASIL, 2001b) tem sido relatada em vários estudos (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003 e BRUNO et al., 2005). Considerando a importância de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira (BRASIL, 2001b) estabelece ausência deste patógeno em 25g de amostra. Entretanto a incidência de *Listeria monocytogenes* em Queijos de Coalho tem

apresentado uma ampla variação (zero a 50%) nos estudos já realizados (LEITE et al., 2002; FEITOSA et al., 2003 e BRANCO et al., 2003). Vários estudos também têm apontado à presença de *Salmonella* spp. em queijos, principalmente em Queijo de Coalho artesanal (MENDES et al., 1999; NASSU et al., 2001; BORGES et al., 2003 e ARAÚJO et al., 2004). Além da ocorrência de altos níveis de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* (BORGES et al., 2003 e FEITOSA et al., 2003). Na maioria dos estudos em questão, os queijos foram classificados como impróprios para o consumo humano, dada a constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação (BRASIL, 2001b). Essa situação representa um risco em potencial para a saúde do consumidor, devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos.

No Brasil é necessário não só tratar o leite termicamente para a produção de queijos e derivados, mas também exercer um controle efetivo e sistemático da matéria-prima desde o início da produção. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento vem trabalhando essa problemática desde a antiga Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002, onde estabeleceu requisitos mínimos de qualidade para o leite cru nas propriedades rurais, incluindo, pela primeira vez na legislação brasileira, limites máximos para CCS, que em 2011 deveria ser de 400.000 céls./mL (BRASIL, 2002) e recentemente sua atualização para Instrução Normativa Nº 62 com novos limites máximos para CCS e CPP (BRASIL, 2011).

Porém, a qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema em que fatores de ordem social, cultural e econômica estão envolvidos. Fatores de ordem técnica e econômica relacionados à disponibilidade e regularidade no fornecimento de energia elétrica para a refrigeração do leite logo após a ordenha e o período de tempo

transcorrido desde o transporte do leite das pequenas propriedades leiteiras até os pontos de coleta, onde o resfriamento é feito mediante a utilização de tanques comunitários, podem afetar a qualidade do leite a ser processado. É nesse contexto que o sistema lactoperoxidase (LP) tem sido objeto de uma ampla investigação nos últimos 50 anos como um método de conservação complementar e alternativo à refrigeração do leite, sendo aprovado como método de conservação do leite cru pelo Codex Alimentarius, em 1991 (CAC, 1991).

O sistema LP é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária de todos os mamíferos, sendo composto pela enzima lactoperoxidase, uma proteína sintetizada na glândula mamária, por íons tiocianato (SCN^-), originados do metabolismo hepático e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e de outras células (DE WIT; VAN HOOIJDONK, 1996; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000). A ativação exógena do sistema LP no leite gera uma ação do tipo bacteriostática e/ou bactericida, que limita o crescimento da população das bactérias contaminantes e a produção de ácidos, permitindo, com isso, que a qualidade microbiológica e físico-química da matéria-prima se mantenha por maior período de tempo (ORAM; REITER, 1966; BJORCK, 1978; KUSSENDRAGER; VAN HOOIJDONK, 2000 e PONCE, 2010). Com base nesses estudos, reconhece-se nesse método um importante potencial de utilização em condições de limitações de infraestrutura de refrigeração e outras situações (FAO/WHO, 2006).

Tendo em vista as projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o aumento da produção mundial de queijos que deverá alcançar 21,3 milhões de toneladas em 2016 (BRASIL, 2008); a importância regional do Queijo de Coalho por se tratar de um produto de grande aceitação e consumo, além de

representar uma fonte de renda e geração de trabalho para pequenos e médios produtores rurais (SEBRAE, 1998); e as melhorias necessárias na qualidade higiênico-sanitária para atender à legislação vigente no país e colocar no mercado um produto de qualidade adequada, é que se objetivou avaliar a adequação do leite cru preservado pelo sistema lactoperoxidase sob diferentes condições de conservação e armazenamento para fabricação de Queijo de Coalho.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta do leite e tratamento das amostras

O leite utilizado no estudo foi proveniente de uma propriedade leiteira com rebanho mestiço Holandês-Zebu, localizada na Zona da Mata de Pernambuco. A propriedade apresentava manejo tradicional com utilização de ordenha mecânica, tanque de expansão para resfriamento do leite e práticas de higienização nos procedimentos de ordenha.

Foram realizadas três coletas distintas de 200 L de leite entre o período de fevereiro e março de 2012. As coletas foram feitas logo após a ordenha e o leite foi armazenado em quatro tonéis de 50 L. No momento da coleta, a temperatura e o pH do leite foram medidos e uma alíquota de 55 mL, em duplicata, foram coletadas para análises físico-químicas e microbiológicas.

2.1.1. Ativação do sistema lactoperoxidase

Após a coleta, ainda na propriedade, o leite foi submetido a dois tratamentos diferentes: com e sem o sistema LP ativado. Para ativação do sistema LP foi utilizado o produto STABILAK®, um ativador comercial apresentado em doses em pó para 50 L

de leite, sendo um sachê com 0,36g de tiocianato de sódio e outro sachê com 1,36g de percarbonato de sódio (fonte alternativa de peróxido de hidrogênio), ambos seguindo as concentrações estabelecidas pelo Codex Alimentarius (CAC, 1991). O procedimento de ativação seguiu as recomendações do fabricante do produto (CENSA, 2011).

2.1.2. Temperatura de armazenamento – Refrigeração

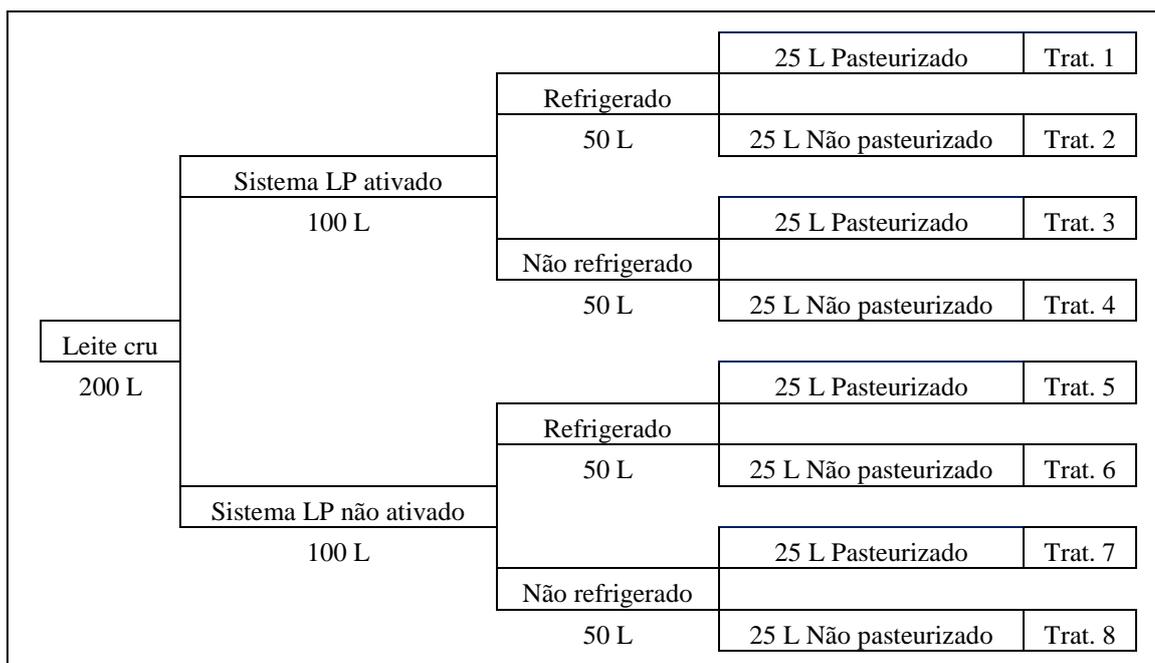
Cada tratamento anterior foi submetido a duas temperaturas diferentes: 50 L de leite com o sistema LP ativado foi submetido à temperatura de refrigeração (2-4°C) e 50 L mantido sob temperatura ambiente (28-30°C), o mesmo ocorreu com o tratamento sem o sistema LP ativado. Os quatro tratamentos foram submetidos ao mesmo tempo de armazenamento de 4 horas, que deu início logo após a ativação do sistema LP. Os procedimentos foram realizados de acordo com o Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, Anexo VI da Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2011).

