



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA LACTOPERÓXIDASE NA QUALIDADE DO
QUEIJO DE COALHO DE LEITE DE CABRA.**

AUGUSTO CESAR MAGALHÃES NUNES

Recife

2015

Ficha Catalográfica

Nunes, Augusto Cesar Magalhães

Controle de qualidade na produção do queijo de coalho de leite de cabra com o sistema lactoperóxidase ativado / Augusto Cesar Magalhães Nunes. – Recife, 2015.

__f. : il.

Orientador: Samara Alvachian Cardoso Andrade

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife – 2015.

Inclui referências e apêndice(s).

1.qualidade físico-química 2.qualidade microbiológica 3.conservação 4.derivados do leite de cabra.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

AUGUSTO CESAR MAGALHÃES NUNES

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA LACTOPERÓXIDASE NA QUALIDADE DO
QUEIJO DE COALHO DE LEITE DE CABRA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Samara Alvachian Cardoso Andrade

CO-ORIENTADORA: Neila Mello dos Santos Cortez

Recife

2015

II

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA LACTOPERÓXIDASE NA QUALIDADE DO
QUEIJO DE COALHO DE LEITE DE CABRA.**

Por Augusto Cesar Magalhães Nunes

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Prof/a Dr/a. Celiane Gomes Maia da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof/a Dr/a. Eriane de Castro Lima Machado
Centro Acadêmico de Vitória

Prof/a Dr/a. Vivianne Montarroyos Padilha
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Deus, que sempre está comigo e nunca me deixou cair, sem ele não sou nada. E a todas as pessoas que contribuíram com as etapas de aprendizado da minha vida, desde a minha mãe que iniciou com a educação básica e me ensinou os valores que moldaram meu caráter, professores da escola pública que estudei no ensino básico e médio, aos professores da graduação do curso de Bacharelado em Gastronomia, meus colegas e amigos do laboratório de pesquisa, meus ex-companheiros de trabalho no Ministério da Agricultura, meus professores e colegas no Mestrado e a Mayana Sales, meu amor, que sempre está comigo me encorajando a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, fonte inesgotável de sabedoria e amor, minha força e convicção quando tudo me faltar. À Universidade Federal Rural de Pernambuco, que por meio do Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Agradeço, também, a prof. Dra. Samara Alvachian, orientadora no Mestrado, dando o apoio necessário quando necessitávamos. A prof. Dra. e amiga Neila Santos, pela sua co-orientação no respectivo trabalho, pela paciência e orientação para que o nosso trabalho fosse efetivado com sucesso, significativas contribuições, tanto para a vida acadêmica, quanto para a vida pessoal, por ter estado sempre ao meu lado no decorrer desses anos, me guiando e acompanhando minha trajetória acadêmica de formação intelectual. Foi um privilégio tê-la como co-orientadora, uma profissional de tantos valores acadêmicos e pessoais. Agradeço a todos os professores, de uma forma geral, que fazem parte do quadro docente Programa, ao compartilhar seus valiosos conhecimentos, contribuíram fundamentalmente para com minha formação acadêmica e profissional, e em particular a professora Enayde Melo, Celiane Gomes e a laboratorista Jaqueline Ferreira pela presteza de sempre está disponível a ajudar, e aos meus “sempre-orientadores-amigos”: José do Egito de Paiva, Pedro Marinho, Ian Carneiro e Leandro Fragoso. Aos colegas de turma e amigos cativados, Jocelane, Robson, Tatiana, Fabiana, Helen e Sydia com os quais dividimos momentos de constante aprendizado e de viagens a “Nárnia” HOOO! E como.., minha eterna e sincera gratidão. Em especial, agradeço àquela que é um exemplo de mulher, companheirismo e profissionalismo, que não mede esforços para que eu possa alcançar patamares maiores. Obrigado, minha companheira, Mayana Sales (te amo!), pela sua dedicação, amor, carinho, cuidado, atenção, cumplicidade, paciência, colaboração e por não desistir de mim. Foi nos momentos mais difíceis que me acolheu, entendeu minhas angústias, ajudou-me com palavras motivadoras e abraços confortantes, que não me deixava desistir. Aos amigos do MAPA, Andreyzza, Cristine, Vitor Hugo, Idalina e Prisciliana do Setor de caprinos do Dept. de Zootecnia. Minha eterna gratidão. E em memória da minha mãe: Maria Ferreira pessoa muito simples e muito importante, que é responsável por cada qualidade que possuo, mesmo na sua ausência espero sempre ser um motivo de orgulho...da escola pública de bairro pobre Carlos Alberto ao título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Nunca deixem de acreditar em vocês!!!!

EPÍGRAFE

“Quando abro a porta de uma nova descoberta já encontro Deus lá dentro.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A cadeia produtiva do leite de cabra no Brasil é um dos setores com potencial de crescimento para a economia do país. A região Nordeste se destaca na produção de leite de cabra, colocando o país como maior produtor da América do Sul. Entretanto, as condições socioeconômicas locais constituem um obstáculo para o manejo animal e tratamento adequado do leite, causando a diminuição da qualidade e do prazo de validade comercial do leite de cabra e seus derivados, o que ocasiona perdas econômicas e oferece risco ao consumidor. Nesse contexto, a utilização da ativação do sistema lactoperoxidase (SLP) como inibidor do crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes apresenta-se como uma eficiente alternativa na melhoria da qualidade do leite de cabra e na produção de seus derivados, como o queijo de coalho. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da ativação do SLP na qualidade e prazo de validade comercial do queijo de coalho de leite de cabra. Foram feitas comparações através das análises físico-químicas e microbiológicas entre os queijos de coalho de leite de cabra produzidos a partir do leite de cabra cru e pasteurizado, com e sem a ativação do SLP e submetidos após a fabricação e ao armazenamento em temperatura ambiente e refrigeração. Observou-se que a ativação do SLP apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) na redução da população das bactérias mesófilas aeróbias, bactérias psicrotróficas, *Staphylococcus* coagulase positivo e coliforme totais, comparado aos tratamentos onde o SLP não foi ativado. Portanto, os resultados obtidos confirmam que a ativação do SLP no leite de cabra, logo após a ordenha, é uma importante alternativa para manter a qualidade da matéria-prima na ausência da refrigeração até o processamento, e a associação do SLP à pasteurização e ao armazenamento refrigerado melhora a qualidade do queijo de coalho, estendendo o prazo de validade comercial do produto.

Palavras-chave: qualidade físico-química; qualidade microbiológica; conservação; derivados do leite de cabra.

ABSTRACT

The production chain goat milk in Brazil is one of the sectors with growth potential for the economy. The Northeast region stands out in the production of goat's milk, placing the country as the largest producer in South America. However, places socioeconomic conditions are an obstacle for animal husbandry and treatment of milk, causing a decrease in the quality and validity term commercial goat milk and its derivatives, which causes economic losses and offers risk to the consumer. In this context, the use of the activation of the lactoperoxidase system (SLP) to inhibit the growth of pathogenic and spoilage bacteria is presented as an efficient alternative for improving the quality of goat milk and production of derivatives such as cheese curd. The objective of this study was to evaluate the influence of SLP activation in quality and validity commercial cheese curd of goat milk. Comparisons were made through the physical, chemical and microbiological analyzes of the curd cheese from goat's milk produced from raw and pasteurized goat milk, with and without activation of SLP and submitted after manufacturing and storage at room temperature and refrigeration. It was observed that the SLP activation presented significant effect ($p > 0.05$) in reducing the population of aerobic mesophilic bacteria, psychotropic bacteria, Staphylococcus positive coagulase and total coliform, compared to treatments where the SLP has not been activated. Therefore, these results confirm that the SLP activation in goat milk immediately after milking, is an important alternative to maintain the quality of the raw material in the absence of refrigeration for processing and association SLP pasteurization and cold storage enhances the quality of the cheese curd, extending the period of validity of the commercial product.

Key Words: Physico-chemical quality; microbiological quality; conservation; derived from goat milk.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de referência físico-químicos e microbiológicos do leite de cabra cru da IN N° 37/2000.....	13
Tabela 2: Parâmetros de referência microbiológicos do Queijo de coalho da Portaria n° 146/96 para queijo entre 45-55% de umidade.....	15
Tabela 3: Composição físico-química do leite de cabra cru usado como matéria prima.....	47
Tabela 4: Contagem microbiológica do leite de cabra cru usado como matéria prima.....	48
Tabela 5: Contagem microbiológica do leite de cabra pasteurizado usado como matéria prima na formulação dos tratamentos (S:P:R), (S _N :P:R), (S:P:R _N) e (S _N :P:R _N).....	50
Tabela 6: Interação entre as variáveis: ativação do SLP (S) e pasteurização (P) no leite de cabra pasteurizado usado como matéria prima na formulação dos tratamentos (S:P:R), (S _N :P:R), (S:P:R _N) e (S _N :P:R _N).....	51
Tabela 7: Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no início de armazenamento.....	52
Tabela 8: Contagem microbiológica do Queijo de Coalho de leite de cabra no tempo 2 dias.....	54
Tabela 9: Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no tempo 7 dias.....	55
Tabela 10: Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no tempo 12 dias.....	56
Tabela 11: Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra armazenado durante 22 dias.....	57
Tabela 12: Comparação de médias entre os tratamentos S;P;R e S _N ;P;R durante o acondicionamento.....	58

Tabela 13: Composição físico-química do queijo do coalho de leite de cabra.....	60
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ác	Ácido
AGL	Ácidos graxos livres
AO	Ágar Oxford
BHI	Ágar Baird-Párker
CAC	Codex Alimentarius Comission
Coag	Coagulase
DNA	Ácido dessoxiribonucléico
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
EC	Escherichia coli
EPS	Exopolissacarídeos
EST	Extrato seco total
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMS	International Commission on Microbiological Specifications for foods
IN	Instrução Normativa
L	Litro
Lat	Lático
Log	Logaritmo
LP	Lactoperoxidase
LST	Lauril Sulfato Triptose
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mol	molles

NaSCN	Tio-cianato de sódio
NMP	Número mais provável
°C	Graus Celcius
OSCN	Hipotiocianato
P	Pasteurização
PCA	Ágar padrão de contagem
pH	Potencial hidrogeniônico
P _N	Não-pasteurizado
Pos	Positiva
ppm	Partes por milhão
R	Refrigerado
RAM	Ágar Rambach
R _N	Não-refrigerado
RNA	Ácido ribonucléico
S	Sistema ativado
SCN ⁻	Íon tio-cianato
SLP	Sistema Lactoperoxidase
S _N	Sistema não-ativado
spp	Várias espécies
UA	Unidade astronômica
UFC	Unidade formadora de colônias
UHT	Ultra alta temperatura
VB	Verde brilhante
XLD	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE	09
3. REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 CARACTERÍSTICA DO LEITE DE CABRA E DERIVADOS.....	10
3.1.1 Produção e consumo do leite de cabra.....	10
3.1.2 Composição do leite de cabra.....	11
3.1.3 Parâmetros de qualidade do leite de cabra	12
3.1.4 Importância, impacto social e aceitação do leite de cabra.....	13
3.1.5 Queijo de coalho de leite de cabra	14
3.2 MICRORGANISMOS EM LEITE E DERIVADOS.....	15
3.2.1 Contaminação alimentar.....	15
3.2.2 Bactérias mesófilas aeróbias.....	16
3.2.3 Bactérias psicrotróficas.....	16
3.2.4 Coliformes totais e termotolerantes.....	17
3.2.5 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	18
3.2.6 <i>Salmonella</i> sp.....	19
3.2.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.3 ATIVIDADE DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE.....	21
3.3.1 Sistema lactoperoxidase.....	21
3.3.2 Mecanismo de ação do sistema lactoperoxidase	24
3.3.3 Atividade antimicrobiana.....	26
4. REFERÊNCIAS	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Obtenção da matéria-prima.....	38
5.2 Tratamentos.....	38
5.2.1 Ativação do sistema lactoperoxidase	38
5.2.2 Tratamento térmico: pasteurização.....	39
5.2.3 Acondicionamento.....	39
5.3 Processamento do leite de cabra para fabricação do queijo de coalho.....	40
5.4 Prazo de validade comercial.....	41
5.5 Análises físico-químicas.....	41

5.5.1 pH.....	42
5.5.2 Acidez Dornic.....	42
5.5.3 Lipídios: método de Gerber.....	42
5.5.4 Extrato seco total e Umidade	42
5.5.5 Proteínas (nitrogênio total).....	42
5.5.6 Glicídios redutores em lactose	43
5.5.7 Cinzas.....	43
5.5.8 Fosfatase Alcalina.....	43
5.5.9 Lactoperoxidase.....	43
5.6 Análises microbiológicas.....	44
5.6.1 Preparação das amostras.....	44
5.6.2 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas	44
5.6.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas	44
5.6.4 Enumeração de Coliformes.....	45
5.6.5 Presença/Ausência de <i>Salmonella</i> spp.	46
5.6.6 Presença/Ausência de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
5.6.7 Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	46
5.7 Análises estatísticas.....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1 Qualidade físico-química e microbiológica da matéria prima.....	47
6.2 Análises microbiológicas do leite pasteurizado.....	50
6.3 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o início do armazenamento.....	52
6.4 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 2 dias.....	53
6.5 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 7 dias.....	55
6.6 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 12 dias.....	56
6.7 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 22 dias.....	57
6.8 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 31 dias.....	58

7 CONCLUSÃO.....	61
8 REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia dos alimentos tem como objetivo garantir o abastecimento de alimentos nutritivos e saudáveis para o ser humano, controlando os agentes deteriorantes, aumentando o prazo de validade dos alimentos, permitindo seu armazenamento e transporte aos locais de consumo. Entre esses alimentos, o leite apresenta grande importância na alimentação humana, além de ter a maior proporção de cálcio biodisponível, possui alto valor nutritivo constituído por proteínas, carboidratos, lipídeos, água, vitaminas e sais minerais (PAIVA et al., 2012).

A cadeia produtora do leite no Brasil é um dos setores mais importantes para a economia do país. Apesar de contribuir com apenas 1,3% do quantitativo de leite de cabra produzido no mundo, o Brasil é o maior produtor da América do Sul, com cerca de 150.000 toneladas/ano (FAO, 2014). Essa produção está concentrada principalmente nos estados das regiões Nordeste e Sul, em mais de 18 mil estabelecimentos, segundo o IBGE (2012).

