

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e
microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento**

CHIARA RODRIGUES DE AMORIM LOPES

Recife-2010

CHIARA RODRIGUES DE AMORIM LOPES

Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia – UFRPE/UFPB/UFC, como requisito para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa, D. Sc

Co-orientadores: Pastor Ponce Ceballo, D. Sc

Ângela Maria Vieira Batista, D. Sc.

Recife-PE

Fevereiro de 2010

CHIARA RODRIGUES DE AMORIM LOPES

Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento

Tese defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2010

Orientador:

Severino Benone Paes Barbosa, D. Sc. UFRPE

Examinadores:

Ângela Maria Vieira Batista, D. Sc. UFRPE

Humberto Monardes, D. Sc. McGill University, Canada

José do Egito de Paiva, D. Sc. UFRPE

Maria José de Sena, D. Sc. UFRPE

Ficha catalográfica

L864e Lopes, Chiara Rodrigues de Amorim
Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento / Chiara Rodrigues de Amorim Lopes – 2010.

79 f. : il.

Orientador: Severino Benone Paes Barbosa
Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia, Recife, 2010.

Referências

1. Qualidade do leite 2. Enzima lactoperoxidase
3. Ativador do sistema lactoperoxidase 4. Conservação do leite 5. Refrigeração I. Barbosa, Severino Benone Paes, orientador II. Título

CDD 637

Aos meus pais,

Adailton Lopes de Oliveira e Maria Gorete Rodrigues de Amorim,

Pelo amor sem medida, puro e incondicional. Pelo esforço de uma vida inteira, a fim de que não nos faltasse, a mim e a meu irmão, afeto, o pão de cada dia, um lar, fé, respeito, educação, humildade, bondade, verdade, caráter, entre muitos outros valores. Por se fazerem presentes em todos os momentos de minha vida, doando o melhor de si para converter no melhor de mim. Por estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas, sobretudo na escolha da minha profissão.

Por acreditarem na minha capacidade, persistência, luta e vontade de vencer.

e ao meu irmão,

Davi Rodrigues de Amorim Lopes

Pelo exemplo de simplicidade. Pela cumplicidade e apoio em minhas escolhas.

Por se fazer presente hoje e em minhas melhores memórias.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por iluminar meu caminho e por me conceder a força de seguir adiante, sempre.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sobretudo ao Departamento de Zootecnia (DZ), onde adquiri conhecimento, desenvoltura e muitos amigos; onde enfrentei desafios e dediquei grande parte de minhas energias, durante seis importantes anos de minha vida.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia (PDIZ), pelos quatro anos de contribuição para o meu desenvolvimento acadêmico/profissional; à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o curso, e ao seu Programa em união com o Ministério de Educação Superior de Cuba (CAPES/MES-CUBA), pela contribuição para a minha qualificação científica.

Ao Centro Nacional de Sanidade Agropecuária (CENSA) e ao Centro de Ensaio para o Controle da Qualidade do Leite e Derivados Lácteos (CENLAC) de Cuba, onde fui acolhida de braços abertos e onde adquiri a base dos conhecimentos depositados neste trabalho de tese. Obrigada pelo fundamental aprendizado e por me fazerem sentir como se estivesse em minha própria casa.

Meus agradecimentos especiais ao professor Severino Benone Paes Barbosa, pela grandiosa arte de educar. Certa vez, ouvi dizer que o verdadeiro mestre é aquele que segue à frente, sinalizando a estrada com os próprios passos. Além de ser esse exemplo de educador, é também exemplo de humanidade, simplicidade, alegria, caráter e humildade. Deixo registrado

nestas pouquíssimas linhas minha sincera gratidão pela boa convivência, por sempre ter acreditado em meu potencial e por me incentivar a chegar exatamente onde estou hoje. Levarei comigo seus ensinamentos onde quer que eu esteja. Muito obrigada!

Aos demais professores da casa, e ao professor Rinaldo Aparecido Mota, do departamento de Medicina Veterinária, por também constituírem peças fundamentais na construção do meu saber.

Ao diretor do Centro de Ensaios para Controle da Qualidade do Leite e Derivados Lácteos (CENLAC) e amigo, Dr. Pastor Ponce Ceballo, por ter se doado completamente ao meu bom desempenho no desenvolvimento desse trabalho de tese, pelo exemplo de objetividade e simplicidade, pela sua amizade, carisma, e também pela sua rigidez e seriedade em momentos devidos. Minha profunda admiração e gratidão.