2.1.3. Tratamento térmico – Pasteurização

No Laboratório de Processamento e Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia Rural, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, o leite foi recebido e permaneceu em suas temperaturas de armazenamento iniciais. Após finalizar o tempo de armazenamento de 4 horas, cada tratamento foi submetido a duas novas condições: 25 L de leite foi pasteurizado, em um pasteurizador industrial compacto, a 72°C por 15 segundos e 25 L permaneceu sem a pasteurização. A eficiência da pasteurização foi avaliada mediante análises de fosfatase alcalina e peroxidase, seguindo o método da AOAC 979.13 (J. AOAC Int., 2000).

O leite coletado inicialmente (200 L) foi submetido a diferentes condições de armazenamento e conservação, resultando em oito tratamentos distintos de 25 L de leite cada (Figura 1).

Figura 1 – Amostras de leite disponíveis para o processamento com diferentes tratamentos



Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Novas coletas de alíquotas de 55 mL, em duplicata, de cada tratamento, foram realizadas para as análises físico-químicas e microbiológicas, permitindo assim uma primeira análise comparativa do efeito dos tratamentos no leite coletado inicialmente.

2.2. Análises físico-químicas e microbiológicas do leite

As análises do leite foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite, do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), integrante da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), localizado no Departamento de Zootecnia, da UFRPE. As determinações físico-químicas seguiram os

métodos analíticos de referência estabelecidos na Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2011). Temperatura, pH, densidade relativa a 15°C, acidez titulável e teste do Alizarol na concentração mínima de 72%v/v foram realizados inicialmente e, em seguida, as determinações dos valores percentuais de gordura, proteína, lactose e sólidos totais foram feitas por espectrofotometria de radiação infravermelha pelo equipamento Combi 2300, da Bentley Instruments® (BENTLEY, 1998).

Quanto as análises microbiológicas, a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo utilizando os equipamentos Bactocount IBC e Somacount 300, da Bentley Instruments®, respectivamente (BENTLEY, 2002). A técnica consiste na adição de um corante fluorescente ao leite, o brometo de etídio, para que o DNA e RNA das bactérias sejam corados e quantificados pelo sistema óptico do equipamento (BENTLEY, 2002).

No Laboratório de Processamento e Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia Rural da UFRPE foram efetuadas as demais análises microbiológicas para Coliformes a 45°C, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, assim como exigidas no Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos da Resolução RDC N° 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001b).

Nas análises de Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* foram utilizadas placas 3M™ Petrifilm™ EC para contagem de coliformes com diferenciação de *E.coli*, e de acordo com o método oficial da AOAC 2000.15 – Enumeração rápida de coliformes em alimentos (J. AOAC Int., 2002). As análises de *Staphylococcus* coagulase positiva foram realizadas com placas 3M™ Petrifilm™ para contagem rápida de *Staphylococcus aureus* e disco reativo de TNase para prova de confirmação de coagulase positiva,

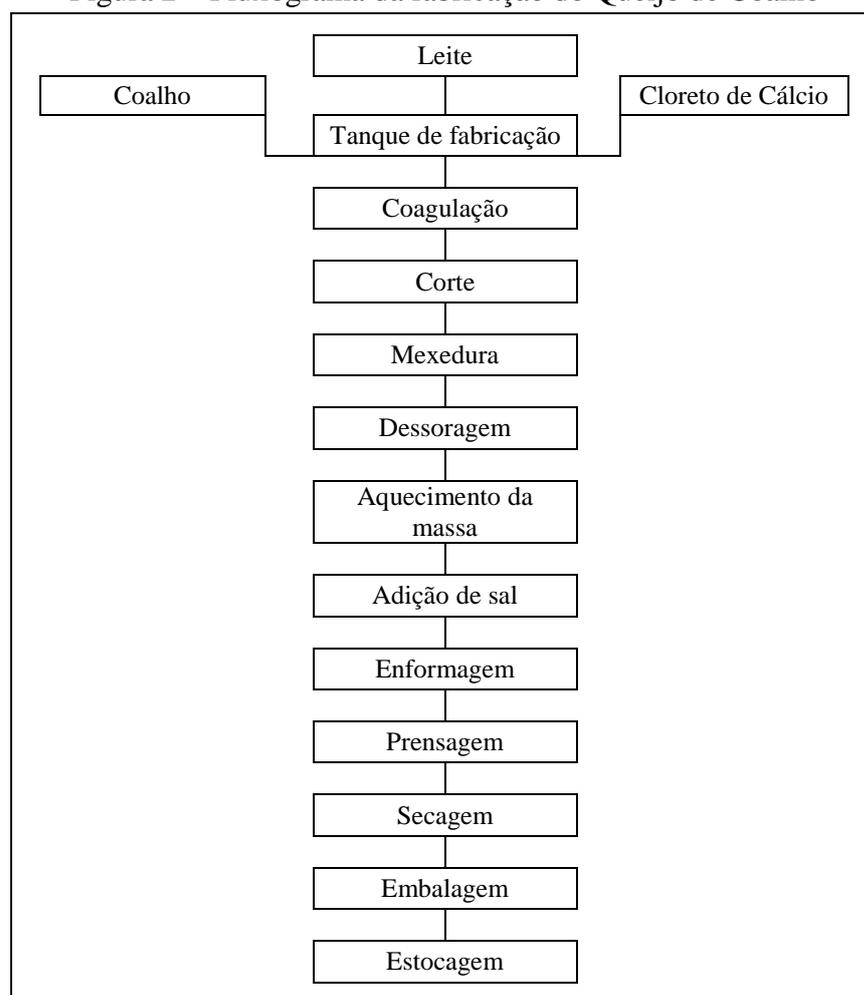
seguindo o método oficial da AOAC 2001.05 (J. AOAC Int., 2001). Análises para confirmação de presença ou ausência de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* foram realizadas utilizando, respectivamente, o kit 3M™ TECRA™ Salmonella VIA e 3M™ TECRA™ Listeria VIA, ambos baseado na técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), e de acordo com os métodos oficiais da AOAC 989.14 (J. AOAC Int., 1988) e AOAC 995.22 (J. AOAC Int., 1996), respectivamente.

2.3. Processamento do leite para fabricação do Queijo de Coalho

O processamento do leite para fabricação do Queijo de Coalho foi realizado no Laboratório de Processamento e Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia Rural da UFRPE, seguindo recomendações do Regulamento técnico de identidade e qualidade de Queijo de Coalho, da Instrução Normativa Nº 30, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001a), e de acordo com o fluxograma da Figura 2.

Para cada amostra/tratamento foram processados 20 L de leite. O processamento iniciou-se com a etapa de coagulação, onde o leite recebeu a adição do coalho (6 mL de coalho industrial + 120 mL de água) e do cloreto de cálcio (8 mL de cloreto de cálcio + 120 mL de água) e permaneceu em repouso por aproximadamente 40 minutos até o ponto de corte. Realizou-se o corte da massa/coalhada, linhas paralelas em sentido horizontal e vertical, formando cubos de aproximadamente 3 cm. Após 5 minutos de repouso, procedeu-se a mexedura da massa/coalhada de forma lenta e uniforme para que os cubos não se tornassem muito pequenos prejudicando assim o rendimento. Mais 15 minutos de repouso foi determinado para ocorrer a decantação da massa/coalhada, devido a sua maior rigidez, e o soro mais definido começar a se separar.