Entretanto, por tratar-se de um produto de fabricação artesanal e perecível, merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sujeito a uma série de alterações. As condições higiênicas inadequadas durante a ordenha e processamento do leite, é um dos problemas que mais contribuem para qualidade insatisfatória dos produtos lácteos produzidos no Brasil. Com isso, evidencia-se um problema de ordem social, cultural e econômica, afetando a qualidade do leite e dos produtos lácteos, como o queijo de coalho produzido na região Nordeste do país.

Apesar da Instrução Normativa Nº 30, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001) estabelecer que o leite utilizado na fabricação do queijo de coalho deva ser submetido à pasteurização, a Legislação Estadual de Pernambuco, na Resolução Nº 02 da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (PERNAMBUCO, 1999) permite que seja usado como matéria-prima o leite *in natura* (cru).

O queijo de coalho fabricado com leite cru apresenta níveis de contaminação superiores ao permitido pela IN Nº 30/2001 e IN Nº 146/1996, classificando esses queijos como impróprios para consumo.

Nesse contexto, o uso do sistema lactoperoxidase (SLP) e sua ativação exógena no leite tem sido objeto de investigação em diversos países como método de conservação complementar e alternativo à refrigeração do leite, sendo aprovado como método de

conservação do leite cru pelo Codex Alimentarius Commission (CAC, 1991). Com base em estudos (FAO, 2012), reconhece-se, nesse método, um importante potencial de utilização para manter a qualidade inicial da matéria-prima e permitir a fabricação de produtos lácteos com melhor qualidade.

Diante do exposto e pela ausência de estudos sobre a ativação do sistema lactoperoxidase no leite usado na produção de derivados lácteos no Brasil, especificamente, o queijo de coalho de leite de cabra, objetivou-se avaliar a influência da ativação exógena do sistema lactoperoxidase na qualidade físico-química e microbiológica e no prazo de validade comercial do queijo de coalho fabricado a partir do leite de cabra, em diferentes condições de conservação e armazenamento.

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

O queijo de coalho de leite de cabra, um produto muito tradicional, fonte de nutrientes, que serve de fonte renda de muitas famílias no Brasil, em especial na Região Nordeste apresenta curta validade comercial devido a sua perecibilidade. Desta forma, o uso de tecnologias que mantenham a qualidade e prolonguem a vida útil do queijo de coalho de leite de cabra são imprescindíveis.

A ativação do sistema lactoperoxidase no leite de cabra cru usado para fabricação de queijo de coalho pode melhorar a qualidade microbiológica e aumentar a vida útil?

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICA DO LEITE DE CABRA E DERIVADOS

3.1.1 Produção e consumo do leite de cabra

A produção de leite de cabra ocupa atualmente o 3º lugar no rank mundial, sendo responsável por 2,4% do total de leite produzido, ficando atrás somente do leite de vaca (85%) e do leite de búfalo (11%) (GEROSA & SKOET, 2012).

A cadeia produtora do leite de cabra no Brasil é um dos setores com grande potencial de crescimento, o país possui o sétimo maior rebanho de caprinos, e contribui com 1,3% da produção de leite de cabra produzido no mundo, sendo o maior produtor da América do Sul, com cerca de 150.000 toneladas/ano (FAO, 2014).

Essa produção está concentrada principalmente nos estados das regiões Sul e Nordeste, com destaque para essa última, que possui o maior rebanho nacional (mais de 93% da população de caprinos), especialmente nos estados da Bahia, Paraíba e Pernambuco, distribuído por mais de 18 mil estabelecimentos, segundo o IBGE (2012).

Conforme a FAO (2014), 95% de cabras em todo o mundo estão concentrados em países em desenvolvimento, fornecendo múltiplas oportunidades de desenvolvimento incluindo a segurança alimentar e a redução da pobreza. As cabras são animais de menor porte, permitindo que grandes rebanhos possam ser criados em pequenas áreas e em condições adversas, como pouca chuva ou baixo potencial agrícola (GEROSA & SKOET, 2012).

De acordo com Dutra et al., (2014), a indústria do leite de cabra no Brasil ainda se caracteriza por criadores do sistema de produção familiar, com baixa produção diária (cerca de 80 L) e produção irregular de leite durante a estação seca. Isso dificulta a logística da indústria de laticínios em termos de planejamento para a coleta e processamento, além disso a dificuldade econômica, de empregar o resfriamento do leite na própria fazenda antes do recolhimento pela indústria.

Apesar das vantagens nutricionais, o mercado brasileiro de leite de cabra e seus derivados ainda encontram desafios, que vão além dos problemas de qualidade do leite que chega à indústria, decorrente de problemas de ordem econômica e/ou culturais até problemas relacionados à aceitação de produtos lácteos de cabra (DUTRA et al., 2014).

3.1.2 Composição do leite de cabra

A composição do leite em geral pode diferir consideravelmente devido à influência de fatores genéticos (não só em espécies, mas também entre as raças), fatores fisiológicos (fase de lactação ou intervalo de ordenha), fatores nutricionais (valor energético da alimentação e composição) e fatores ambientais (localização ou estação do ano) (POTOCNIK et al., 2011).

A composição do leite de cabra é semelhante à de outras espécies mamíferas, ou seja, é constituído por água, proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, entretanto, cada componente difere quantitativamente, dessa forma são observadas diferentes características sensoriais entre o leite de cabra e o leite de outros animais (CLAEYS et al., 2014).

O leite de cabra é uma importante fonte de proteínas de interesse nutricional e tecnológico na fabricação de produtos lácteos, possui entre 2,7 - 5,3% de proteínas, valor superior ao encontrado no leite de vaca, que possui entre 3,0 - 3,55% (NAERT et al., 2013; CLAEYS et al., 2014).

A maior parte do conteúdo proteico do leite de cabra encontra-se na forma de micela de caseína (23,3-46,3 g/L de leite), que é constituída pelas frações: α_{s1} -caseína (0-13 g/L), α_{s2} -caseína (2,3-11,0 g/L), β -caseína (0-29,6 g/L), κ -caseína (2,8-13,4 g/L), ou na forma de proteínas do soro (3,7-7,0 g/L de leite), constituído pelas frações: β -lactoglobulina (1,5-5,0 g/L), lactoferrina (0,02-0,2 g/L) (POTOCNIK et al., 2011; PARK et al., 2007).

As micelas de caseína do leite de cabra também diferem em tamanho, possuem maior nível de mineralização, e são menos solvatadas, apresentando menor estabilidade ao calor do que as micelas do leite bovino (PARK et al., 2007). A porção proteica da caseína no leite de cabra (23,3-46,3 g/L) é maior que no leite de vaca (24,6-28,0 g/L) fato este que proporciona maior rendimento na fabricação de queijos utilizando leite de cabra comparado ao uso do leite de vaca como matéria-prima (GUO et al., 2007).

Os coalhos formados pelo leite de cabra no estômago mais fáceis de serem digeridos comparados ao leite de vaca, por isso são mais indicados na alimentação infantil (UNIACKE-LOWE, 2011). A α -lactoalbumina é o componente proteico que possui menor digestibilidade, as outras proteínas do soro, são facilmente digeríveis, independente do tipo de leite (INGLINGSTAD et al., 2010).

O leite de cabra possui, em média, 3,0-7,2% de lipídios. É formado por 97-98% de triglicerídeos, 0,5-1,5% de fosfolipídeos e 0,7-1,5% de ácidos graxos livres (DOREAU & MARTIN-ROSSET, 2002; PARK et al., 2007; UNIACKE-LOWE, 2011). Particularmente, no Brasil, estudos comprovam variações entre 3,26 a 3,34 no percentual de gordura no leite de cabra de rebanhos da região Nordeste (DUTRA et al., 2014).

Os glóbulos de gordura apresentam menor diâmetro, fato que proporciona maior digestibilidade. A superfície do glóbulo de gordura é importante devido ao acesso das lipases gástricas aos tri-acilgliceróis (DEVLE et al., 2012; NAERT et al., 2013) sendo recomendado seu consumo regular, pois traz benefícios à saúde.

O principal carboidrato presente no leite de cabra é a lactose, que é encontrada na proporção entre 3,2% e 5,0% e uma pequena porção de oligossacarídeos (ADOLPHI et al., 2009). Esse disacárido é formado por glicose e galactose, e tem como principal característica a baixa intensidade do sabor doce, e a sua proporção no leite vai depender de vários fatores, como alimentação, período de lactação e saúde do animal (CLAEYS et al., 2014).

No leite de cabra são encontradas as vitaminas B1-tiamina (28-80 mg/L); B2-riboflavina (110-210 mg/L); B7-biotina (1,5-3,9 mg/L), apresentando coloração mais branca comparado ao leite de vaca devido a capacidade de converter o β -caroteno (50-68 mg/L) em vitamina A (PARK et al., 2007). Também são encontrados importantes minerais como o cálcio (85-198 mg/100 mL), fósforo (79-153 mg/100 mL), potássio (140-242 mg/100 mL) e magnésio (10-36 mg/100 mL) em proporções superiores aos encontrados no leite de vaca, que são necessários para o crescimento ósseo e manutenção do metabolismo (ADOLPHI et al., 2009; CASHMAN, 2006; CLAEYS et al., 2014).

3.1.3 Parâmetros de qualidade do leite de cabra

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000), órgão responsável por fiscalizar a produção de leite de cabra no país, através da Instrução Normativa nº 37/2000, define o leite de cabra como “o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados”, no qual estão inclusos no documento em vigor os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros de referência físico-químicos e microbiológicos do leite de cabra cru segundo a IN 37/2000.

Acidez (g Ác. Lát./100mL)	0,13-0,18
Gordura (%)	Mín. 2,9g/100g
Proteína (%)	Mín. 2,8g/100g
Lactose (%)	Mín. 4,3g/100g
Sólidos não gordurosos (%)	Mín. 8,2g/100g
Cinzas (%)	Mín. 0,7g/100g
Bactérias Mesófilas aeróbias	Máx. 5,70 (5×10^5 UFC/mL)

3.1.4 Importância, impacto social e aceitação do leite de cabra

O leite de cabra é um alimento completo, rico em proteínas, vitaminas, minerais, e as moléculas de gordura pequenas, o que torna altamente digerível comparado com o leite de outras espécies (POTOCNIK et al., 2011). Estas características nutricionais têm contribuído para o crescimento do mercado de produtos lácteos de cabra, e conseqüentemente, têm atraído o interesse dos criadores em diferentes regiões do país (PARK et al., 2007).

Dentre os fatores mais decisivos para o crescimento do consumo de leite de cabra e seus derivados são os seus efeitos benéficos para saúde humana, sendo considerado uma boa alternativa para a substituição do leite de vaca em várias condições clínicas, como alergia, atopia e doenças inflamatórias, com sucesso em 30 e 40% dos casos (JIRILLO et al., 2010; HAENLEIN, 2004).

O desenvolvimento de alergia ao leite é uma condição comum que afeta 5,7% das crianças brasileiras durante os primeiros 3 anos de vida e 12% a 30% de crianças com menos de 3 meses de idade (BINSFELD et al., 2009). A alergia ao leite é atribuído a concentração de α 1-caseína e α -lactoglobulina (POTOCNIK et al., 2011).

O Nordeste possui o maior rebanho de caprinos do país, com cerca de 10 milhões de animais, o que representa mais de 93% do rebanho nacional (FAO, 2014). Essa Região é responsável por 67% de toda a produção de leite de cabra no país, segundo o IBGE (2012).

O leite de cabra tem uma pequena aceitação devido ao seu odor e sabor característicos, entretanto o isolamento do animal durante o período de lactação é uma

alternativa para minimizar o odor acentuado que está associado à baixa aceitação do leite de cabra (COSTA et al, 2010). Queiroga et al., (2012) observou melhoria na aceitabilidade do queijo de coalho fabricado a partir da substituição parcial do leite de cabra pelo leite de vaca.

Alguns fatores podem influenciar o sabor característico do leite de cabra, Morgan e Gaborit (2001) relataram que a armazenagem em temperatura de resfriamento aumentou o sabor característico do leite de cabra, enquanto que o tratamento de calor como resultado uma ligeira redução.

3.1.5 Queijo de coalho de leite de cabra

De acordo com a IN N° 30/2001, “entende-se por Queijo de Coalho, o queijo que se obtém por 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 10 (dez) dias de fabricação” (BRASIL, 2001, p.13).

É um produto fabricado a partir do leite cru ou pasteurizado na região Nordeste há mais de 150 anos e não possui uma forma padronizada de produção. Apresenta alto rendimento, sua forma de produção é simples e apresenta boa aceitação comparada ao leite *in natura*, apresenta consistência semi-rígida ou emborrachada, de média a alta umidade, o que confere ao produto um alto valor comercial (SANT’ANA et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013).

O queijo de coalho de leite de cabra apresenta uma grande quantidade de água em sua composição, sendo classificada pela Portaria N°146/96 como queijo de média a alta umidade (46-55%), apresentando proporção média de 15,78 - 23,72% de proteínas, 16,44 - 24,07% de lipídios e 1,26 - 3,1% de lactose (SANT’ANA et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013). A composição do queijo de coalho dependerá da qualidade do leite utilizado como matéria-prima, da forma de produção, entre outros fatores (QUEIROGA et al., 2013).

A Portaria Nº146/96 estabelece os requisitos microbiológicos do queijo, de acordo com a classificação, segundo o conteúdo de umidade da massa (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros de referência microbiológicos do queijo de coalho da Portaria nº 146/96 para queijos entre 45-55% de umidade.

Contagem Microbiológica	
<i>Salmonella spp.</i> (Ausência em 25g)	ausência
<i>Listeria monocytogenes</i> (Ausência em 25g)	ausência
Coliformes a 35°C (Log ₁₀ UFC/mL)	4,00
Coliformes a 45°C (Log ₁₀ UFC/mL)	5,70
<i>Staphylococcus coag. pos.</i> (Log ₁₀ UFC/mL)	3,00

A legislação federal estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996), entretanto, na maior parte dos casos o leite utilizado na fabricação não é pasteurizado o que representa um risco em potencial para o consumidor devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos.