Aos professores Humberto Monardes, da Universidade McGill de Montreal, e aos professores da UFRPE, José do Egito de Paiva, Maria José de Sena e Ângela Maria Vieira Batista. Meus efusivos agradecimentos pela participação nesta banca de doutorado, o que certamente tornará o trabalho mais rico.

Aos amigos Odalys, Ailin, Giselle, Wendy, Kent, Atzel, Ariel e Nivian, que contribuíram diretamente para o desenvolvimento da primeira etapa deste trabalho, e também àqueles que não participaram de maneira direta, mas colaboraram com a calorosa receptividade, disponibilidade e momentos de descontração. Muito obrigada, Dra. Lydia Tablada, Dra. Ondina León, Dra. Silvia Hernández, Victória, Ariadna, Daniel, Maricela, Adriana, Yosbani, Lisandra, Joel, Guido, Fabian, Osvaldito, Sofia, Vania, Yainet, Laura, Valentina, Marialina, Vlademir, Yunier, Luiz Carlos, Amanda, Maria Elena, Olveido e outros a quem deixei de mencionar.

Às amigas Ana Paula, Valéria Louro, Fabiana Lopes, Socorro, Daniela e Flaviana, pela atenção dispensada, pelo revezamento de companhia e ajuda braçal durante as viagens de coleta.

Aos anjos da estrada, Sarah e Laís, sempre disponíveis a resolver minhas trapalhadas.

À Raquel Jatobá, Zezé, Ronaildo, Ricardson, Katarina, Maria Patrícia, Emanuele e João, pela contribuição dispensada na realização das análises; e, ao professor da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Kleber Régis Santoro, pela contribuição nas análises estatísticas dos dados.

Aos proprietários Carlos Perez, Cristiano Malta, Edson Félix, Juarez Monteiro e Dr. Mário Borba, por se colocarem à disposição da Universidade e por disponibilizarem o material de estudo, indispensável à realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos mais próximos e familiares, que mesmo nos difíceis momentos de estresse, mau humor e descontrole, comuns a quem está prestes a qualificar, terminar de escrever uma tese e defendê-la, estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando a seguir adiante e me mostrando que tudo iria dar certo no final. Muito obrigada!

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, com pouco ou com muito, contribuíram para a conclusão de mais essa etapa em minha vida. Minha eterna gratidão.

"Conhecer não é demonstrar nem explicar, é aceder à visão."
(Antoine de Saint-Exupéry)

ÍNDICE

	Página
1. Introdução Geral.....	15
2. Revisão de literatura.....	17
2.1. O Sistema Lactoperoxidase.....	17
2.2. Componentes do Sistema Lactoperoxidase	18
2.2.1. <i>Lactoperoxidase</i>	18
2.2.2. <i>Íon tiocianato</i>	19
2.2.3. <i>Peróxido de hidrogênio</i>	21
2.3. Mecanismos de Ação do Sistema Lactoperoxidase.....	21
2.4. Atividade Antimicrobiana do Sistema Lactoperoxidase.....	23
3. Referências Bibliográficas.....	26
CAPÍTULO I – Efeito da ativação do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado e não-refrigerado em Havana, Cuba.....	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	33
3. Resultados e Discussão.....	37
4. Conclusões.....	48
5. Referências Bibliográficas.....	49
CAPÍTULO II – Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru conservado sob diferentes condições de armazenamento no nordeste pernambucano.....	51
Resumo.....	52
Abstract.....	53
1. Introdução	54

2.	Material e Métodos.....	56
	2.1. Coleta do leite e ativação do sistema lactoperoxidase.....	58
	2.2. Identificação das amostras específicas a cada ensaio.....	59
	2.3. Acondicionamento e transporte das amostras.....	59
	2.4. Manuseio das amostras.....	60
	2.5. Análises físico-químicas e microbiológicas.....	61
	2.6. Análises estatísticas.....	62
3.	Resultados e discussão.....	64
	3.1. Ensaio I: Eficiência do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração, por períodos de 4 e 8 horas pós-ativação.....	64
	3.2. Ensaio II: Eficiência do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado armazenado por períodos de 4, 8 e 24 horas pós-ativação.....	68
	3.3. Ensaio III: Eficiência do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado, sob simulação da falta de energia elétrica	71
	3.4. Ensaio IV: Eficiência do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado, com exposição prévia a temperatura ambiente.....	73
4.	Conclusões.....	76
5.	Referências Bibliográficas.....	78