Figura 2 – Fluxograma da fabricação do Queijo de Coalho



Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Em seguida, realizou-se a remoção parcial do soro, e esse mesmo soro foi utilizado no processo de aquecimento e salga da massa. Adicionou-se ao soro 200 g de sal (NaCl) e o mesmo foi aquecido a 45°C, retornando a massa para salgá-la e aquecê-la, obtendo assim uma massa semi-cozida. Essa massa foi então colocada em fôrmas plásticas retangulares de 1 kg, apropriadas para queijos com dessorador e prensador, devidamente higienizadas. O processo de prensagem ocorreu em prensa semi-industrial e um isolamento físico foi realizado, evitando o contato de um queijo com o soro de outro queijo. A prensagem e secagem foram realizadas no período total de 5 horas, sendo 2 horas iniciais, uma viragem dos queijos e mais 3 horas finais. Em seguida, os

queijos foram desenformados, imediatamente acondicionados em embalagens plásticas seladas, pesados para anotação do peso final e estocados em temperatura média de 10°C.

Todo o processamento para a fabricação do Queijo de Coalho foi realizado por uma equipe de oito pessoas, devidamente treinadas e cientes das boas práticas de higiene e manipulação de alimentos. Todos os utensílios usados durante o processamento foram previamente higienizados, seguindo procedimentos padrões de higienização e com sanitizante adequado (hipoclorito de sódio). Todos os procedimentos foram realizados de forma individual para cada amostra/tratamento, evitando assim o contato e a contaminação entre tratamentos.

2.4. Análise de rendimento da fabricação do Queijo de Coalho

O rendimento da fabricação do Queijo de Coalho foi analisado por dois parâmetros: o rendimento econômico e o rendimento técnico, segundo Furtado (2005).

O rendimento econômico é a relação de litros de leite necessários para se elaborar um kg de queijo. Esse rendimento foi calculado nos diferentes tratamentos pela fórmula:

$$\text{Rendimento econômico} = L / \text{kg}$$

Onde L corresponde ao volume utilizado (leite + ingredientes) e kg é o peso do queijo terminado.

O rendimento técnico leva em consideração a composição físico-química do queijo e pode alterar substancialmente o rendimento econômico. O rendimento técnico em questão, que foi aplicado, é também conhecido como Coeficiente GL. Esse

coeficiente determina o aproveitamento final de sólidos totais no queijo em relação a cada litro de leite utilizado, ou seja:

$$g \text{ ST} / \text{L} = \text{ST} \times \text{P} \times 10 / \text{V}$$

Onde $g \text{ ST} / \text{L}$ é gramas de sólidos totais por 1 litro de leite (Coeficiente GL), ST é sólidos totais do queijo, P é o peso do queijo em kg e V é o volume de leite utilizado (leite + ingredientes).

2.5. Análises físico-químicas e microbiológicas do Queijo de Coalho

Um dia após a fabricação, os queijos foram analisados. Os tratamentos apresentavam duas ou três peças de queijos, que variava de acordo com o rendimento de cada tratamento. Nesse sentido, buscando obter uma única amostra composta, foram realizados os procedimentos de amostragem de acordo com a ISO 707| IDF 50 (2008).

As análises físico-químicas foram realizadas seguindo os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos, da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – Laboratório Nacional de Referência Animal (BRASIL, 2006). As determinações de pH foram realizadas pelo método eletroanalítico, a acidez pelo método ponderal, o extrato seco por meio do método gravimétrico, a umidade por método indireto, a gordura pelo método Van Gulik, a gordura no extrato seco e o extrato seco desengordurado por método indireto, a proteína pelo método de nitrogênio total de Kjeldahl e determinada indiretamente pelo fator de conversão ($F = 6,38$) da relação nitrogênio/proteína, e o cloreto de sódio pelo método de doseamento nas cinzas.

As análises microbiológicas realizadas foram as exigidas no Regulamento técnico geral para fixação de requisitos microbiológicos de queijos publicado na

Portaria Nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996).

Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* foram analisados utilizando placas 3M™ Petrifilm™ EC para contagem de coliformes com diferenciação de *E.coli*, e de acordo com o método oficial da AOAC 2000.15 – Enumeração rápida de coliformes em alimentos (J. AOAC Int., 2002). *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizado com placas 3M™ Petrifilm™ para contagem rápida de *Staphylococcus aureus* e disco reativo de TNase para prova de confirmação de coagulase positiva, seguindo o método oficial da AOAC 2001.05 (J. AOAC Int., 2001). Confirmação de presença ou ausência de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* foram realizadas utilizando o kit 3M™ TECRA™ Salmonella VIA e 3M™ TECRA™ Listeria VIA, ambos baseado na técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA), e de acordo com os métodos oficiais da AOAC 989.14 (J. AOAC Int., 1988) e AOAC 995.22 (J. AOAC Int., 1996), respectivamente.

2.6. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x2, com oito tratamentos e três repetições no tempo, segundo modelo abaixo:

$$\hat{Y}_{ijk} = \mu + S_i + R_j + P_k + (S*R)_{ij} + (R*P)_{jk} + (S*P)_{ik} + (S*R*P)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

μ é a média;

S_i é o efeito da i-ésima Sistema LP (i = ativado ou não ativado);

R_j é o efeito da j-ésima Refrigeração (j = refrigerado ou não refrigerado);

P_k é o efeito da k-ésima Pasteurização (k = pasteurizado ou não pasteurizado);

$(S*R)_{ij}$ é o efeito da interação Sistema LP x Refrigeração;

$(R*P)_{jk}$ é o efeito da interação Refrigeração x Pasteurização;

$(S*P)_{ik}$ é o efeito da interação Sistema LP x Pasteurização;

$(S*R*P)_{ijk}$ é o efeito da interação Sistema LP x Refrigeração x Pasteurização;

ε_{ijk} é o erro aleatório.

As fontes de variação Sistema LP, Refrigeração, Pasteurização e suas interações, tiveram seus efeitos significativos determinados por análise de variância. As médias da contagem microbiológica do leite, rendimento da fabricação do queijo, composição físico-química do queijo e contagem microbiológica do queijo foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Ambos realizados por meio do procedimento GLM do SAS (2007).

Para normalizar a distribuição dos dados microbiológicos, os resultados de contagem microbiológica do leite e do queijo foram transformados para logaritmo na base 10 (Log_{10} UFC/mL ou g).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises da matéria-prima

Tendo em vista a importância da qualidade inicial da matéria-prima, são apresentadas na Tabela 1 as composições físico-química e contagens microbiológicas do leite cru coletado na fazenda e utilizado para compor os diferentes tratamentos.

O leite utilizado apresentou-se com seus requisitos físicos, químicos e microbiológicos de acordo com o exigido pela Instrução Normativa Nº 62 (BRASIL, 2011).

Tabela 1 – Composição físico-química e contagem microbiológica do leite cru coletado em propriedade da Zona da Mata de Pernambuco entre fevereiro e março de 2012 e os respectivos valores de referência da Instrução Normativa N° 62

| Composição físico-química | Média | IN N°62 |
|---|--------------|-----------------------------------|
| pH | 6,7 | Não consta |
| Densidade relativa (g/mL) | 1,032 | 1,028 a 1,034 |
| Acidez titulável (g Ác. Lát./100mL) | 0,16 | 0,14 a 0,18 |
| Gordura (%) | 4,07 | Mín. 3,0 g/100g |
| Proteína (%) | 3,37 | Mín. 2,9 g/100g |
| Lactose (%) | 4,62 | Não consta |
| Sólidos totais (%) | 12,94 | Não consta |
| Contagem microbiológica | Média | IN N°62 |
| CCS (Log ₁₀ UFC/mL) | 5,51 | 5,90 (7,5x10 ⁵ UFC/mL) |
| CBT (Log ₁₀ UFC/mL) | 4,87 | 5,90 (7,5x10 ⁵ UFC/mL) |
| Coliformes a 45°C (Log ₁₀ UFC/mL) | 1,82 | Não consta |
| <i>E.coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL) | 0,88 | Não consta |
| <i>Staphylococcus coag. pos.</i> (Log ₁₀ UFC/mL) | 2,39 | Não consta |
| <i>Salmonella spp.</i> (Ausente em 25g) | Aus. | Não consta |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (Ausente em 25g) | Aus. | Não consta |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: Média das três coletas realizadas em tempos diferentes.

IN N° 62 – Valores para regiões Norte e Nordeste até 31 de dezembro de 2012.

Não consta – informação não é abordada pela IN N°62.