3.2 MICRORGANISMOS EM LEITE E DERIVADOS

3.2.1 Contaminação alimentar

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) representam um relevante risco à saúde do consumidor. As toxinfecções de origem bacteriana, transmitidas por alimentos, são importantes causas de gastroenterites severas, que podem resultar em hospitalizações e complicações, representando um problema de saúde pública (GREIG; RAVEL, 2009).

Os alimentos de origem animal, como carnes, ovos e especialmente o leite e seus derivados são os alimentos mais envolvidos em casos de DTA's. Os agentes patogênicos veiculados por esses alimentos são na sua maioria bactérias como *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre outros, que são oriundos da contaminação em algum estágio da manipulação (CLAEYS et al., 2013).

Um aspecto ligado aos casos de DTA's é o consumo de leite cru e seus derivados com a finalidade de manutenção integral dos seus constituintes, que potencializam

benefícios específicos, como a susceptibilidade reduzida a alergias, qualidade nutricional superior e um melhor sabor (O'MAHONY et al., 2009), contudo o consumo de leite cru representa um risco microbiológico realista para o consumidor, devido a possibilidade da presença de agente patogênicos (CLAEYS et al., 2013).

3.2.2 Bactérias mesófilas aeróbias

As bactérias mesófilas constituem um grupo capaz de se multiplicar entre 10°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30°C. É um importante grupo que inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir altas contagens quando o alimento é mantido à temperatura ambiente (DE GARNICA et al., 2013).

Segundo o International Commission on Microbiological Specifications for foods (ICMS) (1984) “o número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada”.

3.2.3 Bactérias psicotróficas

As bactérias psicotróficas apresentam como principal característica a possibilidade de se multiplicar em temperaturas baixas, porém apresentam temperatura ótima e máxima de crescimento acima de 15 e 20 °C, respectivamente (MOYER & MORITA, 2007). São formadas por bactérias de diversos gêneros, como: mesófilas, aeróbias ou anaeróbias, gram-positivas e gram-negativas, formadoras ou não de esporos e crescem mais lentamente a temperaturas mais baixas. As principais bactérias psicotróficas que estão presentes no leite de cabra cru são basicamente similares às encontradas no leite de vaca, sendo composta principalmente por *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (MCPHEE & GRIFFITHS, 2011).

Embora a pasteurização do leite cru diminua sua carga microbiana, a eficiência do processo e a qualidade resultante dos produtos lácteos dependem da microbiológica do leite cru (NÖRNBERG et al., 2010).

A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive a tratamentos térmicos aplicados ao leite durante o processamento normal. Entretanto, durante o crescimento no leite cru, estas produzem algumas enzimas (proteases e lipases) termo-estáveis que mantêm o seu potencial de deterioração mesmo após os tratamentos como a pasteurização (72-75 °C por 15-20s) e, até mesmo, à ultra alta temperatura –UHT (130-150°C por 2-4s) (DE JONGHE et al., 2011; DUNSTALL et al., 2005).

Estas enzimas podem interferir na coagulação adequada do leite durante a produção de queijo, causando a redução do rendimento devido a degradação da caseína em aminoácidos que se perdem na desoragem e problemas de deterioração, devido à ação das proteases, que geram sabores amargos, e lipases, que hidrolisam a gordura do leite dando origem a ácidos graxos livres (AGL) e geram sabores fortes que, na maioria dos casos são considerados indesejáveis, colocando em risco a sua qualidade (MCPHEE & GRIFFITHS, 2011; MANKAI et al., 2012).

Além disso, em condições de baixa temperatura de crescimento as bactérias psicrotróficas aumentam a síntese de fosfolípidos e lípidos que contém proporções de ácidos graxos insaturados, resultando numa redução do ponto de fusão dos lípidos. Este fenômeno serve para manter a sua fluidez, permitindo assim a continuação da funcionalidade, do transporte de solutos, a secreção de enzimas extracelulares através da membrana (BEALES, 2004).

O armazenamento refrigerado do leite cru controla de modo eficaz o desenvolvimento de populações de bactérias mesófilas, entretanto, ao mesmo tempo, proporciona uma vantagem seletiva para o crescimento de bactérias psicrotróficas, que podem a vir formar biofilme (DE JONGHE et al., 2011; SAMARZIJA et al., 2012).

Mcphee & Griffiths, (2011) relataram a presença 70,2% de *Pseudomonas*, e o crescimento de $1,3 \times 10^5$ UFC/mL para $1,3 \times 10^7$ UFC/mL depois do armazenamento por mais de 48 horas a 6° C.

3.2.4 Coliformes totais e termotolerantes

Este grupo é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35 - 37°C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos; sensíveis à concentração de ácidos e sais, fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos gêneros

Escherichia, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. A presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos, pois esse grupo inclui diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas* (CUNHA, 2006). A pesquisa de bactérias do grupo coliformes é importante devido à sua relação com a higiene durante a produção.

Os coliformes termotolerantes diferenciam-se dos coliformes totais por fermentarem lactose com produção de gás a uma temperatura de $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas e serem resistentes à ação dos sais biliares. O principal representante do grupo termotolerante e o indicador mais específico de contaminação fecal e de eventual presença de organismos patogênicos é a *Escherichia coli*.

Yamazi et al., (2013) reportaram o valor de 3 Log UFC/mL para coliformes totais ao analisar leite de cabra cru no estado de Minas Gerais. Oliveira et al., (2011) ao analisarem leite de cabra cru no estado do Ceará, constataram que 62,5% das amostras apresentavam contagem superior 7,30 Log UFC/mL.

3.2.5 *Staphylococcus* coagulase positiva

O *Staphylococcus* é uma bactéria gram positiva, que forma colônias com aspecto de cachos de uva, são anaeróbios facultativos, ou seja, facultativamente, podem viver em meios anaeróbios (por intermédio da fermentação), produtor de toxinas, com crescimento mais acelerado em meios aeróbios e possui faixa de temperatura ótima para crescimento entre 30 e 37°C (GREIG; RAVEL, 2009; CLAEYS et al., 2013).

Esse microrganismo tem como habitat tanto o homem quanto os animais, sendo principalmente encontrado na pele, glândulas e membranas mucosas. A sua presença no leite e seus derivados sugere que a matéria-prima utilizada pode ser de animais infectados, ou que o manipulador possa ser portador, fato que faz com que sua presença no alimento seja considerada um representante de manipulação inadequada (LEJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009).

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária causado pelo crescimento de microrganismos, especialmente o *Staphylococcus*, que determina sérios prejuízos econômicos e representa risco iminente à saúde pública, tendo em vista que

microrganismos causadores de mastites são potencialmente patogênicos para os seres humanos (MCPHEE & GRIFFITHS, 2011).

A contaminação por *Staphylococcus* é preocupante, pois as enterotoxinas produzidas são causadoras de intoxicações alimentares, resultando em gastroenterite. Embora a produção de enterotoxinas estafilocócicas esteja geralmente associada ao *Staphylococcus* coagulase positiva, algumas espécies não produtoras da enzima (coagulase negativa) também produzem a toxina (MATA et al., 2010). A sua presença no leite cru é particularmente preocupante, pois embora a pasteurização do leite destrua as colônias do *Staphylococcus*, as enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis e não perdem sua atividade (CLAEYS et al., 2013).

Oliveira et al., (2012) reportaram a presença de 6,30 Log₁₀ UFC/mL de *Staphylococcus* coagulase positiva em leite de cabra cru oriundo da região do Cariri no Nordeste do Brasil. Em estudo usando o mesmo tipo de matéria-prima Almeida et al., (2013) encontrou valores médios 4,5 Log UFC/mL.

3.2.6 *Salmonella* sp

Salmonelas são bacilos Gram-negativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C e multiplicação na faixa de pH entre 4,0 e 9,5, estão amplamente distribuídas no ambiente e residem, primariamente, no trato intestinal de animais e de humanos, a contaminação no homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados (KUMAR et al., 2009).

A *Salmonella* é um patógeno causador da salmonelose, uma infecção alimentar com sintomas de diarreia intensa e dores abdominais fortes. Estima-se que aproximadamente 75% dos casos de infecção estão associadas ao consumo de carnes, ovos e leites e seus derivados, principalmente se forem consumidos sem serem submetidos ao tratamento térmico (HALD et al., 2004). A principal forma de eliminar esse microrganismo dos alimentos é o tratamento térmico, onde o efeito do calor proporciona uma redução acima de 98% da carga microbiana (MATA et al., 2010). Tal característica, é ressaltada em estudos, como realizado por Evencio-luz et al., (2012) que alertam para o alto risco de infecções alimentares causadas por *Salmonella* sp ao consumir queijo coalho fabricado a partir do leite cru.

3.2.7 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria encontrada na forma de bacilos pequenos, anaeróbio facultativo, e gram positivo, que pode aparecer isolado ou agrupado em pares ou cadeias curtas. Apresenta a capacidade de crescer em baixas concentrações de oxigênio e temperaturas de refrigeração, e sobrevive durante longos períodos no ambiente ou nos alimentos (CAC/GL 61, 2007; LINTON et al., 1992).

A *Listeria monocytogenes* é responsável pela listeriose, que tem como sintomatologia o estado febril do indivíduo ou a listeriose invasiva, em que o microrganismo penetra o revestimento do trato gastrointestinal e, em seguida, estabelece infecções em locais normalmente estéreis dentro do corpo humano. Ambas listerioses estão associadas ao consumo de leite contaminado e queijos frescos, principalmente quando a matéria-prima não sofreu nenhum tratamento térmico. A Listeriose invasiva é relativamente rara, mas muitas vezes grave, com incidência de 3 a 8 casos por 1.000.000 indivíduos, mas apresenta preocupantes taxas de mortalidade de 20 a 30% (CAC/GL 61, 2007; AYGUN & PEHLIVANLAR, 2006; OLIVER, JAYARO, & ALMEIDA, 2005).

Os grupos de maior risco são as mulheres grávidas, recém-nascidos, adultos com doença (câncer, AIDS, diabetes, desordem hepática crônica), os idosos (> 65 anos), e indivíduos imunocomprometidos (MCLAUCHLIN, et al., 2004). A alta taxa de mortalidade associada à listeriose tem contribuído para a *L. monocytogenes* ser considerada um perigo à saúde pública.

Rahimi et al., (2010) ao analisarem o leite de cabra cru, relatou a presença de *Listeria* spp. em 6,7% das amostras e a presença de *Listeria monocytogenes* em 1,7% das amostras. Os resultados deste estudo indicam o risco potencial de infecção por *Listeria* em pessoas que consomem leite e produtos lácteos não pasteurizados.

Em um estudo realizado nos EUA, foi relatada a presença de *Listeria* spp. em 35 (7,8%) de 450 amostras de leite de cabra cru no qual foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em 17 (3,8%) das amostras sendo relatada também presença de *Listeria* spp. em diferentes tipos de queijo (Abou-Elainin et al., 2000).

3.3 ATIVIDADE DO SISTEMA LACTOPEROXIDASE

3.3.1 O Sistema Lactoperoxidase

O Sistema Lactoperoxidase (SLP) 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) que é uma proteína sintetizada na glândula mamária; o íon tiocianato (SCN^-) que é originado pelo metabolismo hepático; e as moléculas de oxigênio reativas que são derivadas da atividade de leucócitos e de outras células (DE WIT; VAN HOOIJDONK, 1996). O SLP consiste na adição de tiocianato de sódio (NaSCN) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para reativar a enzima LP, que está naturalmente no leite. No estado natural, os fatores limitantes do SLP são os íons tiocianato e o oxigênio reativo, porque, apesar de serem encontrados no leite, suas concentrações dependem de muitos fatores relacionados ao animal, como a dieta, condições fisiológicas, manejo, entre outros (CHO et al., 2013).

Com relação ao significado biológico da LP, nota-se que ela participa do sistema de defesa natural do hospedeiro contra micro-organismos invasores (REITER; HAMULV 1984). 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 (CAMPBELL; DRAKE, 2013). Segundo Reiter e Hamulv (1984), Bjork (1975), Tenuovo (2002) e Furtmuller et al. (2002), o SLP atua como um antioxidante, protegendo assim, as células de mamíferos contra as espécies altamente reativas de oxigênio, e as células do tecido mamário não são afetadas pela oxidação dos produtos do íon tiocianato, sinalizando que o SLP é atóxico para as células humanas.

A enzima lactoperoxidase (LP) é uma glicoproteína com uma cadeia peptídica de 612 aminoácidos, com um peso molecular de 78.500 Daltons e tem um teor de 10% de carboidratos. É encontrada no leite e em outras secreções exócrinas, tais como saliva, lágrimas e vias respiratórias (WOLF et al., 2000; ZAMOCKY et al., 2008; FURTMULLER et al., 2006; BATTISTUZZI et al., 2010). A LP é uma enzima que contém um grupo heme 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 (TENUOVO, 1985).

A LP pertence à família das peroxidases (EC 1.11.1.7), um grande grupo de enzimas naturais encontradas em plantas e animais, incluindo todos os mamíferos,

inclusive o homem (CAMPBELL et al., 2013). A peroxidase isolada à partir do leite, recebe o nome de lactoperoxidase (REITER, 1984) que juntamente com mieloperoxidase, eosinófilos peroxidase e peroxidase da tireoide, constituem a superfamília II das peroxidases de mamíferos que se distingue da superfamília I das peroxidases, que são enzimas de plantas, fungos e bactérias (BATTISTUZZI et al., 2010; ZAMOCKY et al., 2008).

A lactoperoxidase é uma enzima oxiredutase secretada em todos os leites de mamíferos, desempenhando um papel importante na proteção da glândula mamária lactante e no trato intestinal de recém-nascidos contra micro-organismos patogênicos, (AHARIZ & COURTOIS, 2010; PRUITT & TENOVUO, 1985). Essa associação da LP na atividade antibacteriana e antifúngica foi sugerida por Hanssen (1924).

A concentração mínima para sua ação bactericida é de 0,02 UA/mL, garantindo que, sob qualquer condição do leite cru, há a concentração requerida (KIM et al., 2014). 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, concordando com o estabelecido pelo Codex Alimentarius Commission – CAC (1991).