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

	Página
Tabela 1. Análises de variância da acidez e da composição centesimal em leite cru armazenado sob temperatura ambiente (ensaios I e II) e sob temperatura de refrigeração (ensaio III)	37
Tabela 2. Tempo de redutase ao azul de metileno (TRAM) e acidez titulável do leite cru ativado e não-ativado, em condições de laboratório (ensaio I) e em condições práticas de campo (ensaio II).....	38
Tabela 3. Análises de variância para a contagem de coliformes totais (ensaios I, II e III) e contagem de microorganismos psicrotróficos (ensaio III).....	43

Capítulo II

	Página
Tabela 1. Especificações das condições, tempos e temperaturas de armazenamento do leite por ensaio.....	56
Tabela 2. Identificação e destino das amostras utilizadas nos quatro ensaios	59
Tabela 3. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração, por períodos de 4 e 8 horas pós-ativação	65
Tabela 4. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru refrigerado, ativado e não-ativado, armazenado por períodos de 4, 8 e 24 horas pós-ativação.....	68

Tabela 5.	Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 8 e 24 horas em situações que simulam a falta de corrente elétrica.....	71
Tabela 6.	Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, tardiamente refrigerado.....	74

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

	Página
Figura 1. Estrutura da enzima lactoperoxidase	19

Capítulo I

	Página
Figura 1. Acidez titulável em leite cru ativado e não-ativado, armazenado durante 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (ensaio III).....	40
Figura 2. Valores percentuais dos componentes gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT) e sólidos totais (S.T.) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado durante 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III).....	42
Figura 3. Coliformes totais em leite cru ativado e não-ativado armazenado sob temperatura ambiente por períodos de 0, 4, 8 e 12 horas pós-ativação do SLP em condições de laboratório (ensaio I) e de campo (ensaio II).....	44
Figura 4. Coliformes totais e de psicrotóxicos em leite cru ativado e não-ativado armazenado por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III).....	46

Capítulo II

	Página
Figura 1. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração por períodos de 4 e 8 horas.....	66
Figura 2. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru refrigerado ativado e não-ativado, conservado por períodos de 4, 8 e 24 horas	69
Figura 3. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob refrigeração e por mais 4 horas sob temperatura ambiente (T1) e em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob refrigeração, por mais 4 horas sob temperatura ambiente e novamente sob refrigeração por mais 16 horas (T2)	72
Figura 4. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 4 horas sob refrigeração (T1); por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 20 sob refrigeração (T2); por 8 horas sob temperatura ambiente e por 16 horas sob refrigeração (T3).....	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite *in natura* produzido no Brasil apresenta baixa qualidade, sobretudo em função das inadequadas práticas de produção e da falta de procedimentos higiênicos durante a ordenha, armazenagem e conservação do leite até o momento de sua utilização pela indústria de processamento.

Visando reduzir as perdas por acidificação, aumentar o rendimento industrial da matéria-prima e fornecer produtos de melhor qualidade e inócuo à saúde do consumidor, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, regulamentou, em 2002, através da Instrução Normativa Nº 51, a estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção e seu transporte a granel (BRASIL, 2002).

A refrigeração do leite depois de concluída a ordenha constitui o principal método de conservação do leite cru, evitando a perda da matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Entretanto, deve-se considerar que o resfriamento do leite acima da temperatura recomendada (4°C) ou por períodos prolongados pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicotróficas (PINTO et al., 2004). Além disso, outros fatores de ordem técnica e/ou econômica relacionados à disponibilidade e regularidade no fornecimento de energia elétrica em determinadas áreas do país, às possíveis falhas nos equipamentos de resfriamento durante a estocagem do leite, bem como ao baixo poder de investimento da maioria dos pequenos produtores podem comprometer a qualidade da matéria-prima.