Destacando a análise microbiológicos, a média da Contagem Bacteriana Total (CBT), também denominada Contagem Padrão em Placas (CPP) pela IN N° 62, foi $7,9 \times 10^4$ UFC/mL (4,87 Log₁₀) e a média da Contagem de Células Somáticas (CCS) foi $3,5 \times 10^5$ UFC/mL (5,51 Log₁₀), ambas abaixo dos valores estabelecidos pela IN N° 62, no período em questão (até 31 de dezembro de 2012 para regiões Norte Nordeste), que era de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL tanto para CPP quanto para CCS (BRASIL, 2011).

Como esperado, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* foram ausentes em todas as amostras coletadas e analisadas.

3.2. Análises microbiológicas do leite

Analisando o efeito das fontes de variação na contagem microbiológica do leite após 4 horas dos diferentes tratamentos (Sistema LP x Refrigeração x Pasteurização), tem-se na Tabela 2 os resumos das análises de variância em questão.

Tabela 2 – Análise de variância para contagem microbiológica do leite nos diferentes tratamentos

| Fonte de Variação | GL | Coliformes a 45°C (QM) | <i>E.coli</i> (QM) | <i>Staphylococcus coag. pos.</i> (QM) |
|--------------------|----|---------------------------|-----------------------|--|
| Sistema LP | 1 | 2,17803750 | 0,18200417 | 8,35440000* |
| Refrigeração | 1 | 47,51720417* | 4,05903750 | 10,14000000* |
| Pasteurização | 1 | 85,46600417* | 7,94650417 | 34,65606667* |
| SistLP*Refrig | 1 | 0,00220417 | 0,00303750 | 0,00481667 |
| Refrig*Past | 1 | 25,11260417* | 0,42400417 | 8,71215000* |
| SistLP*Past | 1 | 1,44550417 | 0,87783750 | 2,54801667 |
| SistLP*Refrig*Past | 1 | 0,2460375 | 1,71200417 | 0,09126667 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: SistLP*Refrig = efeito da interação Sistema LP x Refrigeração

QM (Quadrado Médio) seguido de (*) indica efeito significativo a 5% de probabilidade - Teste de Tukey.

A fonte de variação Sistema LP exerceu efeito significativo ($P < 0,05$) sobre o *Staphylococcus* coagulase positiva. Refrigeração e Pasteurização foram importantes no efeito para *Staphylococcus* coagulase positiva, entretanto foi considerado apenas a interação Refrigeração x Pasteurização com efeito significativo ($P < 0,05$) sobre *Staphylococcus* coagulase positiva. A Refrigeração e Pasteurização também determinaram efeito sobre os Coliformes a 45°C, mas foi considerado apenas a interação Refrigeração x Pasteurização com efeito significativo ($P < 0,05$) sobre os Coliformes a 45°C.

O teste de comparação de médias para as contagens microbiológicas do leite que apresentaram efeito significativo é observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação de médias da contagem microbiológica do leite nos diferentes tratamentos

| | | Coliformes a 45°C Log ₁₀ UFC/mL | <i>Staphylococcus coag. pos.</i> Log ₁₀ UFC/mL |
|-------------------------------------|-------------|---|--|
| Sistema LP | | | |
| | Ativado | Ns | 1,87 a |
| | Não ativado | Ns | 3,05 b |
| Refrigeração * Pasteurização | | | |
| Sim | Sim | 1,16 a | 1,21 a |
| Sim | Não | 2,89 a | 2,41 a |
| Não | Sim | 1,93 a | 1,31 a |
| Não | Não | 7,75 b | 4,92 b |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: ns = efeito não significativo

Médias com letras diferentes na coluna diferem estatisticamente a 5% de probabilidade – Teste de Tukey

O sistema LP é basicamente bacteriostático contra *Staphylococcus* no leite, entretanto alguns autores (KAMAU; DOORES; PRUITT, 1990) também pontuam como sendo bactericida. Assim, pode ser observado (Tabela 3) que o tratamento com o Sistema LP Ativado apresentou média inferior para a população de *Staphylococcus* coagulase positiva em relação ao tratamento Não Ativado, com uma diferença de mais de 1 Log, o que representa 38,36% menos.

O efeito do sistema LP sobre *Staphylococcus* em leite de vaca tem sido reportado por diversos estudos (KAMAU; DOORES; PRUITT, 1990; KANGUMBA; VENTER; COETZER, 1997; MARKS; GRANDISON; LEWIS, 2001; SEIFU et al., 2004; PONCE et al., 2010). Entretanto, o percentual de redução observado nesse estudo é semelhante ao encontrado por Seifu et al. (2004) que foi de 41% para redução de *Staphylococcus* no leite ativado após 6 horas de incubação em temperatura ambiente.

No efeito da interação Refrigeração x Pasteurização sobre *Staphylococcus* coagulase positiva, as médias dos tratamentos não diferiram entre si, exceto para o

tratamento sem refrigeração e sem pasteurização que apresentou média de 4,92 Log₁₀ UFC/mL (Tabela 3). As médias dos tratamentos com pasteurização foram mais baixas, uma vez que a pasteurização consegue destruir esse patógeno. Também, de acordo com a pesquisa de Sarkar e Misra (1994), quando o leite cru foi ativado pelo sistema LP antes da pasteurização, uma melhoria na qualidade do leite pasteurizado foi observada, provavelmente devido à redução da resistência ao calor de alguns microrganismos.

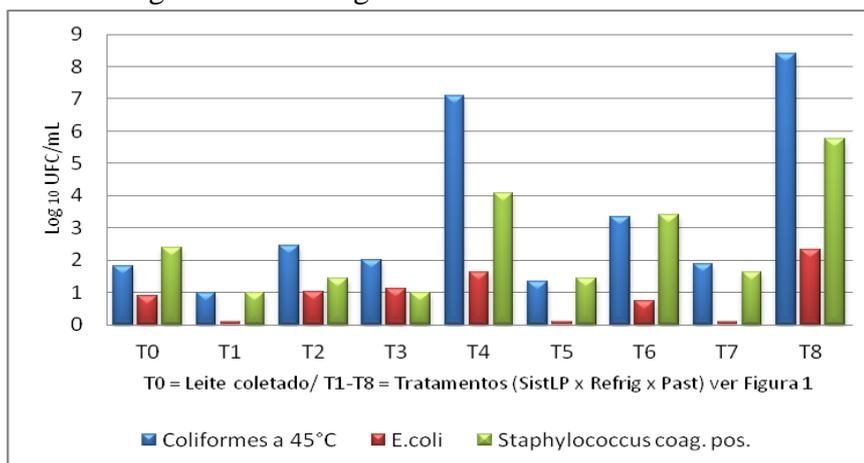
Para Coliformes a 45°C, o efeito da interação Refrigeração x Pasteurização também determinou diferença entre médias ($P < 0,05$) apenas do tratamento sem refrigeração e sem pasteurização, com uma média de 7,75 Log₁₀ UFC/mL (Tabela 3), chegando a ser em alguns casos até seis vezes maior que outros tratamentos.

Embora o sistema LP não tenha provocado efeito significativo ($P < 0,05$) sobre as concentrações de Coliformes a 45°C e *E. coli*, as médias desses microrganismos nos tratamentos com Sistema LP Ativado foram sempre menores que os tratamentos Não Ativado (Apêndice – Tabela 10).

Na Figura 2 pode ser melhor visualizado, onde observa-se o desenvolvimento da população microbiana desde o leite coletado (T0) e após as 4 horas sob os diferentes tratamentos. Os tratamentos T1 a T4 possuem o Sistema LP Ativado e visivelmente apresentam médias para Coliformes a 45°C, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva menores que os tratamentos T5 a T8 com o Sistema LP Não Ativado. Mesmo não sendo detectadas diferenças significativas, as médias de Coliformes a 45°C para os tratamentos com Sistema LP Ativado e Não Ativado foram de 3,14 e 3,74 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente, o que representou 16,04% a menos para os tratamentos ativados. Essa redução corrobora com o resultado de Ponce et al. (2010) que relataram 10,62% a menos para Coliformes em leite de tanque ativado pelo sistema LP e mantido

a temperatura ambiente por um período de 3 horas. Os mesmos autores observaram que o efeito foi mínimo nas primeiras horas de incubação, mas sofreu aumento gradativo, chegando a um percentual de redução de 35% após 8 horas.