A LP é instável ao aquecimento em altas temperaturas, assim, a sua presença ou ausência no leite tem sido utilizada para caracterizar o tratamento térmico entre a pasteurização, pasteurização excessiva e o processo UHT (APRODU et al., 2014).

Segundo Bjorck, (1975) a estabilidade térmica em temperaturas médias é devido aos dois domínios estruturais de estabilidades diferentes, isto é, um núcleo α -hélice, altamente resistente à temperatura e uma região periférica, com algumas estruturas β -folhas, caracterizada por uma variabilidade conformacional superior. A LP 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 (FURTMULLER et al., 2002).

Segundo Kho et al. (2012), a pasteurização a 68° não afeta a atividade da LP, a 73°C, durante 15 segundos, reduz a 70%, porém, a 80 °C, durante 15 segundos, a desativa completamente. Segundo Aprodu et al. (2014) o grau de desnaturação varia entre 50% e 70% no intervalo de temperatura de 65 °C a 80 °C, destacando que, a partir da temperatura de 70 °C ocorre importante alteração na estrutura da LP. Uma pesquisa de Atasever et al. (2013) confirma o fato de que a pasteurização normal do leite não desativa a LP. Os autores relataram que, após a pasteurização normal 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 LP é inativada irreversivelmente por um excesso de peróxido de hidrogênio, ao destruir os radicais superóxido e hidroxila do grupo heme (REITER; HAMULV, 1984), como, também, é inativada pela luz na presença de riboflavina e oxigênio ou por excessivo crescimento de microrganismos (FURTMULLER et al., 2002).

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), no rim e em fluidos biológicos, tais como o plasma ou o líquido cefalorraquidiano (BARRETT, 2012; REITER, 1984).

As fontes de tiocianato são os glucosinolatos e os glicosídeos cianogênicos. Os glucosinolatos são encontrados em espécies do gênero Brassica (família *Cruciferae*), como a couve-flor, repolho e nabos, que formam tiocianato durante a sua hidrólise e os glicosídeos cianogênicos são encontrados em milho, cana-de-açúcar, ervilhas e feijões (REITER; 1984; BARRETT, 2012; FURTMULLER et al., 2006).

De acordo com Bjorck (1975), os níveis de tiocianato, no leite bovino variam entre 0,02 e 0,6 mmol/L. Ponce et al. (2010) relataram 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). Ponce et al. (2010) reportaram que o leite de vaca fresco contém de 1 a 10 mg de tiocianato por litro, o que nem sempre é suficiente para ativar o SLP.

Segundo Reiter e Harmulv (1984) 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 400 mg 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 (APRODU et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um agente oxidante, com efeito bactericida e, normalmente, não é encontrado no leite cru (FAO, 1990). As fontes naturais de peróxido de hidrogênio é o metabolismo das bactérias lácticas, gram-positivas e catalase negativas, tais como lactobacilos, lactococos e estreptococos que produzem, em condições aeróbicas,

suficiente peróxido de hidrogênio para ativar o sistema lactoperoxidase (SLP) (CARLSSON; IWAMI; YAMADA, 1983; BRAVO; ALBA; MEDINA, 2014).

A ativação do SLP é feita adicionado o tiocianato e o peróxido de hidrogênio exogenamente, em solução ou na forma sólida (REITER, 1984). O peróxido de hidrogênio também pode ser fornecido enzimaticamente, por meio de ação da glicose oxidase, ou a xantina oxidase (BRAVO; ALBA; MEDINA, 2014).

O critério estabelecido pelo Codex Alimentarius Commission – CAC (1991), para ativação exógena do SLP, 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 Hamid e Rehman (2009), 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, em baixas concentrações e na presença de LP e SCN⁻, as células de mamíferos estão protegidas contra a toxicidade, uma vez que, o H₂O₂ desaparece pela ação da enzima catalase, desdobrando-o rapidamente em água (CHO et al., 2013).

3.3.2 Mecanismo de ação do sistema lactoperoxidase

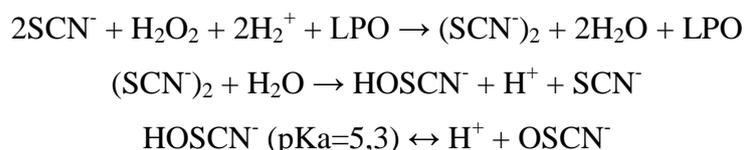
As reações de peroxidação do íon tiocianato são complexas e dependem de vários fatores, incluindo a concentração de peróxido de hidrogênio e a sua origem (endógena ou exógena). Porém, um primeiro passo é a redução do núcleo heme da enzima e a formação de um radical livre de oxigênio. Na presença de suficiente composto tiocianato oxidado como doador de elétrons, se forma um componente I, o qual condiciona a ótima ativação da enzima (REITER; HARNULV, 1984; APRODU et al., 2014).

Thomas (1985); Hogg e Jago (1970) propuseram 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:

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

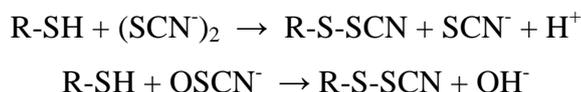


b) nessa segunda via, a oxidação de SCN^- , catalisada pela enzima LPO, pode dar lugar ao tiocianogênio $(\text{SCN}^-)_2$, que rapidamente se hidrolisa e gera o ácido hipotiocianoso (HOSCN) em equilíbrio ácido-base com o OSCN^- ($\text{pKa}=5,3$) (). A esse valor de pKa existem quantidades equimolares dos dois compostos.



Em ambas as vias, o metabólito principal e, ao mesmo tempo, que se forma em maior quantidade é o hipotiocianato (OSCN^-) (KUSSENDRAGER e 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 cianossulfuroso (HO_2SCN) e ácido cianossulfúrico (HO_3SCN) (AUNE & THOMAS, 1977; ORAM e REITER, 1966; PRUITT e TENOVUO, 1985). Porém, Kalmar et al., (2011) demonstram que o $(\text{SCN}^-)_2$ não pode ser um precursor durante a oxidação enzimática do SCN^- em pH neutro.

Os produtos oxidados do tiocianato reagem rapidamente com os grupos sulfidrilo das proteínas para gerar sulfenil tiocianato (R-S-SCN) em equilíbrio com ácido sulfênico (AUNE & THOMAS, 1977). A reação de $(\text{SCN}^-)_2$ ou OSCN^- com proteínas oxida as proteínas sulfidrilas para derivados de tiocianato de sulfenilo (WRIGHT; TRAMER, 1968).



Derivados de tiocianato de sulfenilo podem sofrer outras modificações, incluindo a hidrólise reversível para originar os ácidos sulfênicos (AUNE & THOMAS, 1977).



Este mecanismo constitui a chave para a inibição dos micro-organismos pela ativação do SLP.

3.3.3 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana do SLP é atribuída à oxidação do grupo sulfidrilo (SH) de várias enzimas e de outras proteínas microbianas pelo íon hipotiocianato (OSCN^-) que se acumula durante a reação de oxidação do tiocianato catalisada pela LP, uma vez que este grupo é essencial para a atividade de numerosas enzimas e proteínas (REITER; HARNULV, 1984;).

Segundo Atasever et al. (2013), o dano causado na estrutura das proteínas bacterianas, consequência da ação oxidativa do grupo sulfidrilo sobre a membrana citoplasmática, resulta na perda de íons de potássio, aminoácidos e polipeptídeos para o meio. Como resultado, altera-se o consumo de glicose, aminoácidos e purinas, o que afeta a síntese de proteínas pelos bloqueios concomitante das funções do DNA e RNA (REITER; HARNULV, 1984).

A atividade de todo o sistema (LP + substratos) é conhecido por ser mais eficaz do que hipotiocianato sozinho, quer enzimaticamente ou quimicamente produzidos. Este fato tem sido explicado pela produção de intermediários altamente reativos de curta duração, como O_2SCN^- e O_3SCN^- pela enzima, ou pela oxidação de OSCN^- em condições de excesso de H_2O_2 (PRUITT & TENOVUO, 1985).

O efeito bacteriostático e/ou bactericida da atividade do SLP dependerá da sensibilidade da espécie do microrganismo, tempo de exposição ao SLP, da concentração do hipotiocianato, temperatura e do pH do meio (HAWKINS, 2009).

Diferentes grupos de bactérias mostram um grau variável de sensibilidade ao SLP. Nas bactérias gram-negativas, catalase positivas, como coliformes, pseudomonas e salmonelas, o sistema possui ação não somente inibidora, mas, também, bactericida, dependendo das condições do meio, como o pH, temperatura e tempo de incubação (FURTMULLER et al., 2002; CAMPBELL; DRAKE, 2013; CHO et al., 2013). Conforme os autores, as bactérias gram-positivas, catalase negativa, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, são as mais resistentes e, nesse caso, o SLP possui

somente ação inibidora sobre o crescimento. Essa diferença de sensibilidade ao SLP pode, provavelmente, ser explicada pelas diferenças na estrutura da parede celular e suas propriedades, assim como pelos compostos inibidores gerados pelas mesmas (REITTER; HARNULV, 1984; DE WIT; VAN HOOYDONK, 1996). A membrana interna das bactérias Gram-negativas parece ser mais danificada pelo tratamento do SLP que as de espécies Gram-positivas (CAMPBELL; DRAKE, 2013).

A atividade antimicrobiana do SLP contra *E. coli* parece estar relacionada com a oxidação de sulfidril bacteriana (BRAVO; ALBA; MEDINA, 2014). A oxidação de sulfidril, para derivados de sulfenilo, inibe a respiração bacteriana. Porém, de acordo com Campbell e Drake, (2013), o efeito inibitório do SLP, contra *E. coli*, está relacionado com a inibição de desidrogenases na cadeia respiratória da *E. coli*. A atividade antimicrobiana do SLP, contra *E. coli* O157:H7 também foi relatada (APRODU et al., 2014).

O SLP exerce ambas as atividades bacteriostática e bactericida contra as cepas *Salmonella* (FURTMULLER et al., 2002). No estudo de CHO et al. (2013) relatou que a atividade bactericida foi dependente da permeabilidade da parede celular bacteriana.

4 REFERÊNCIAS

ABOU-ELEININ, A. A. M.; RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W &. Incidence and seasonal variation of *Listeria* species in bulk tank goat's milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines: IAFP, v.63, p.1208–1213, 2000.

ADAMSON, M.; PRUITT, K.M. Lactoperoxidase-catalyzed inactivation of hexokinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 658, n.2, p.238–247, 1981.

AHARIZ, M.; COURTOIS, P. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypiodite. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, n. 2, p.69–78, 2010.

ALMEIDA, J. F.; AQUINO, M. H. C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.1, p.13-18, 2013

APRODU, L.; STANCIUC, N.; DUMITRASCU, L.; RAPEANU, G.; STANCIU, S.; Investigations towards understanding the thermal desnaturation of lactoperoxidase. **Internationnal Dairy Journal**, v.38, p.47-54, 2014.

ATASEVER, A.; OZDEMIR, H.; GULCIN, I.; KUFREVIOGLU, I.O. Ones-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. **Food Chemistry**, v.136, p.864-870, 2013.

AUNE, T.M.; THOMAS, E.L. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. **European Journal of Biochemistry**, v.80, n.1, p.209-214, 1977.

AYGUN, O. & PEHLIVANLAR S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy productsin. **Food Control**, Antakya, Turkey, v.17, p.676-679, 2006.

BARRETT, T. J. Hawkins,C.L.Hypothiocyanousacid:benignordeadly? **Chem. Res. Toxicol**, v.25, p.263-273, 2012.

BATTISTUZZI, G.; BELLEI, M.; BORTOLOTTI, C. A.; SOLA, M. Redox properties of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p.21–36, 2010.

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.

_____. Lactoperoxidase. *Advances in Dairy Chemistry Protein*. P. O. **Fox edition**, London: Elsevier, v. 1, p.332-338, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº146 de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março de 1996, seção I, p. 3977, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº37 de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 de novembro de 2000, seção I, p. 23, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30 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, 2001.

BRAVO, D.; ALBA, M.; MEDINA, M. Combined treatments of high-pressure with the lactoperoxidase system or lactoferrin on the inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carpaccio. **Food Microbiology**, v.41, p.27-32,2014.

CAC/GL 61. **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of listeria monocytogenes in foods**, v.1, p.28, 2007.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 2008. 1ª Ed. Dig., cap. 27, p. 98-840.

CAMPBELL, R. E.; DRAKE, M. A. Cold enzymatic bleaching of fluid whey. **Journal Dairy Science**, v. 96, p.7404-7413, 2013.

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.

CHO, M. A.; KIM, Y. Y.; CHANG, J. Y.; KHO, H. S. Interactions between hyaluronic acid, lysozyme, and the glucose oxidase-mediated lactoperoxidase system in enzymatic and candidacidal activities. **Archives of Oral Biology**, v. 58, p.1249-1356, 2013.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K. et al. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, p.251 e 262, 2013.

_____.; Verraes, C.; Cardoen, S.; Block, J.; Huyghebaert, A.; Raes, K.; Dewettinck, K.; Herman, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. Review. **Food Control**, v. 42, p.188-201, 2014.

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/CGC_013e.pdf>. Acesso em: 26 dez 2014.

_____. **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/CGC_013e.pdf>. Acesso em: 12 jan 2015.

DE GARNICA, M.L.; LINAGE, B.; CARRIEDO, J.A. Relationship among specific bacterial counts and total bacteria and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. **J. Dairy Sci.**, v.96, p.1021-1029, 2013.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K. et al. Influence of storage conditions on the growth of Pseudomonas species in refrigerated raw milk. **Appl Environ Microbiol**, v.77, p.460- 470, 2011.

DEVLE, H.; VETTI, I.; NAESS-ANDRESEN, C. F.; RUKKE, E. O. et al. A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and nonruminant milk. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, p.1036 e 1043, 2012.

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.

DOREAU, M.; MARTIN-ROSSET, W. Dairy animals: horse. In: H. Roginsky, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), **Encyclopedia of dairy sciences**. London: Academic Press, p. 358 e 365, 2002.

DUTRA, C. M. C.; SVIERK, B.; RIBEIRO, M. E.R.; PINTO, A. T.; ZANELA, M. B.; SCHMIDT, V. Effects of cold storage on the quality parameters of goat milk. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.1, p. 36-42, 2014.

DUNSTALL, G.; ROWE, M.T.; WISDOM, G.B. et al. Effect of quorum sensing agents on the growth kinetics of Pseudomonas spp. of raw milk origin. **J Dairy Res**, v. 72, p.276-280, 2005.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Evaluation of certain food and contaminants. 35º Relatório da Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives. **Who Technical Report Series**. Who: Geneva, p. 789, 1990.

_____. (2012). Production/Livestock Primary/South America/list/Milk goat – Brazil. **Food Animal Organization.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 30 jun 2015.

_____.(2014). **FAOSTAT agriculture data.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>. Acesso em: 30 jun 2015.

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

_____.; ZEDERBAUER, M.; JANTSCHKO, W.; HELM, J., BOGNER, M.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 445, p. 199-213, 2006.

GEROSA, S.; SKOET, J. **Milk availability eTrends in production and demand and medium-term outlook.** Rome (Italy): FAO, United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>. Acesso em: 30 jun 2015.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p.77-87, 2009.

HALD, T.; VOSE, D.; WEGENER, H.C.; KOUPEEV, T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. **Risk Anal**, v. 24, p. 255-269, 2004.

HAMID, M.; REHMAN, K. U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistr**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

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

HAWKINS, C. L. The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems HOSCN in biological systems. **Free Radical Research**, v. 43, n. 12, p.1147–1158, 2009.

HOGG, D. M.; JAGO, G. R. The antibacterial action of lactoperoxidase. The nature of the bacterial inhibitor. **Biochemical Journal**, v. 117, n. 4, p. 779–790, 1970.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa da pecuária municipal**. 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab06.pdf> . Acesso em: 01 de julho de 2015.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMS). **Microrganismos de los alimentos**: técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia, 1984. P. 431.

KALMAR J., WOLDEGIORGIS K. L., BIRI B., ASHBY M. T. Mechanism of decomposition of the human defense factor hypothiocyanite near physiological pH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n.49, p. 19911–19921, 2011.

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

KHO, H. S.; KIM, Y. Y.; CHANG, J. Y.; KIM, M. J.; LEE, S. G. Candidacidal activities of the glucose oxidase-mediated lactoperoxidase system. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 684-688, 2012.

KIM, S. J.; SONG, B. K.; YOO, Y. J.; KIM, Y. H. Peroxidase inactivation by covalent modification with phenoxyl radical during phenol oxidation. **Journal Korean Soc. Appl. Biology Chemistry**, v. 57, p. 743-747, 2014.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P.K.; THAMPURAN, N. Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. **Food Cont**, v. 20, p. 376-380, 2009.

KUSSENDRAGER, K. D.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.**, v. 84, p. 518-525, 2000.

LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. **Clin Infect Dis.**, v. 48, n. 1, p. 93–100, 2009.

LINTON, R. H.; WEBSTER, J. B.; PIERSON, M. B.; BISHOP, J. R.; & HACKNEY, C. R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Scott A. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 284–287, 1992.

MAC DONALD, L. E.; BRETT, J.; KELTON, D. et al. A systematic review and meta-analysis of the effects of pasteurization on milk vitamins, and evidence for raw milk consumption and other health related outcomes. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 1814 e 1832, 2011.

MANKAI, M.; BOULARES, M.; BEN MOUSSA, O. et al. The effect of refrigerated storage of raw milk on the physicochemical and microbiological quality of Tunisian semihard Gouda-type cheese during ripening. **Int J Dairy Technol**, v. 65, p. 250-259, 2012.

MARCHAND, S.; DE BLOCK, J.; DE JONGHE, V. et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. **Compr Rev Food Sci F**, v. 11, p. 133-147, 2012.

MCPHEE, J.D.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic bacteria *Pseudomonas* spp. In: John, W.F. (Ed). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Second Edition. San Diego: Academic Press, p. 379–383, 2011.

MICKELSON, M. N. Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 2, p. 541–548, 1977.

MOYER, C.L.; MORITA, R.Y. Psychrophiles and psychrotrophs. In: Morita RY (ed.) **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 1-6, 2007.

NAERT, L.; VANDE VYVERE, B.; VERHOEVEN, G. et al. Assessing heterogeneity of the measured composition of mare's milk in Flanders. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 82, p. 23 e 30, 2013.

NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **Int J Dairy Technol**, v. 63, p. 41-46, 2010.

OLIVER, S. P.; JAYARO, B. M.; & ALMEIDA, R. A. Food-borne pathogens in milk and dairy farm environment: Food safety and public health implications. **Foodborne Pathogen and Disease**, v. 2, p.115, 2005.

OLIVEIRA, C. J. B.; HISRICH, E. R.; MOURA, J. F. P.; GIVISIEZ, P. E. N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small ruminant research**, n. 98, p. 64-69, 2011.

OLIVEIRA, Gislene B. de; FAVARIN, Luciana; LUCHESE, Rosa H.; MCINTOSH, Douglas. Bactérias psicrotóxicas no leite: Quanto sabemos realmente? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313-321, 2015.

O'MAHONY, M.; FANNING, S.; WHYTE, P. Chapter 6: the safety of raw liquid milk. In A. Y. Tamime (Ed.), **Milk processing and quality management**, p. 139 e 167, 2009.

ORAM, J. D.; REITER, B. The inhibition of streptococci by lactoperoxidase, thiocyanate and hydrogen peroxide. The effect of the inhibitory system on susceptible and resistant strains of group N streptococci. **Biochemical Journal**, v. 100, n. 2, p. 373–381, 1966.

PAIVA, C.A.V.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R. S. et al. Evolução anual da qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 64, n. 2, abr. 2012.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p. 88 e 113, 2007.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução nº 002 de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do 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, 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.

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

POTOCNIK, K.; GANTNER, V.; KUTEROVAC, K.; CIVIDINI, A. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. **Mljekarstvo**, v. 61, p. 107e113, 2011.

PRUITT, K. M.; TENOVUO, J. O. Eds. **The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance of Immunology Series**, New York: Marcel Dekker, 1985; 27p.

RAHIMI, E.; AMERI, M.; MOMTAZ, H. Prevalence and antimicrobial resistance of Listeria species isolated from milk and dairy products in Iran. **Food Control**, v. 21, p.1448–1452, 2010.

REITER, B. Protective proteins in milk-biological significance and exploitation, **IDF Bulletin**, London, GB, n.191, p.1-35, 1984.

_____.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **Journal of Food Protection**. Iowa: Des Moines, v. 47, p. 724-732, 1984.

_____. Protective proteins in milk-biological significance and exploitation, IDF London: Bulletin, GB, v. 191, p. 1-35, 1984.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, p. 77-95, 2012.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S. et al. Nutritional and sensory characteristics of minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **J. Dairy Sci**, v. 96, p. 7442–7453, 2013.

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., p.101-122, 1985.

THOMAS, E. L. **Products of lactoperoxidase-catalysed oxidation of thiocyanate and halides**. In: The lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance. New York: Marcel Dekker, p. 31-35, 1985.

UNIACKE-LOWE, T. Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. **PhD thesis**. Cork: University College Cork, 2011.

WOLF, S. M.; FERRARI, R. P.; TRAVERSA, S. et al. Determination of the carbohydrate composition and the disulfide bond linkages of bovine lactoperoxidase by mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 210 e 217, 2000.

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

ZAMOCKY, M.; JAKOPITSCH, C.; FURTMÜLLER, P. G. et al. The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 2, p. 589–605, 2008.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção da matéria-prima

O leite destinado ao estudo foi coletado de cabras da raça Saanen do setor de criação de caprinos do Departamento de Zootecnia, localizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A ordenha das cabras foi do tipo manual e foram conduzidas com práticas higiênicas, tais como: lavagem e secagem das tetas com papel descartável, pré-dipping, ordenha completa e por fim pós-dipping.

Foram realizadas doze coletas no período de abril a junho de 2015 e, em cada dia de coleta, eram formulados dois tratamentos, resultando em um total de oito tratamentos/semana em três repetições. As coletas foram feitas logo após a ordenha e o leite armazenado e transportado em recipientes de 20 L em temperatura ambiente (28-30 °C) para o Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco para as análises, pasteurização, processamento do queijo e armazenamento, respeitando o tempo máximo de trinta minutos entre o momento da ordenha até a pasteurização e/ou processamento, de acordo com o que preconiza a IN° 37/2000 (BRASIL, 2000).

5.2 Tratamentos

A formulação dos tratamentos foi feita a partir do leite de cabra cru aplicando duas variáveis: ativação do sistema LP (S e S_N), pasteurização (P e P_N) e uma variável ao queijo de coalho feito do leite de cabra: refrigeração (R e R_N) durante o armazenamento.

5.2.1 Ativação do sistema lactoperoxidase

O leite de cabra cru foi submetido à dois tratamentos, cada um contendo 10 litros:

- a) O leite com o SLP ativado (S), pela adição de 0,072 g de tiocianato de sódio e 0,272 g de percarbonato de sódio (fonte alternativa de peróxido de hidrogênio) para cada 10 litros de leite, ambos seguindo as concentrações estabelecidas pelo CAC (1991);
- b) E o leite de cabra com o SLP não ativado (S_N).

5.2.2 Tratamento térmico: pasteurização

As amostras que tiveram o SLP ativado ou não foram submetidos a duas novas variáveis:

a) pasteurização lenta (P) à temperatura de 62-65 °C durante 30 minutos do leite cru e submetidas a resfriamento imediato até a temperatura de 32 °C para continuação do processamento. A eficiência da pasteurização foi avaliada mediante análises da fosfatase alcalina e peroxidase, seguindo o método da AOAC (J. AOAC Int., 2000);

b) leite sem pasteurizar (P_N) que foi encaminhado diretamente para o processamento.

Foram feitas coletas de alíquotas de 300 mL do leite, em duplicata, que sofreu pasteurização, para análises microbiológicas.

5.2.3 Acondicionamento

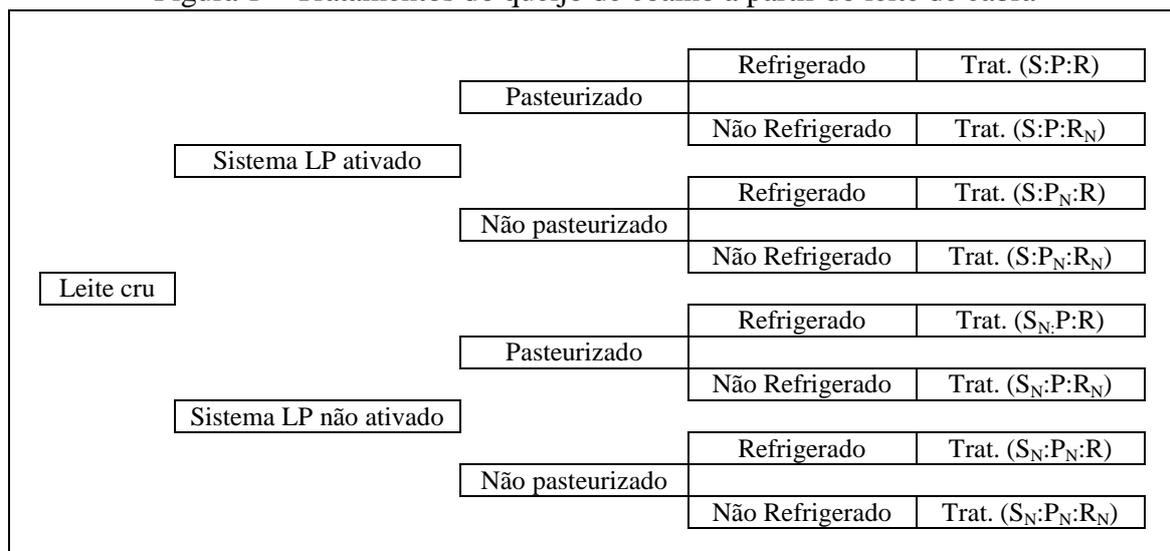
Após a fabricação do queijo de coalho de leite de cabra, foram submetidos a duas novas variáveis:

a) acondicionamento em temperatura de refrigeração (9-10 °C) (R);

b) acondicionamento em temperatura ambiente (28-30 °C) (R_N) durante todo o período de armazenamento.

A submissão do leite de cabra cru às duas variáveis: ativação do sistema LP (S e S_N), pasteurização (P e P_N) e a submissão do queijo de coalho feito com leite de cabra a refrigeração (R e R_N), resultaram na formulação de oito tratamentos distintos (Figura 1).

Figura 1 – Tratamentos do queijo de coalho a partir do leite de cabra

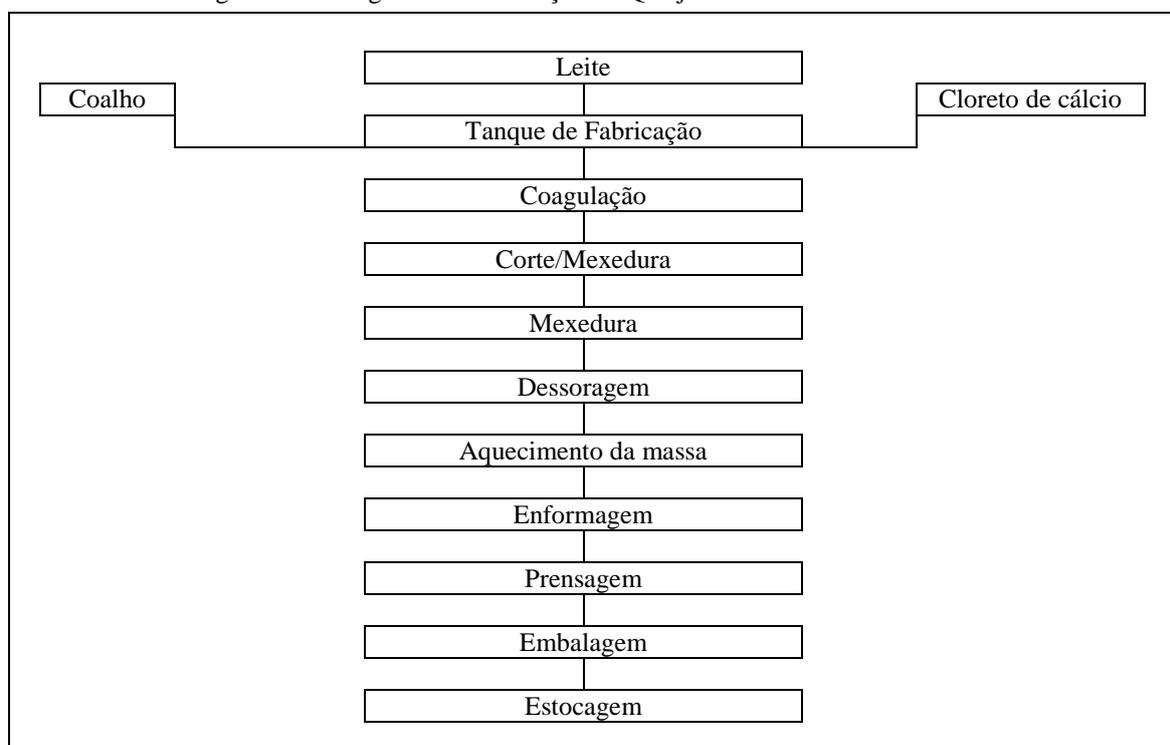


Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

5.3 Processamento do leite de cabra para fabricação do queijo de coalho

Todos os utensílios usados durante o processamento do Queijo de Coalho foram previamente higienizados com hipoclorito de sódio. A produção foi seguida conforme as recomendações da Instrução Normativa Nº 30/2001 (BRASIL, 2001) de acordo com o fluxograma da Figura 3.