Figura 2 – Contagem microbiológica do leite nos diferentes tratamentos



Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Diferentes grupos de bactérias mostram um grau variável de sensibilidade ao sistema LP, e o sistema por sua vez pode possuir ação bacteriostática e/ou bactericida, mas que vai depender de condições do meio, como pH, temperatura e tempo de incubação (REITER et al., 1976; KUSSENDRAGER; HOOIJDONK, 2000), o que pode justificar a ausência de efeito significativo do sistema LP sobre os Coliformes a 45°C e *E. coli* no leite avaliado.

Farrag, ElGazzar e Marth (1992) relataram que a inativação de *E. coli* pelo sistema LP em leite de vaca foi inversamente proporcional a temperatura de incubação. Ou seja, quanto maior a temperatura de incubação, menor o efeito inibitório. Seifu et al. (2004) estudando a ativação do sistema LP em leite de cabra também não encontraram efeito inibitório total para Coliformes e atribuíram à alta temperatura de incubação (30°C). Por outro lado, diversos estudos (HARNULV; KANDASAMY, 1982; PONCE

et al., 2005; LUDENÑA et al., 2006; ASAAH, et al., 2007) comprovam que o sistema LP é um eficiente método para manter a qualidade do leite cru armazenado sob temperatura ambiente.

3.3. Análise de rendimento da fabricação do Queijo de Coalho

As fontes de variação Pasteurização e a interação Sistema LP x Refrigeração foram significativas ($P < 0,05$) para o Coeficiente GL (Tabela 4), também conhecido como rendimento técnico, onde leva em consideração o aproveitamento final de sólidos totais no queijo em relação a cada litro de leite utilizado. Nenhuma fonte de variação exerceu efeito significativo para o rendimento econômico (L/kg), conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Análise de variância para o rendimento econômico e Coeficiente GL na fabricação do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos

| Fonte de Variação | GL | L/kg (QM) | Coeficiente GL (QM) |
|---------------------------|----|--------------|------------------------|
| Sistema LP | 1 | 0,32900417 | 1,4406000 |
| Refrigeração | 1 | 0,69020417 | 4,2168167 |
| Pasteurização | 1 | 0,25010417 | 126,6841500* |
| SistLP*Refrig | 1 | 0,95600417 | 160,0633500* |
| Refrig*Past | 1 | 0,18200417 | 5,5296000 |
| SistLP*Past | 1 | 0,01083750 | 0,0048167 |
| SistLP*Refrig*Past | 1 | 0,00050417 | 5,1152667 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: Coeficiente GL = gramas de sólidos totais por 1 litro de leite

SistLP*Refrig = efeito da interação Sistema LP x Refrigeração

QM (Quadrado Médio) seguido de (*) indica efeito significativo a 5% de probabilidade - Teste de Tukey.

Esses efeitos significativos foram, possivelmente, acarretados por alterações nos teores de extrato seco dos queijos dos respectivos tratamentos, uma vez que o Coeficiente GL leva em consideração o aproveitamento dos sólidos totais. As médias do Coeficiente GL estão relatadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação de médias do Coeficiente GL da fabricação do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos

| | | Coeficiente GL |
|----------------------------------|-----|----------------|
| Pasteurização | | |
| | Sim | 60,73 a |
| | Não | 65,33 b |
| Sistema LP * Refrigeração | | |
| Ativado | Sim | 61,11 |
| Ativado | Não | 65,44 |
| Não ativado | Sim | 65,79 |
| Não ativado | Não | 59,79 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: Coeficiente GL = gramas de sólidos totais por 1 litro de leite

Médias com letras diferentes na coluna diferem estatisticamente a 5% de probabilidade – Teste de Tukey

Os tratamentos não influenciaram o rendimento econômico do leite, corroborando com os resultados de Seifu et al. (2004) que trabalhando com Queijo Gouda não observaram diferença significativa no rendimento entre o queijo feito de leite preservado pelo sistema LP e o queijo controle. Entretanto, outros autores apontam resultados contrários, a exemplo de Lara et al. (1987), onde relatam que os rendimentos para queijo fresco (medido em base de matéria seca ou umidade) feito com leite tratado pelo sistema LP foram significativamente maiores que o queijo feito com leite controle e que mais de 2 kg de queijo extra foram recuperados por meio da utilização do sistema LP por cada 100 kg de leite. Por outro lado, o estudo de Hefnawy, Ewais e Abd ElSalam (1986) aponta um rendimento inferior para queijos macios feitos a partir de leite preservado pelo sistema LP comparado com o queijo controle.

De modo geral, os resultados apresentados em estudos sobre o rendimento da fabricação de queijos feitos a partir de leite preservado pelo sistema LP ainda são muito controversos. As diferenças relatadas são irrelevantes quando se pensa em uma produção de escala.

3.4. Análises físico-químicas do Queijo de Coalho

A composição físico-química do Queijo de Coalho fabricado de acordo com os diferentes tratamentos sofreu alguns efeitos significativos de algumas fontes de variação, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise de variância para composição físico-química do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos

| Fonte de Variação | GL | pH (QM) | Acidez (QM) | Extrato seco (QM) | Umidade (QM) | Gordura (QM) |
|--------------------|----|-------------|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Sistema LP | 1 | 0,13500000 | 0,04506667 | 6,9984000 | 6,9984000 | 3,5651042 |
| Refrigeração | 1 | 0,08166667 | 0,11481667 | 17,2042667* | 17,2042667* | 44,6901042* |
| Pasteurização | 1 | 0,54000000* | 0,07706667 | 145,2384000* | 145,2384000* | 107,3151042* |
| SistLP*Refrig | 1 | 0,08166667 | 0,05801667 | 13,1128167* | 13,1128167* | 6,2526042 |
| Refrig*Past | 1 | 0,02666667 | 0,04335000 | 21,3948167* | 21,3948167* | 7,8776042 |
| SistLP*Past | 1 | 0,02666667 | 0,00426667 | 0,4760167 | 0,4760167 | 0,4401042 |
| SistLP*Refrig*Past | 1 | 0,02666667 | 0,00281667 | 5,3392667 | 5,3392667 | 9,6901042 |

| Fonte de Variação | GL | Gord. Ext. Seco (QM) | Ext. Seco Des. (QM) | Proteína (QM) | NaCl (QM) |
|--------------------|----|-------------------------|------------------------|------------------|--------------|
| Sistema LP | 1 | 2,8153500 | 0,57350417 | 3,58826667 | 0,00166667 |
| Refrigeração | 1 | 104,9180167* | 6,43770417 | 1,63281667 | 0,00375000 |
| Pasteurização | 1 | 92,8266667* | 2,86350417 | 0,57041667 | 0,01926667 |
| SistLP*Refrig | 1 | 3,9690667 | 1,25583750 | 2,61360000 | 0,00166667 |
| Refrig*Past | 1 | 3,9853500 | 3,30783750 | 0,00735000 | 0,01926667 |
| SistLP*Past | 1 | 1,3537500 | 0,00070417 | 0,12906667 | 0,02535000 |
| SistLP*Refrig*Past | 1 | 19,9472667 | 0,64353750 | 0,05226667 | 0,01664167 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: SistLP*Refrig = efeito da interação Sistema LP x Refrigeração

QM (Quadrado Médio) seguido de (*) indica efeito significativo a 5% de probabilidade - Teste de Tukey.

Nota-se que o pH apresentou efeito significativo ($P < 0,05$) em relação a fonte de variação Pasteurização, os componentes Extrato seco e Umidade sofreram efeito significativo ($P < 0,05$) da Refrigeração, Pasteurização e das interações Sistema LP x Refrigeração e Refrigeração x Pasteurização, e por fim a Gordura e a Gordura no Extrato seco sofreram efeito ($P < 0,05$) da Refrigeração e da Pasteurização (Tabela 6).

A tabela 7 apresenta as médias dos componentes físico-químicos do Queijo de Coalho, os quais sofreram efeito significativo ($P < 0,05$).