Figura 2 - Fluxograma da fabricação do Queijo de Coalho de leite de cabra



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

O processamento do queijo de coalho iniciou-se com a etapa de coagulação, adicionando coalho líquido (3 mL de coalho industrial + 50 mL de água) e a solução de cloreto de cálcio (3 mL de cloreto de cálcio 40%) para cada 10 L de leite, permanecendo em repouso por, aproximadamente, 30 minutos. A coagulação foi verificada por meio do ponto de corte do coágulo. Realizou-se o corte da coalhada durante 10 minutos de forma lenta, utilizando uma lira artesanal de corte vertical e horizontal, formando cubos de, aproximadamente, 3 cm.

Em seguida, foi retirado 50% do soro produzido e a massa resultante foi submetida a aquecimento indireto e agitação moderada, de forma a elevar a temperatura 1 °C a cada 2 minutos até atingir 50 °C, formando grãos enxutos e praticamente sem liga. A massa foi colocada em formas retangulares com dessorador e prensador, devidamente higienizadas. O processo de prensagem ocorreu na prensa industrial, utilizando pesos de 10 kg, por período total de 2h, no qual, decorrido o tempo de 60 minutos, ocorria a viragem da massa. Em seguida, os queijos foram desenformados, fracionados e imediatamente identificados em embalagem de polietileno para acondicionamento.

5.4 Prazo de validade comercial

Durante o armazenamento, foram feitas análises microbiológicas de patógenos como: *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coag. positiva e bactérias mesófilas aeróbias, bactérias psicrótróficas para monitorar o crescimento microbiano e determinar o prazo de validade comercial nos tempos: 0 dia, 2 dias, 7 dias, 12 dias, 22 dias e 32 dias de armazenamento, ou até os parâmetros avaliados não atenderem à Instrução Normativa nº 30/2001 (BRASIL, 2001).

5.5 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas seguiram os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal que avalia a composição centesimal e a qualidade no leite de cabra cru e no queijo de coalho do leite de cabra nos períodos de armazenamento: 0 dia e no último dia do prazo de validade comercial.

5.5.1 pH

A aferição do pH foi realizada utilizando-se o pH-metro digital de bancada (*Tecnal*®), previamente calibrado em soluções tampão de pH 4 e 7, pela imersão do potenciômetro em 50 mL de leite ou 5g do queijo diluída em 50 mL de água destilada (BRASIL, 2006).

5.5.2 Acidez Dornic

A técnica consiste em neutralizar com solução Dornic (NaOH N/9) 10,0 mL da amostra tendo fenolftaleína 1% como indicador. Cada 0,1 mL de solução Dornic gasto na titulação correspondeu a 1° D (BRASIL, 2006).

5.5.3 Lipídios: método de Gerber

Para avaliar a gordura, foram adicionados 10 mL da solução de ácido sulfúrico 1M ao butirômetro, em seguida, acrescentou-se as amostras e 1 mL de álcool isoamílico. Depois de agitar para homogeneizar os líquidos, foi feita a centrifugação a 5 mil rpm durante 5 minutos (BRASIL, 2006).

5.5.4 Extrato seco total e Umidade

O extrato seco total (EST) foi obtido por meio do aquecimento de 5,0 g ou mL da amostra utilizando uma balança analítica com fonte de radiação acoplada à temperatura de 105 °C, até obter peso constante. O teor de umidade é dado pela diferença do peso final e o peso inicial (IAL, 2008).

5.5.5 Proteínas (nitrogênio total)

O conteúdo proteico (nitrogênio total) foi obtido pelo método de Kjeldahl, que consiste na digestão com ácido sulfúrico, aumentando a temperatura gradativamente até atingir 400 °C, com posterior destilação do ácido bórico e hidróxido de sódio a frio, titulação com ácido clorídrico e determinando, indiretamente, usando o fator de correção (F=6,38) (AOAC, 1995).

5.5.6 Glicídios redutores em lactose

Para determinação do teor de lactose no leite, foi empregado o método Lane-Eynon, como segue: 10 mL da amostra foram adicionados a 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL da solução de sulfato de zinco a 30%. Transcorrido o tempo necessário para retirada de possíveis interferentes, a amostra foi filtrada e o filtrado foi usado para titular a mistura constituída por 5 mL de solução Fehling A e 5 mL de solução de Fehling B, que se encontrará em ebulição (IAL, 2008).

5.5.7 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla, a partir da pesagem de 2,0 g da amostra em uma cápsula de porcelana, que foi colocada numa mufla pré-aquecida a 500 °C por, aproximadamente, 5 horas, até as cinzas ficarem brancas (AOAC, 1995).

5.5.8 Fosfatase Alcalina

Foi determinada a presença da fosfatase alcalina, por meio do uso do kit Fosfatase Alcalina Diasys®, que prescreve pipetar 1,0 mL do reativo e 0,1 mL do leite pasteurizado, deixando em repouso por 3 minutos à temperatura de 37°C, em que a fosfatase alcalina presente no leite cru ou mal pasteurizado, produzirá p-nitrofenol de cor amarelada (AOAC, 2000).

5.5.9 Lactoperoxidase

A presença da enzima lactoperoxidase no leite pasteurizado foi determinada transferindo 10 mL da amostra para um tubo de ensaio, aquecendo a 45 °C por 5 minutos em banho-maria à 60 °C para ativação da enzima, acrescentando, em seguida, 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% (v/v) e adicionando 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). A presença da enzima é percebida pelo desenvolvimento de um halo de coloração salmão (TRONCO, 2008).

5.6 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para avaliar a qualidade do leite de cabra cru, pasteurizado e do queijo de coalho de leite de cabra no tempo 0 dia e no decorrer dos dias, até o último dia do prazo de validade comercial de cada tratamento, atendendo os critérios de exigência da Instrução Normativa Nº 37/2000 (BRASIL, 2000) e da Instrução Normativa Nº 30/2001 (BRASIL, 2001).

5.6.1 Preparação das amostras

Foram pesadas $25 \pm 0,2$ g de cada amostra e transferidas assepticamente para frascos contendo 225 mL de água peptonada estéril (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição, foram feitas as diluições seriadas até 10^{-7} com o mesmo diluente (BRASIL, 2003).

5.6.2 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

Foram inoculadas alíquotas de 1,0 mL das diluições em placas de Petri estéreis, e vertidos aproximadamente 20,0 mL de meio de cultura Plate Count Agar (PCA). Após a solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 35 °C por 48 horas em estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro – UFC/mL (BRASIL, 2003).

5.6.3 Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias psicrotróficas

Foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL das diluições em placas de Petri estéreis contendo, aproximadamente, 20,0 mL de meio de cultura Plate Count Agar (PCA) solidificado. Então, o inóculo foi homogeneizado na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalski estéril e, as placas de Petri, foram incubadas a 9 °C por 11 dias em estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro – UFC/mL (BRASIL, 2003).

5.6.4 Enumeração de Coliformes

Foi utilizado o método de tubos múltiplos (NMP), por meio do teste presuntivo utilizando caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com o tubo de Duhran invertido, incubados a 35 °C por 24-48 h. A partir dos tubos com leitura positiva (turvação e formação de gás), foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo Lactose Bile Verde Brilhante 2% (VB) a 35 °C por 24-48 h e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) a 45,5 °C por 24 h. O resultado foi expresso em valores de Número Mais Provável (NMP/g) (BRASIL, 2003).

5.6.5 Presença/Ausência de *Salmonella* spp.

Foram homogeneizados $25,00 \pm 1,25$ g da amostra em água peptonada tamponada e incubados a 37 ± 1 °C/18h para pré-enriquecimento, em seguida, inoculado 10mL no caldo Selenito-Cistina e 0,1mL no caldo Rappaport-Vassiliadis e, depois, incubados a 37 °C/24h para enriquecimento seletivo. A partir destes, serão semeadas nos meios seletivos: Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Rambach (RAM) e incubados a 37 °C por 24h. As colônias suspeitas foram submetidas às provas bioquímicas Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Ágar lisina-ferro (LIA), caldo ureia e incubadas a 37 °C por 24 h (BRASIL, 2003).

5.6.6 Presença/Ausência de *Listeria monocytogenes*

Foram homogeneizados $25,00 \pm 1,25$ g da amostra em caldo UVM adicionado de ácido nalidíxico e acriflavina, incubados a 30 ± 1 °C/24h para o primeiro pré-enriquecimento. Em seguida, inoculado 0,1mL da cultura no caldo Fraser e incubados a 30 °C/24-48h para enriquecimento seletivo. A partir destes, serão semeadas nos meios seletivos: Ágar Oxford (AO) e Ágar ATN e incubados a 30 °C por 24h. As colônias suspeitas foram submetidas às provas bioquímicas catalase, prova de motilidade, redução do nitrato e provas dos reagentes VM-VP, e α -hemólise (BRASIL, 2003).

5.6.7 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Foram inoculadas alíquotas de 0,1mL das diluições em placas de Petri estéreis contendo, aproximadamente, 20,0mL de meio de cultura Ágar Baird-Párker (BHI) solidificado, adicionado de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. Então, o inóculo

foi homogeneizado na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalski estéril e as placas de Petri foram incubadas a 36 °C por 30-48 horas em estufa bacteriológica. As colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro) e atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo) foram contadas e coletadas entre 3 e 4, para serem submetidas a teste da catalase e coagulase. As colônias positivas no teste da catalase e coagulase foram expressas em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro – UFC/mL (BRASIL, 2003).

5.7 Análises estatísticas

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

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

Onde:

μ é a média;

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

P_j é o efeito da j-ésima Pasteurização (j = pasteurizado ou não pasteurizado);

R_k é o efeito da k-ésima Refrigeração (k = refrigerado ou não refrigerado);

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

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

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

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

ε_{ijk} é o erro aleatório.

Os dados foram analisados pela ANOVA utilizando o teste de DUNCAN para comparação entre as médias ($p < 0,05$).

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

Para normalizar a distribuição, os resultados da contagem microbiológica do leite e do queijo foram expressos em logaritmo na base 10 (Log_{10} UFC/mL ou g).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Qualidade físico-química e microbiológica da matéria prima

Destacando a importância da qualidade inicial do leite cru na produção do queijo de coalho de leite de cabra, são apresentados na Tabela 3 as composições físico-químicas.

Tabela 3 – Composição físico-química do leite de cabra cru usado como matéria prima.

Leite cru usado na formulação dos tratamentos	pH	Acidez (°Dornic)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos totais (%)	Sólidos não gordurosos (%)	Cinzas (%)
Trat.-S:P:R	6,70	17	3,32	3,82	4,53	12,67	9,35	0,82
Trat.(S _N :P:R)	6,68	18	3,35	3,78	4,50	12,63	9,28	0,81
Trat.(S:P _N :R)	6,62	18	3,28	3,85	4,61	12,45	9,17	0,84
Trat.(S _N :P _N :R)	6,65	17	3,25	3,89	4,63	12,28	9,03	0,83
Trat.(S:P:R _N)	6,69	18	3,34	3,87	4,52	12,45	9,11	0,83
Trat.(S _N :P:R _N)	6,71	17	3,36	3,82	4,48	12,58	9,22	0,81
Trat.(S:P _N :R _N)	6,72	17	3,35	3,76	4,47	12,65	9,30	0,82
Trat.(S _N :P _N :R _N)	6,73	18	3,31	3,72	4,49	12,70	9,39	0,80

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a-b} valores com as mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

Observa-se que todos os resultados da análise físico-química do leite de cabra cru (Tabela 3), apresentaram valores dentro da normalidade comparados com os padrões de qualidade estabelecidos pela IN N° 37/2000.

A comparação realizada pela ANOVA, no leite utilizado como matéria prima para formulação dos diferentes tratamentos, mostrou que não houve diferença significativa na qualidade físico-química ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Os valores de pH encontram-se dentro do intervalo de 6,6 – 6,8 considerado valores normais para o leite (DUTRA et al., 2014), apesar do pH não ser um parâmetro da legislação é um importante indicativo do crescimento microbiano. A acidez apresentou valores semelhantes aos reportados por Dutra et al., (2014) e Almeida et al., (2013), que ao

analisarem leite de cabra encontraram valores entre 17 e 18° Dornic e 13 e 19° Dornic, respectivamente. Valores de acidez elevados são provocados por microrganismos, em especial, as bactérias lácticas e do grupo dos coliformes que degradam a lactose produzindo ácidos e gases, que comprometem a estabilidade térmica da caseína, comprometendo a qualidade do leite pasteurizado e dos produtos lácteos (NAERT et al., 2013).

Os valores de gordura, proteína e lactose, respectivamente, estão em concordância com o intervalo de 3,25 – 4,38%, média de 2,7 – 5,3% e 4,1 – 4,6%, relatados em outros estudos (NAERT et al., 2013; CLAEYS et al., 2014 e Dutra et al., 2014).

São apresentadas na Tabela 4 as contagens microbiológicas do leite de cabra cru utilizada na formulação dos tratamentos.

Tabela 4 – Contagem microbiológica do leite de cabra cru usado como matéria prima.

Leite cru usado na formulação dos tratamentos	(Ausência em 25g)		(Log ₁₀ UFC/mL)			
	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Coliforme s a 35°C	<i>Staphylococcus</i> <i>coag. pos.</i>	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrotróficas
Trat.(S:P:R)	ausência	ausência	2,70 ^a	2,42 ^a	4,36 ^{ab}	4,16 ^a
Trat.(S _N :P:R)	ausência	ausência	2,69 ^a	2,37 ^a	4,33 ^b	4,12 ^a
Trat.(S:P _N :R)	ausência	ausência	2,70 ^a	2,38 ^a	4,38 ^a	4,17 ^a
Trat.(S _N :P _N :R)	ausência	ausência	2,68 ^a	2,37 ^a	4,35 ^{ab}	4,14 ^a
Trat.(S:P:R _N)	ausência	ausência	2,58 ^a	2,44 ^a	4,35 ^{ab}	4,17 ^a
Trat.(S _N :P:R _N)	ausência	ausência	2,59 ^a	2,42 ^a	4,36 ^{ab}	4,15 ^a
Trat.(S:P _N :R _N)	ausência	ausência	2,71 ^a	2,45 ^a	4,37 ^{ab}	4,17 ^a
Trat.(S _N :P _N :R _N)	ausência	ausência	2,70 ^a	2,41 ^a	4,35 ^{ab}	4,17 ^a

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a-b} valores com letras iguais na vertical não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

Observa-se que todos os parâmetros microbiológicos analisados (Tabela 4) apresentaram resultados abaixo dos valores limites estabelecidos pela IN N° 37/2000, e como esperado, ausência de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* em todas as amostras coletadas.

A comparação feita pela ANOVA, no leite de cabra cru utilizado como matéria prima para formulação dos diferentes tratamentos, mostrou que não houve diferença significativa na qualidade microbiológica ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Os resultados obtidos para bactérias mesófilas aeróbias e coliformes totais foram inferiores ao reportado por Oliveira et al., (2011), que analisando leite de cabra cru na região do Cariri, constatou que 62,5% das amostras apresentavam contagem superior a 5,70 Log₁₀ UFC/mL e 7,30 Log₁₀ UFC/mL, consecutivamente; ao valor 5,60 Log₁₀ UFC/mL encontrado por Fonseca et al., (2013) e ao valor máximo de 6,15 Log₁₀ UFC/mL para coliformes encontrado por Gottardi et al., (2008) no leite de cabra cru na região sul do Brasil.

Os resultados obtidos são semelhantes aos reportados por Yamazi et al., (2013), ao analisar leite de cabra cru no estado de Minas Gerais, percebeu que 83% das amostras apresentavam contagens inferiores ao limite máximo permitido pela IN N° 37/2000, com contagens médias de 5,0 Log₁₀ UFC/mL para bactérias mesófilas aeróbias, 3,0 Log₁₀ UFC/mL para coliformes totais e 4,1 Log₁₀ UFC/mL para bactérias psicrotróficas. Munganata et al., (2011) e Megersa et al., (2010) ressaltam que altas contagens para estes grupos de microrganismos influem no rendimento industrial e no valor nutritivo dos produtos lácteos, sobretudo em queijos.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrada no leite de cabra cru foi inferior à média de 6,30 Log₁₀ UFC/mL reportado por Oliveira et al., (2011) e 4,5 Log₁₀ UFC/mL reportado por Almeida et al., (2013). Embora apenas contagens elevadas de *S. aureus* (5,0 Log₁₀ UFC/mL) sejam consideradas como risco da presença de enterotoxina nos alimentos, os *Staphylococcus* coagulase negativa também tem sido apontados como potencialmente enterotoxigênicos, podendo comprometer segurança dos alimentos (GOTTARDI et al., 2008).

Destaca-se que a qualidade microbiológica do leite cru é um dos fatores mais importantes para manter as características químicas e sensoriais de produtos lácteos, uma vez que, altas contagens microbiológicas iniciais estão fortemente correlacionadas com a

deterioração dos produtos e por consequente o comprometimento do prazo de validade (SAMARZIJA et al., 2012).

6.2 Análises microbiológicas do leite pasteurizado

São apresentados na Tabela 5 as contagens microbiológica do leite de cabra submetido pasteurização, usados como matéria prima para produção dos queijos referentes aos tratamentos: (S:P:R), (S_N:P:R), (S:P:R_N) e (S_N:P:R_N).

Tabela 5 – Contagem microbiológica do leite de cabra pasteurizado usado como matéria prima na formulação dos tratamentos (S:P:R), (S_N:P:R), (S:P:R_N) e (S_N:P:R_N).

Leite pasteurizado usado na formulação dos tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrotróficas
Trat.(S:P:R)	0,51 ^a	0,86 ^a	2,08 ^a	1,96 ^a
Trat.(S _N :P:R)	1,65 ^b	1,41 ^b	2,52 ^b	2,33 ^b
Trat.(S:P:R _N)	0,50 ^a	1,00 ^a	1,96 ^c	1,87 ^a
Trat.(S _N :P:R _N)	1,64 ^b	1,45 ^b	2,62 ^d	2,27 ^b

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c,d} médias com letras iguais na vertical não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

Essa comparação foi feita com o objetivo de avaliar a qualidade inicial da matéria prima (leite de cabra pasteurizado) utilizado na formulação dos queijos: (S:P:R), (S_N:P:R), (S:P:R_N) e (S_N:P:R_N); e o efeito causado pela pasteurização na carga microbiana presente no leite cru ativado e não ativado.

Foi observada uma redução de 79% na população microbiana de coliformes a 35°C; de 35% para *Staphylococcus* coagulase positiva.; de 21% para bactérias mesófilas Aeróbias e de 17% para bactérias psicrotróficas, nas médias das contagens dos tratamentos pasteurizados e ativados (S:P:R e S:P:R_N) em comparação com as médias dos tratamentos onde o SLP não foi ativado (S_N:P:R e S_N:P:R_N). A melhoria na qualidade microbiológica

do leite que foi ativado o SLP antes da pasteurização é explicada por Sarkar e Misra (1994) pela redução da resistência ao calor por alguns microrganismos.

A Tabela 6 mostra a interação entre o efeito das variáveis: ativação do SLP (S) e pasteurização (P) nesses tratamentos e os tratamentos que não sofreram o processo de pasteurização.

Tabela 6 – Interação entre as variáveis: ativação do SLP (S) e pasteurização (P) no leite de cabra pasteurizado usado como matéria prima na formulação dos tratamentos (S:P:R), (S_N:P:R), (S:P:R_N) e (S_N:P:R_N).

Fonte de variação	p			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrótroficas
SLP ativado (S)	0,000000 ^a	0,000006 ^a	0,000000 ^a	0,007438 ^a
Pasteurização (P)	0,000000 ^b	0,000000 ^b	0,000000 ^b	0,000000 ^b
S*P	0,000000 ^c	0,000002 ^c	0,000000 ^c	0,004166 ^c

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c}. valores com letras iguais na vertical não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

As fontes de variação SLP e pasteurização exerceram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre os coliformes a 35°C, *staphylococcus* coag. pos., bactérias mesófilas aeróbias e as bactérias psicrótroficas. O efeito decorrente da ativação do SLP confirma a ação antimicrobiana observada por Medina, (2014), Aprodu et al., (2014) e Atasever et al., (2013) atribuída à oxidação do grupo sulfidrilo (-SH) de várias enzimas e de outras proteínas microbianas pelo íon hipotiocianato (OSCN⁻) principal produto da ativação do SLP.

O efeito da pasteurização já era esperado, pois é um método tradicionalmente aplicado no leite, onde o efeito do calor proporciona uma redução acima de 98% da carga microbiana (MATA et al., 2010).

Houve interação significativa ($p < 0,05$) das variáveis SLP x pasteurização sobre e *staphylococcus* coag. pos., bactérias mesófilas aeróbias e as bactérias psicotróficas. O efeito dessa interação corrobora com a provável redução da resistência de alguns microrganismos ao calor, provocada pela ativação do SLP apontado por Sarkar e Misra (1994). Esse fato destaca a importância da associação dos métodos de conservação tradicionais com a ativação do SLP na manutenção e melhoria da qualidade leite de cabra.

6.3 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: início do armazenamento

São apresentados no Tabela 7 a composição físico-química e na Tabela 8 as contagens microbiológica do Queijo Coalho de leite de cabra referentes aos oito tratamentos distintos, logo após a fabricação, representando o tempo 0 de armazenamento.

Tabela 7 – Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no início de armazenamento.

Tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicotróficas
Trat.(S:P:R)	0,47 ^e	1,30 ^c	2,22 ^d	1,97 ^e
Trat.(S _N :P:R)	2,06 ^d	1,83 ^b	2,94 ^c	2,76 ^d
Trat.(S:P _N :R)	2,47 ^b	2,49 ^a	4,43 ^{ab}	4,23 ^{ab}
Trat.(S _N :P _N :R)	2,70 ^a	2,57 ^a	4,61 ^a	4,43 ^a
Trat.(S:P:R _N)	0,49 ^e	1,38 ^c	2,11 ^d	1,95 ^e
Trat.(S _N :P:R _N)	2,10 ^c	1,90 ^b	2,98 ^c	2,26 ^{de}
Trat.(S:P _N :R _N)	2,49 ^b	2,55 ^a	4,21 ^b	3,79 ^c
Trat.(S _N :P _N :R _N)	2,74 ^a	2,55 ^a	4,40 ^{ab}	4,01 ^{bc}

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c,d,e} médias com letras iguais na vertical não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Duncan.

Ao analisar a Tabela 7 é possível perceber que a variável Refrigeração (R e R_N) não tem efeito em nenhum dos resultados, pois o acondicionamento à temperatura de refrigeração ou ambiente será iniciada a partir deste tempo 0.

Com relação à variável ativação do SLP (S e S_N) nos tratamentos pasteurizados (P), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos para todos os microrganismos, havendo redução ou manutenção da população microbiana durante o processamento do Queijo de Coalho, condizendo com a função bactericida ou bacteriostática apresentada pelo SLP relatada por Hawkins, (2009), corroborando com a afirmação de Kho et al. (2012) e Aprodu et al., (2014) que a pasteurização a 65°C não afeta a LP.

Foi observado que à variável ativação do SLP (S e S_N) nos tratamentos não pasteurizados: Trat.(S:P_N:R); Trat.(S_N:P_N:R) e Trat.(S:P_N:R_N); Trat.(S_N:P_N:R_N), exerceu menor influência, devido a ausência da pasteurização a taxa da população de microrganismos se manteve alta, o que minimizou o efeito da ativação do SLP na qualidade desses tratamentos.

É observado na tabela 7 que o queijo de coalho apresentou composição centesimal dentro dos parâmetros exigidos pela Portaria nº 146/96 e apresenta valores semelhantes aos reportados por Queiroga et al., (2013), que encontraram os valores de 23,72 % para proteínas, 24,07% para gordura, 1,57% para sais.

6.4 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 2 dias

São apresentados na Tabela 8 as contagens microbiológica do queijo coalho de leite de cabra referentes aos 8 tratamentos distintos, após 2 dias de armazenamento.

Tabela 8 – Contagem microbiológica do Queijo de Coalho de leite de cabra no tempo 2 dias.

Tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicotróficas
Trat.(S:P:R)	0	1,43 ^f	2,51 ^d	2,32 ^e
Trat.(S _N :P:R)	2,14 ^b	2,04 ^e	3,51 ^c	3,52 ^d
Trat.(S:P _N :R)	1,65 ^c	2,55 ^d	4,46 ^b	4,26 ^c
Trat.(S _N :P _N :R)	3,03 ^a	2,61 ^c	4,74 ^b	4,53 ^c
Trat.(S:P:R _N)	0	2,98 ^b	5,08 ^b	4,70 ^b
Trat.(S _N :P:R _N)*	-	-	-	-
Trat.(S:P _N :R _N)*	-	-	-	-
Trat.(S _N :P _N :R _N)*	-	-	-	-

*: Trat. que atingiram o limite máximo de 3,00 Log₁₀ UFC/mL para *Staphylococcus* coag. pos. (Portaria nº 146/96).

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c,d,e} médias com as mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

Foi observado que a ativação do SLP (S e S_N) não exerceu influência nos tratamentos Trat.(S:P_N:R_N) e Trat.(S_N:P_N:R_N), que atingiram o limite máximo permitido pela legislação, apresentando prazo de validade menor que 2 dias de armazenamento. Esta observação está de acordo com o descrito por Furtmuller et al., (2002) que ressaltam que o excessivo crescimento de microrganismos pode inativar a LP.

A ativação do SLP exerceu efeito significativo (p < 0,05), sobre todos os microrganismos pesquisados. A inibição total dos coliformes a 35°C observada ocorreu devido a fatores distintos: no Trat.(S:P:R) é observado uma diminuição continua desde o momento da pasteurização (Tabela 1) até o segundo dia de armazenamento, devido ao efeito da ativação do SLP; no Trat.(S:P:R_N) até o 0 dia de armazenamento a ativação do SLP é o único efeito inibitório sobre o microrganismo, entretanto, entre os dias 0 e 2 do

armazenamento, sofreu o efeito do SLP, como também o efeito da acidez produzida pelo crescimento de outras bactérias; situação diferente acontece com o Trat.(S_N:P:R), que apresentou crescimento na população de coliformes.

6.5 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 7 dias

São apresentados na Tabela 9 as contagens microbiológica do queijo coalho de leite de cabra referentes aos 5 tratamentos distintos, armazenado por 7 dias.