Tabela 7 – Comparação de médias dos componentes físico-químicos do Queijo de Coalho dos diferentes tratamentos

| | | pH | Extrato Seco % | Umidade % | Gordura % | Gord. Ext. Seco % | |
|-------------------------------------|-------------|-------|-------------------|--------------|--------------|----------------------|----|
| Refrigeração | | | | | | | |
| | Sim | ns | ns | ns | 22,43 a | 48,32 a | |
| | Não | ns | ns | ns | 25,16 b | 52,50 b | |
| Pasteurização | | | | | | | |
| | Sim | 6,5 a | ns | ns | 21,68 a | 48,44 a | |
| | Não | 6,2 b | ns | ns | 25,91 b | 52,38 b | |
| Refrigeração * Pasteurização | | | | | | | |
| | Sim | Sim | ns | 42,79 a | 57,20 a | ns | ns |
| | Sim | Não | ns | 49,60 c | 50,39 c | ns | ns |
| | Não | Sim | ns | 46,37 b | 53,62 b | ns | ns |
| | Não | Não | ns | 49,40 c | 50,59 c | ns | ns |
| Sistema LP * Refrigeração | | | | | | | |
| | Ativado | Sim | ns | 44,91 a | 55,08 a | ns | ns |
| | Ativado | Não | ns | 48,08 b | 51,90 b | ns | ns |
| | Não ativado | Sim | ns | 47,47 b | 52,52 b | ns | ns |
| | Não ativado | Não | ns | 47,69 b | 52,30 b | ns | ns |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: ns = efeito não significativo

SistLP*Refrig = efeito da interação Sistema LP x Refrigeração

Médias com letras diferentes na coluna diferem estatisticamente a 5% de probabilidade – Teste de Tukey

O efeito do pH está relacionado, possivelmente, ao processo de pasteurização que reduziu a carga microbiana do leite e conseqüentemente diminuiu a atividade de acidificação causada por microrganismos fermentadores da lactose. Assim, observou-se que quando o leite foi pasteurizado, o pH do queijo apresentou média de 6,5 diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do tratamento sem pasteurização, com média de 6,2 e, portanto, levemente mais ácido.

Quando refrigerado e pasteurizado ou quando refrigerado e com sistema LP ativado a variável umidade apresentou-se com médias maiores e diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. O fato leva a deduzir que quando o queijo apresentou melhores condições higiênico-sanitárias devido a refrigeração e a pasteurização inicial do leite, não apresentou elevado processo de acidificação durante a coagulação e prensagem, não havendo portanto a formação em excesso de olhaduras na massa do queijo e, assim, ocorrendo uma maior retenção da umidade em relação aos queijos com maior formação de olhaduras. Como consequência, o extrato seco nesses tratamentos foram menores, diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 7).

Refrigeração e Pasteurização foram importantes fontes de variação determinando efeito significativo ($P < 0,05$) com menores valores para as concentrações de Gordura e Gordura no Extrato seco (Tabela 7) no Queijo de Coalho. Segundo Furtado (2005), a estocagem prolongada do leite sob refrigeração provoca a dissociação parcial da caseína que passa para a fase solúvel, aumentando assim as perdas de gordura durante o processamento. Entretanto, como o leite dos diferentes tratamentos não foi submetido a um longo período de estocagem, acredita-se que essa diferença possa ter sido provocada pela adição do cloreto de cálcio nos tratamentos também sem pasteurização, o que pode ter melhorado a performance desses em comparação aos tratamentos pasteurizados. Uma vez que, o cloreto de cálcio é utilizado para recompor parte dos sais de cálcio insolubilizados pela pasteurização, apresentando melhora na coagulação e diminuindo as perdas de gordura no soro (FURTADO, 2005).

Essas diferenças apresentadas na composição físico-química do Queijo de

Coalho devem ter sido causadas pelo aumento do teor de umidade em alguns casos que ocasiona uma relação inversa nos teores de extrato seco e seus componentes.

Diversos autores (SANTOS et al., 1995; ABDON et al., 1996; SEIFU et al., 2004) não observaram quaisquer diferenças significativas na composição química (matéria seca, umidade, proteína, gordura, cloreto de sódio) entre queijos fabricados a partir de leite preservado pelo sistema LP e queijos controle. Evidências de estudos da América Latina sugerem que o sistema LP não interfere sobre a composição do queijo e produtos fermentados, quando o leite tenha sido submetido a um tratamento térmico adequado, após utilização do sistema LP (PONCE et al., 2005).

3.5. Análises microbiológicas do Queijo de Coalho

Na análise de variância da contagem microbiológica do Queijo de Coalho observa-se, de acordo com a Tabela 8, que a fonte de variação Sistema LP afetou significativamente ($P < 0,05$) os microrganismos considerados.

Tabela 8 – Análises de variância da contagem microbiológica do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos

| Fonte de Variação | GL | Coliformes a 45°C (QM) | <i>E.coli</i> (QM) | <i>Staphylococcus coag. pos.</i> (QM) |
|--------------------|----|---------------------------|-----------------------|--|
| Sistema LP | 1 | 9,01600417* | 7,93500000* | 13,23135000* |
| Refrigeração | 1 | 7,18320417* | 1,77126667 | 0,02406667 |
| Pasteurização | 1 | 3,58053750 | 0,09881667 | 70,24681667* |
| SistLP*Refrig | 1 | 0,25833750 | 0,15681667 | 1,34426667 |
| Refrig*Past | 1 | 0,78120417 | 1,40166667 | 0,01306667 |
| SistLP*Past | 1 | 2,20220417 | 0,72106667 | 0,00481667 |
| SistLP*Refrig*Past | 1 | 1,17483750 | 0,75615000 | 5,15226667 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: SistLP*Refrig = efeito da interação Sistema LP x Refrigeração

QM (Quadrado Médio) seguido de (*) indica efeito significativo a 5% de probabilidade - Teste de Tukey.

As fontes de variação Refrigeração e Pasteurização determinaram diferenças significativas (Tabela 8) nas concentrações de Coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, respectivamente. Entretanto, as interações consideradas na análise foram de pouca importância para alterar as concentrações dos microrganismos avaliados.

Na Tabela 9 são apresentadas as médias para as contagens microbiológicas do Queijo de Coalho dos diferentes tratamentos. Os patógenos, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, não foram identificados nos Queijos de Coalho de nenhum tratamento.

Tabela 9 – Comparação de médias da contagem microbiológica do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos

| | Coliformes a 45°C Log ₁₀ UFC/g | <i>E.coli</i> Log ₁₀ UFC/g | <i>Staphylococcus</i> coag. pos. Log ₁₀ UFC/g |
|----------------------|--|--|---|
| Sistema LP | | | |
| Ativado | 7,47 a | 5,03 a | 3,45 a |
| Não ativado | 8,69 b | 6,18 b | 4,93 b |
| Refrigeração | | | |
| Sim | 7,53 a | Ns | ns |
| Não | 8,63 b | Ns | ns |
| Pasteurização | | | |
| Sim | ns | Ns | 2,48 a |
| Não | ns | Ns | 5,90 b |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

Notas: ns = efeito não significativo

Médias com letras diferentes na coluna diferem estatisticamente a 5% de probabilidade – Teste de Tukey

Para os Coliformes a 45°C, o tratamento com Sistema LP Ativado mostrou uma média de 7,47 Log₁₀ UFC/g que difere estatisticamente ($P < 0,05$) em mais de 1 Log para o tratamento Não ativado. Esse resultado expressa um percentual 14,13% menor para o tratamento ativado. A refrigeração também influenciou a média dos Coliformes a 45°C, em que, quando refrigerado, determinou média mais baixa em 1 Log.

O Sistema LP Ativado proporcionou média significativamente ($P < 0,05$) mais baixa para *Escherichia coli*, em relação ao tratamento que não recebeu ativação do sistema (Tabela 8). Essa diferença corresponde a um valor 18,60% menor em comparação ao Sistema Não Ativado.

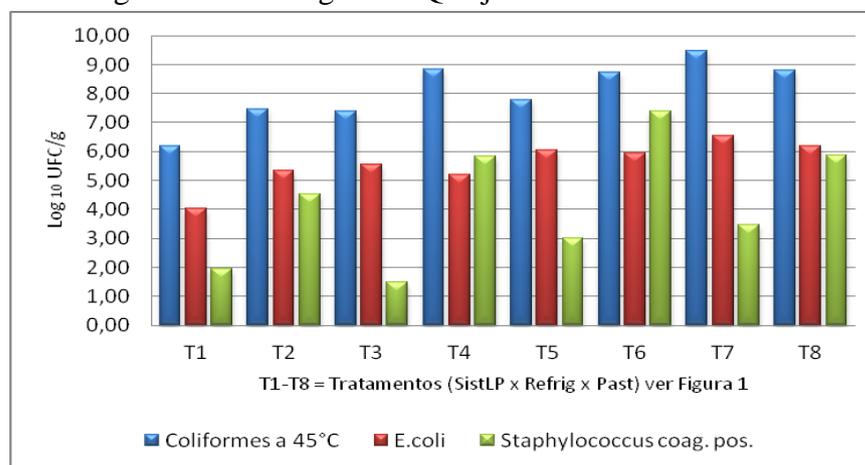
Em relação aos *Staphylococcus* coagulase positiva, os resultados para o Sistema LP também foram semelhantes, com média 1 Log menor no tratamento com Sistema LP Ativado (3,45 Log₁₀ UFC/g) e diferindo estatisticamente ($P < 0,05$) do tratamento Não Ativado (4,93 Log₁₀ UFC/g), representando um percentual de 30,02% de diferença para o tratamento ativado. Para esse patógeno, a Pasteurização também exerceu efeito significativo ($P < 0,05$). O tratamento com pasteurização chegou a expressar média ainda mais baixa (2,48 Log₁₀ UFC/g) e com uma diferença de mais de 2 Log em comparação com o tratamento não pasteurizado.

Diversos autores (LARA et al., 1987; EARNSHAW et al., 1989; SANTOS et al., 1995; SEIFU et al., 2004) apontam resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo no que diz respeito a ação do sistema LP nos microrganismos presentes nos queijos. Por exemplo, Lara et al. (1987) reportaram similar redução na contagem de Coliformes em queijo fresco feito a partir de leite preservado pelo sistema LP. Na pesquisa de Earnshaw et al. (1989), o sistema LP foi eficaz na redução dos níveis de *Pseudomonas*, *E.coli* e *Staphylococcus*, aumentando a vida de prateleira e a estabilidade do Queijo Cottage. E, em Seifu et al. (2004), as contagens dos microrganismos em queijos tratados pelo sistema LP foram significativamente menor em relação ao queijo controle. Ou seja, a ativação do sistema LP em leite utilizado para a fabricação de queijos, parece ser um método útil para controlar os efeitos do aumento da carga microbiana, principalmente em queijos frescos produzidos por pequenos

produtores sem um sistema de refrigeração adequado e que na maioria dos casos utilizam leite não pasteurizado.

A despeito dos resultados encontrados, é importante enfatizar que mesmo que a ativação do sistema LP tenha proporcionado redução da carga microbiana, o perfil microbiológico dos queijos estavam em não conformidade (Figura 3 e Apêndice – Tabela 10) com os padrões exigidos nas normativas atuais.

Figura 3 – Contagem microbiológica do Queijo de Coalho nos diferentes tratamentos



Fonte: Elaborado pelo autor (2013)

De acordo com a Portaria N° 146 de 07 de março de 1996, do MAPA, no seu “Regulamento técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijo”, os queijos de alta umidade (46% - 54,9%) devem apresentar valores máximos de 5×10^3 UFC/g para Coliformes a 45°C e 1×10^3 UFC/g para *Staphylococcus coagulase positiva*. E de acordo com a Resolução RDC N° 12 de 2 de janeiro de 2001, da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no seu “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”, os queijos de umidade entre 46% e 55%, incluindo o Queijo de Coalho com umidade correspondente, devem apresentar valores máximos de 5×10^3 UFC/g para Coliformes a 45°C e 10^3 UFC/g para

Staphylococcus coagulase positiva. E ainda conforme a Resolução SPRRA Nº 002 de 19 de abril de 1999, da antiga Secretária de Produção Rural e Reforma Agrária do estado de Pernambuco e atual Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária de Pernambuco, que estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do Queijo de Coalho produzido no Estado de Pernambuco, esse deve apresentar valores máximos de 10^2 UFC/g para Coliformes e 10^3 UFC/g para *Staphylococcus*.

4. Conclusões

A ativação do sistema lactoperoxidase no leite é responsável por apresentar efeito inibitório significativo sobre a carga microbiana de *Staphylococcus* coagulase positiva, independentemente se em leite cru ou pasteurizado e se em leite refrigerado ou a temperatura ambiente.

O leite preservado pelo sistema lactoperoxidase não afeta o rendimento econômico da fabricação do Queijo de Coalho.

A interação do uso do sistema lactoperoxidase com a refrigeração no leite reduz o processo de acidificação durante a coagulação e prensagem do Queijo de Coalho, o que provoca uma maior retenção da umidade no queijo e inversamente um menor teor de extrato seco. Esse efeito causa um menor rendimento técnico (Coeficiente GL).

O leite preservado pelo sistema lactoperoxidase produz um Queijo de Coalho com menor carga microbiana para Coliformes a 45°C, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, em relação a um leite de carga microbiana inicial igual mas sem a ativação do sistema lactoperoxidase.

Referências

- ANDRADE, A. A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no estado de Ceará.** 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- AOAC 989.14. AOAC International. Salmonella in foods – Final action. **J. Assoc. Anal. Chem.**, Int. 71, 973. 1988.
- AOAC 995.22. AOAC International. Listeria in foods – Final action. **J. Assoc. Anal. Chem.**, Int. 79, 1083. 1996.
- AOAC 979.13. AOAC International. Phosphatase (residual) in milk. Method V. **J. Assoc. Anal. Chem.**, Int. 1984 (2000).
- AOAC 2001.05. AOAC International. Petrifilm rapid *S. aureus* count plate method for the rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected foods – First action. **J. Assoc. Anal. Chem.**, Int. 84, 1431. 2001.
- AOAC 2000.15. AOAC International. Rapid enumeration of Coliforms in foods – First action. **J. Assoc. Anal. Chem.**, Int. 85, 56. 2002.
- ARAÚJO, R. S.; NASSU, R. T. Caracterização físico-química de queijo de Manteiga, queijo de Coalho e Manteiga da Terra, produzidos no estado do Rio Grande do Norte e do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p.70-75, jun. 2002.
- ARAÚJO, R. *et al.* Avaliação microbiológica do queijo artesanal da região de Araxá – MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 93- 96, jul./ago. 2004.
- ASAAH, N. O. et al. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. **African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development**, Kenya, v. 2, n. 7, p.1-15, 2007.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Combi 2300 operator's manual.** Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998.

- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount IBC and Somacount 300 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002.
- BJORCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 45, p.109-118, 1978.
- BORGES, M. F. *et al.* Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31- 40, jan./jun. 2003.
- BRANCO, M. A. A. C. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 398-408, jun./dez. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 , de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 mar. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada Nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de janeiro de 2001, seção I, p. 45-53, 2001a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 de julho de 2001, seção I, p. 13, 2001b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 8-13.

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Laboratório Nacional de Referência Animal**. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília, DF, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ASSESSORIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA. **Projeções do agronegócio mundial e do Brasil 2006/07 a 2017/2018**. Publicado em 2008. Disponível em: < www.agricultura.gov.br>. Acesso em Janeiro de 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção I, p. 6-11
- BRUNO, L. M. *et al.* Avaliação microbiológica de queijos de Coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC. **Guidelines for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system**. CAC/GL. 1991. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/29/CXG_013e.pdf>. Acesso em: 01 jun 2012.
- CAVALCANTE, J. F. M. *et al.* Processamento de queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.205-214, 2007.
- CENSA. **Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria**. La Habana, Cuba. 2011. Disponível em: < www.censa.edu.cu >. Acesso em Dezembro de 2011.
- EARNSHAW, R. G. *et al.* The preservation of Cottage cheese by an activated lactoperoxidase system. **Food Microbiology**, v. 6, p. 285-288, 1989
- FAO/WHO. **Beneficios y riesgos potenciales del sistema de la lactoperoxidasa em la conservación de la leche cruda**: informe de la reunión técnica de la FAO/WHO. Roma, 2005. Roma: FAO, 2006. 55 p.