Tabela 9 – Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no tempo 7 dias

Tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrotróficas
Trat.(S:P:R)	0	1,64 ^c	3,36 ^d	3,17 ^c
Trat.(S _N :P:R)	2,63 ^a	2,67 ^b	4,08 ^c	3,89 ^b
Trat.(S:P _N :R)	0	2,69 ^b	4,56 ^b	4,36 ^a
Trat.(S _N :P _N :R)	1,82 ^b	2,87 ^a	4,99 ^a	4,46 ^a
Trat.(S:P:R _N) *	-	-	-	-
Fonte de variação	p			
SLP ativado (S)	0,135658	0,265362	0,325966	0,542365
Pasteurização (P)	0,235826	0,452368	0,485213	0,365982
Refrigeração (R)	0,000325*	0,000225*	0,000013*	0,004158*
S*P	0,396921	0,484624	0,452368	0,469852
P*R	0,382584	0,365985	0,398952	0,482656
S*R	0,000287*	0,000136*	0,000195*	0,000998*

*: Trat. que atingiram o limite máximo de 3,00 Log₁₀ UFC/mL para *Staphylococcus* coag. pos. (Portaria nº 146/96).

^{a,b,c,d} médias com as mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença significativa (P>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

* valores apresentam diferença significativa (p>0,05) de acordo com o teste de Duncan

O SLP (S) e a pasteurização (P) não exerceram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre os microrganismos pesquisados. Esse resultado está de acordo com o reportado por Ponce, (2005), e Aprodu et al. (2014) que ressaltam a eficiência da ativação do SLP até 72 horas após a ativação e a melhora na qualidade dos derivados lácteos.

É possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem das colônias entre os tratamentos da variável SLP (S e S_N) para todos os microrganismos exceto para as bactérias psicrotróficas nos tratamentos onde não foi aplicada a pasteurização.

Foi observado que a partir deste tempo de armazenamento a interação da fonte de variação SLP (S) e Pasteurização (P) não foram significativas ($p < 0,05$).

6.6 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 12 dias

São apresentados na Tabela 10 as contagens microbiológica do queijo coalho de leite de cabra referentes aos 4 tratamentos distintos, armazenado durante 12 dias.

Tabela 10 – Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra no tempo 12 dias.

Tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrotróficas
Trat.(S:P:R)	0	1,85 ^d	3,76 ^d	3,56 ^d
Trat.(S_N :P:R)	0	2,73 ^c	4,37 ^c	3,21 ^c
Trat.(S:P _N :R)	0	2,77 ^b	4,86 ^b	4,65 ^b
Trat.(S_N :P _N :R)	0	2,96 ^a	5,68 ^a	5,49 ^a

S, S_N : sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c,d} médias com as mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Duncan.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem das colônias entre os tratamentos da variável SLP (S e S_N) para todos os microrganismos pesquisados. Os tratamentos onde o SLP não foi ativado (S_N), passaram a apresentar contagem nula para

coliformes a 35°C, fato que pode ser atribuído ao efeito da acidez produzida por outras bactérias deteriorantes presentes em alto número no queijo de coalho que inibem as bactérias do grupo dos coliformes que são sensíveis à concentração de ácidos (MCPHEE & GRIFFITHS, 2011).

6.7 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 22 dias

São apresentados na Tabela 11 as contagens microbiológica do queijo coalho de leite de cabra referentes aos 4 tratamentos distintos, após o armazenamento de 22 dias.

Tabela 11 – Contagem microbiológica do queijo de coalho de leite de cabra armazenado durante 22 dias

Tratamentos	(Log ₁₀ UFC/mL)			
	Coliformes a 35°C	<i>Staphylococcus</i> coag. pos.	Bactérias Mesófilas aeróbias	Bactérias Psicrotróficas
Trat.(S:P:R)	0	2,59 ^b	4,93 ^b	4,73 ^b
Trat.(S _N :P:R) *	0	3,01 ^a	5,66 ^a	5,48 ^a
Trat.(S:P _N :R) *	-	-	-	-
Trat.(S _N :P _N :R) *	-	-	-	-

*: Trat. que atingiram o limite máximo de 3,00 Log₁₀ UFC/mL para *Staphylococcus* coag. pos. (Portaria nº 146/96).

S, S_N: sistema ativado e não ativado; P e P_N: pasteurizado e não pasteurizado; R e R_N: refrigerado e não refrigerado.

^{a,b,c,d} médias com as mesmas letras na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05) de acordo com o teste de Duncan.

É observado na Tabela 12 que os tratamentos Trat.(S:P_N:R) e Trat.(S_N:P_N:R) apresentaram contagens que atingiram o limite máximo permitido pela legislação, apresentando prazo de validade menor que 22 dias de armazenamento. O tratamento Trat.(S_N:P:R) apresenta no tempo de armazenagem 22 dias contagem acima do limite máximo 3,00 Log₁₀ UFC/mL para *Staphylococcus* coag. pos. A contagem de bactérias mesófilos aeróbios e psicrotróficas do Trat.(S_N:P:R) são inferiores ao valores 6,45 e 5,88

Log10 UFC/mL relatadas por Queiroga et al., (2013) para estes microrganismos, respectivamente.

6.8 Qualidade do queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento: 31 dias

A Tabela 12 mostra a comparação feita entre os dois tratamentos que apresentaram maior prazo de validade comercial.

Tabela 12 – Comparação de médias entre os tratamentos S;P;R e S_N;P;R durante o acondicionamento.

Dia	S;P;R				S _N ;P;R			
	Mesófilos	Psicotrofícos	Stafylococos	Coliformes	Mesófilos	Psicotrofícos	Stafylococos	Coliformes
0	2,22fB	1,97fB	1,30fB	0,47B	2,49eA	2,76eA	1,83eA	2,06cA
2	2,51eB	2,32eB	1,43eB	0	2,71dA	3,58dA	2,04dA	2,14b
7	3,36dB	3,17dB	1,64dB	0	4,08cA	3,89cA	2,67cA	2,63a
12	3,56cB	3,76cB	1,85cB	0	4,21bA	4,37bA	2,73bA	0
22	4,93bB	4,73bB	2,59bB	0	5,66aA	5,48aA	2,98aA	0
31	5,70a	5,50a	2,97a	0	Incontável	Incontável	Incontável	0

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na vertical não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na horizontal para o mesmo microrganismo não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste “t” de student.

Observa-se diferença significativa ($p < 0,05$) para cada tratamento com o decorrer dos dias de armazenamento, em todos os dias de análise e para todos os microrganismos, com exceção dos coliformes a 35°C a partir do 2º dia para o Trat.(S;P;R) e a partir do 12º dia pro Trat.(S_N;P;R).

A destruição total dos coliformes observada ocorreu devido a fatores distintos: no Trat.(S:P;R) na exposição de dados anteriormente foi observada, uma diminuição contínua deste microrganismo desde o momento da pasteurização até o segundo dia de

armazenamento, essa redução contínua é atribuída o efeito da ativação do SLP; em contraponto, no Trat.(S_N:P:R) a letalidade observada pode ser devido a acidez produzida por outras bactérias presentes em alto número, pois a única variável que teria possibilidade de causar um efeito letal seria a pasteurização feita previamente à fabricação do queijo, fato que não foi percebido logo após a pasteurização.

O queijo coalho de leite de cabra referente ao tratamento S:P:R apresentou prazo de validade comercial de 31 dias, enquanto que o tratamento S_N:P:R 22 dias, demonstrando que a ativação do SLP é importante para a qualidade do queijo de coalho e aumento do seu prazo de validade. O valor de 31 dias também foi superior ao encontrado por Queiroga et., (2013), que apresentou valores de 28 dias para o queijo coalho de leite cabra sem ativação do SLP.

Entre os tratamentos, pode-se observar diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos, para cada microrganismo e em cada tempo de armazenamento.

A composição centesimal (Tabela 14) referente a todos os tratamentos estudados mostra que houve uma redução significativa ($p > 0,05$) no valor da umidade e da lactose durante o armazenamento do queijo de coalho e redução não significativa ($P < 0,05$) no valor dos outros nutrientes, esse valor corrobora os valores encontrados por Queiroga et., (2013) ao analisar queijo de coalho de leite de cabra durante o armazenamento. Durante o armazenamento acontece um elevado consumo da lactose, usada pelos microrganismos fermentadores da lactose como substrato do metabolismo e ocorre perda de água devido à diferença de umidade do alimento para o ambiente, assim como por desprendimento após o início da degradação das estruturas causadas pelas bactérias.

Tabela 14 – Composição físico-química do queijo do coalho de leite de cabra.

Tratamentos	Dia (inicial / último)	pH	Acidez (°Dornic)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos totais (%)	SNG (%)	Cinzas(%)
Trat.(S:P:R)	0° dia	6,70	20	24,20	25,30	6,50	47,50	23,00	1,78
	31° dia	6,45	27	20,50	24,20	4,15	47,85	27,35	1,81
Trat.(S _N :P:R)	0° dia	6,68	20	23,80	24,90	6,10	47,10	23,40	1,68
	22° dia	6,30	27	21,00	23,90	4,00	47,90	26,90	1,81
Trat.(S:P _N :R)	0° dia	6,62	21	24,60	25,90	6,10	47,60	23,30	1,68
	17° dia	6,35	27	20,70	24,600	3,90	47,80	27,10	1,81
Trat.(S _N :P _N :R)	0° dia	6,65	20	24,80	25,70	6,20	47,70	22,70	1,45
	12° dia	6,25	27	20,10	24,60	4,30	47,95	27,85	1,81
Trat.(S:P:R _N)	0° dia	6,69	20	23,90	25,10	6,60	46,40	22,80	1,60
	2 ° dia	6,20	27	21,30	23,80	4,40	47,80	26,50	1,81
Trat.(S _N :P:R _N)	0° dia	6,71	20	24,40	24,60	6,20	47,10	22,50	1,50
	1 ° dia	6,20	27	21,70	23,90	4,15	47,65	25,95	1,81
Trat.(S:P _N :R _N)	0° dia	6,72	20	24,30	25,80	6,10	46,20	21,8	1,65
	1 ° dia	6,25	27	20,90	23,50	4,45	46,60	25,70	1,81
Trat.(S _N :P _N :R _N)	0 ° dia	6,73	20	24,20	24,30	6,70	46,70	22,50	1,80
	1 ° dia	6,25	27	20,80	23,90	4,80	46,65	26,10	1,81

7 CONCLUSÃO

A ativação do SLP no leite de cabra é responsável por apresentar efeito bacteriostático ou bactericida sobre a carga microbiana de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 35°C, bactérias mesófilas aeróbias e bactérias psicrotróficas.

A ativação do SLP no leite de cabra aliado à pasteurização e refrigeração durante o armazenamento garantiu um produto com estabilidade microbiológica diferenciada e com maior prazo de validade comercial comparado ao uso do leite com SLP não ativado. O uso de alternativas de conservação, como a ativação do SLP aliado a pasteurização, promove a obtenção de uma matéria prima de alta qualidade para produção dos derivados lácteos, em específico, o queijo coalho de leite de cabra.

A ativação do SLP como forma de manter a qualidade no leite de cabra usado para produção de queijo coalho não substitui o emprego da refrigeração durante o armazenamento. Entretanto, é uma importante medida paliativa para garantir a qualidade da matéria prima em situações onde o transporte refrigerado do leite de cabra não é possível.

8 REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, M. K.; PAL, U. K., 1996. Quality and shelf-life of goat milk Paneer in refrigerated storage. **Small Rum. Res.** 20, p. 75–81, 1996.

ALMEIDA, J. F.; AQUINO, M. H. C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M. L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo,; n. 80, p. 13-18, 2013.

APRODU, L.; STANCIUC, N.; DUMITRASCU, L.; RAPEANU, G.; STANCIU, S. Investigations towards understanding the thermal desnaturation of lactoperoxidase. **Internetwork Dairy Journal**, n. 38 p. 47-54, 2014.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, n. 31 p. 251 e 262, 2013.

Dutra C. M. C., Svierk B., Ribeiro M. E. da R., Pinto A. T., Zanela M. B., Schmidt V. Food Safety / Scientific Article. Effects of cold storage on the quality parameters of goat milk. São Paulo: **Arq. Inst. Biol.** n. 81 p. 36-42, 2014.

FONSECA, C. R.; BORDIN, K.; FERNANDES, A. M.; RODRIGUES, C.; CORASSIN, C. H.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Storage of refrigerated raw goat milk affecting the quality of whole milk poder. **J. Dairy Sci**, n. 96 p.4716–4724, 2013.

Furtmuller; P. G. Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. **Biochemistry**. n. 41 p. 11895-11900, 2002.

HAWKINS, C. L. The role of hypothiocyanous acid (HOSCN) in biological systems HOSCN in biological systems. **Free Radical Research**, n. 43(12), p. 1147–1158, 2009.

KHO, H. S.; KIM, Y. Y.; CHANG, J. Y.; KIM, M. J.; LEE, S. G. Candidacidal activities of the glucose oxidase-mediated lactoperoxidase system. **Archives of Oral Biology**. n. 57 p. 684-688, 2012.

- MEGERSA, B.; TADESSE, C.; ABUNNA, F. Occurrence of mastitis and associated risk factors in lactating goats under pastoral management in Borana, Southern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, n. 42 p. 1249- 1255, 2010.
- MUNGATANA, N. K.; NGURE, R. M.; SHITANDI, A., ONYIEGO, B., MUTUMA, M. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**. n. 64 p. 360-364, 2011.
- NAERT, L.; VANDE, V. B.; VERHOEVEN, G.; DUCHATEAU, L.; De SMET, S.; COOPMAN, F. Assessing heterogeneity of the measured composition of mare's milk in Flanders. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. n. 82 p. 23-30, 2013.
- OLIVEIRA, C. J. B.; HISRICH, E. R.; MOURA, J. F. P.; GIVISIEZ, P. E. N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**. n. 98 p. 64-69, 2011.
- QUEIROGA, R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**. n. 50 p. 538 e 544, 2013.
- SARMAR, S; MISRA, A. K. Utilization of milk preserved by LP system for manufacture of cultured milk products. *Indian Dairyman*, New Delhi, In, 1992; 44: 536-540.
- SAMARŽIJA, D.; Š. ZAMBERLIN, and T. POGACIC. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*. N. 62 p. 77–95, 2012.
- SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends Food Sci. Technol**. N. 8 p. 35–41, 1997.
- YAMAZI, A. K.; MOREIRA, T. S.; CAVICCHIOLI, V. Q.; BURIN, R. C. K.; NERO, L. A. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. **Small Ruminant Research**. n. 113 p. 205–210, 2013.