- FARRAG, S. A.; EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Use of lactoperoxidase system to inactivate *Escherichia coli* 0157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft*, v.47, p. 15-17, 1992
- FEITOSA, T. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Animal Production and Health – The technology of traditional milk products in developing countries**. Roma, 1990, v. 85. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/t0251e/T0251E13.htm>>. Acesso em 05 de janeiro 2012.
- FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005.
- HARNULV, B. G.; KANDASAMY, C. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: results from Sri Lanka. *Milchwiss*, v. 37, p. 454-457, 1982.
- ISO 707 | IDF 50. **Milk and milk products – Guidance on sampling**. Third edition. Geneva, Suíça. 2008.
- KAMAU, D. N.; DOORES, S.; PRUITT, K. M. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 1010–1014, 1990.
- KANGUMBA, J. G. K.; VENTER, E. H.; COETZER, J. A. W. The effect of the lactoperoxidase system and souring on certain potential human pathogen in cow's milk. **J. South African Vet.** v. 68, p.130-136, 1997.
- KLEI, L. *et al.* Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.1205-1213, 1998.

- KUSSENDRAGER, K. D.; VAN HOOIJDONK A. C. M. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.** v. 84, p. 519-525, 2000.
- LARA, R. et al. Effect of the lactoperoxidase system on yield and characteristics of fresh-type cheese. *Milchwissenschaft*, v. 42, p. 773-775, 1987.
- LEITE, C. C. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador (BA). Importância para saúde pública. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 2, p. 38-41, nov. 2002.
- LUDEÑA, F. et al. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de cabra y su conservación mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. **Mosaico Científico**, n. 3, p.17-30, 2006.
- MARKS, N. E.; GRANDISON, A. S; LEWIS, M. J. Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized skim milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 735–741, 2000.
- MENDES, E. S. et al. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “Coalho” comercializados em Recife. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez., 1999.
- NASSU, R. T. et al. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, jul. 2001.
- ORAM, J. D.; REITER, B. The oxidation of thiocyanate and the nature of inhibitory compound. **Biochemical J.**, n. 100, p.273-386, 1966.
- PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução n. 002 de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco**, Recife, 20 de abril de 1999.

- PONCE, P. Lactoperoxidase system under tropical conditions: use, advantages and limitations in conservation of raw milk and potential applications. **Rev. Salud Animal** Vol. 32 No. 3, 2010.
- PONCE, C. P. et al. Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda. **Unidad de Análisis y Tendencias en Salud**, La Habana, Cuba, v. 9, n. 5, Sept./Oct. 2005. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.htm>. Acesso em: 02 jun 2012.
- REITER, B. et al. Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against Escherichia coli and some Gram-negative pathogens. **Infection and Immunity**, Washington, US, n. 13, p. 800-807, 1976.
- SANTOS, J. A. et al. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against Aeromonas hydrophila and psychrotrophs during the manufacturing of the Spanish sheep fresh cheese Villalón. **Milchwissenschaft**, Munchen, Alemanha, DE, v. 50, n. 12, p. 690-692, 1995.
- SARKAR, S.; MISRA, A. K. Implication of LP system on manufacture of fermented milk products. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, IN, v. 47, p. 133-139, 1994.
- SAS Institute. The SAS System for Windows. Release 9.2. **SAS Institute**. Cary, NC, 2007.
- SEBRAE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de Coalho produzido no Ceará**. Série estudos tecnológicos. Fortaleza: SEBRAE/CE, 1998. 208p.
- SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, Inglaterra, GB, n. 16, p. 137-154, 2005.
- SENA, M. J. *et al.* Características físico-químicas de queijo de Coalho comercializado em Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 41-44, jul. 2000.

TORREZAN, R. Influência do tratamento térmico do leite destinado à fabricação do queijo. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 149-170, jul./dez. 1998.

YUNES, V. M.; BENEDET, H. D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.3, p.285-290, 2000.

APÊNDICE

Tabela 10 – Contagem microbiológica do leite cru coletado em propriedade da Zona da Mata de Pernambuco entre fevereiro e março de 2012, rendimento da fabricação do Queijo de Coalho e composição físico-química e contagem microbiológica do Queijo de Coalho para todos os tratamentos (Sistema LP x Refrigeração x Pasteurização)

| | Sistema LP Ativado | | | | Sistema LP Não ativado | | | |
|---|---------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Refrigerado | | Não Refrigerado | | Refrigerado | | Não Refrigerado | |
| | Pasteurizado | Não Pasteurizado | Pasteurizado | Não Pasteurizado | Pasteurizado | Não Pasteurizado | Pasteurizado | Não Pasteurizado |
| Microbiológico do leite | | | | | | | | |
| Coliformes a 45°C (Log ₁₀ UFC/mL) | 1,00 | 2,44 | 1,99 | 7,11 | 1,33 | 3,35 | 1,88 | 8,39 |
| <i>E.coli</i> (Log ₁₀ UFC/mL) | 0,00 | 1,03 | 1,11 | 1,61 | 0,00 | 0,73 | 0,00 | 2,33 |
| <i>Staphylococcus</i> coag. pos. (Log ₁₀ UFC/mL) | 1,00 | 1,42 | 1,00 | 4,08 | 1,43 | 3,40 | 1,62 | 5,76 |
| <i>Salmonella</i> spp. (Ausência em 25 mL) | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (Ausência em 25 mL) | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. |
| Rendimento da fabricação | | | | | | | | |
| Kg de Queijo | 2,902 | 2,697 | 2,802 | 2,778 | 2,909 | 2,781 | 2,570 | 2,570 |
| Litros / Kg | 7,19 | 7,62 | 7,31 | 7,38 | 7,08 | 7,40 | 7,98 | 7,98 |
| Coefficiente GL | 57,89 | 64,34 | 64,10 | 66,78 | 63,46 | 68,12 | 57,49 | 62,08 |
| Físico-químico do queijo | | | | | | | | |
| pH | 6,6 | 6,4 | 6,6 | 6,4 | 6,6 | 6,3 | 6,5 | 6,0 |
| Acidez (g Ác. Lát./100 mL) | 0,13 | 0,15 | 0,11 | 0,26 | 0,11 | 0,15 | 0,24 | 0,49 |
| Ext.seco (%) | 40,90 | 48,93 | 46,90 | 49,27 | 44,68 | 50,26 | 45,84 | 49,53 |
| Umidade (%) | 59,10 | 51,06 | 53,09 | 50,72 | 55,31 | 49,73 | 54,15 | 50,46 |
| Gordura (%) | 18,08 | 25,00 | 24,25 | 26,33 | 21,41 | 25,25 | 23,00 | 27,08 |
| Gord.Ext.Seco (%) | 44,05 | 51,09 | 51,68 | 53,45 | 47,84 | 50,29 | 50,20 | 54,67 |
| Ext. Seco Des. (%) | 22,81 | 23,93 | 22,65 | 22,94 | 23,26 | 25,01 | 22,84 | 22,45 |
| Proteína (%) | 20,51 | 20,12 | 21,75 | 21,24 | 21,89 | 21,60 | 21,63 | 21,59 |
| NaCl (%) | 0,37 | 0,47 | 0,47 | 0,35 | 0,35 | 0,48 | 0,32 | 0,43 |
| Microbiológico do queijo | | | | | | | | |
| Coliformes a 45°C (Log ₁₀ UFC/g) | 6,17 | 7,47 | 7,39 | 8,85 | 7,77 | 8,74 | 9,46 | 8,82 |
| <i>E.coli</i> (Log ₁₀ UFC/g) | 4,02 | 5,33 | 5,56 | 5,20 | 6,03 | 5,94 | 6,54 | 6,20 |
| <i>Staphylococcus</i> coag. pos. (Log ₁₀ UFC/g) | 1,96 | 4,53 | 1,49 | 5,82 | 3,02 | 7,38 | 3,45 | 5,87 |
| <i>Salmonella</i> spp. (Ausência em 25g) | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> (Ausência em 25g) | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. | Aus. |

Fonte: Elaborado pelo autor (2013)