Outra problemática é o período de tempo transcorrido desde o transporte do leite (em latões) das propriedades leiteiras até os pontos de coleta, onde o resfriamento é feito mediante a utilização de tanques comunitários. Em casos como este, dependendo da distância percorrida, do

tipo de transporte utilizado e da temperatura ambiente, o crescimento exponencial da microbiota contaminante pode ser altamente favorecido, induzindo a redução na qualidade do leite a ser processado.

Diante de situações como as supracitadas, a utilização de um método de conservação complementar e/ou alternativo à refrigeração seria de grande importância para garantir melhor qualidade do leite que chega à indústria, o que evitaria as perdas por acidificação e propiciaria maior segurança alimentar ao consumidor final.

Nesse contexto, o sistema lactoperoxidase (SLP) constitui uma série de reações naturais que se produzem no leite como parte dos mecanismos intrínsecos à proteção da glândula mamária e a outros fluidos biológicos como sangue, saliva, suco gástrico, linfa e urina (ORAM e REITER, 1966; SHARMA e RAJ, 1999; VANOIRBEECK et al., 2005).

A ativação exógena desse sistema no leite gera uma ação do tipo bacteriostática e/ou bactericida, que limita o crescimento da população das bactérias contaminantes e a produção de ácidos, permitindo, com isso, que a qualidade microbiológica e físico-química da matéria-prima se mantenha por maior período de tempo (ORAM e REITER, 1966; BJORCK et al., 1975, BJORCK, 1978; PONCE et al., 2001).

Devido às suas propriedades antimicrobianas e por constituir um mecanismo de defesa natural, o SLP tem sido objeto de uma ampla investigação nos últimos 40 anos, sobretudo em países europeus, sendo aprovado como método de conservação do leite cru pelo *Codex Alimentarius*, em 1991 (CAC, 1991). Considerando que a eficiência do SLP depende de diversos fatores relacionados ao ambiente em geral (alimentação, volume produtivo, tipos de microrganismos envolvidos etc.), torna-se extremamente necessária a realização de estudos e

avaliações específicas para cada país ou região, sobretudo para aquelas áreas onde o SLP teria maior potencial de aplicação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do SLP sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Sistema Lactoperoxidase

O SLP é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária de todos os mamíferos, sendo composto pela enzima lactoperoxidase (LP), uma proteína sintetizada na glândula mamária por íons tiocianato (SCN^-), originados do metabolismo hepático e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e outras células. O SLP compreende uma série de reações que se produzem no leite como parte dos mecanismos intrínsecos à proteção da glândula mamária e a outros fluidos biológicos como sangue, saliva, suco gástrico, linfa e urina (ORAM e REITER, 1966; SHARMA e RAJ, 1999; VANOIRBEECK et al., 2005).

A enzima LP catalisa a oxidação do SCN^- na presença de H_2O_2 e gera produtos intermediários com propriedades antimicrobianas, entre os quais o hipotiocianato (OSCN^-), que é produzido em maiores quantidades (ORAM e REITER, 1966; WOLFSON e SUMNER, 1993). A atividade antimicrobiana dos compostos formados resulta na oxidação dos grupos sulfidrílicos (SH) de diversas enzimas e outras proteínas microbianas, podendo ainda haver oxidação do NADH do NADPH, o que altera os sistemas de transporte de energia e aminoácidos ou a atividade das enzimas glicolíticas (HOOGENDOORN, 1977).

A eficiência do SLP pode variar dependendo de diversos agentes e fatores; porém, de modo geral, pode-se dizer que o sistema possui ação bactericida e/ou bacteriostática. Em estado

natural, os fatores limitantes da ativação do SLP são os íons tiocianato e o oxigênio reativo, pois ainda que se encontrem constantemente no leite, suas concentrações dependem de muitos fatores como alimentação, condições fisiológicas, manejo, entre outros (MATHUR e CHOPRA, 1995; PONCE et al., 1995).

2.2. Componentes do Sistema Lactoperoxidase

2.2.1. Lactoperoxidase

A lactoperoxidase (LP) é uma enzima da família química das oxidases, as quais estão amplamente distribuídas na natureza, tanto nos vegetais quanto nos animais, incluindo todos os mamíferos, inclusive o homem (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000). A LP encontra-se presente nas glândulas mamárias, salivares e lacrimais dos mamíferos e em suas respectivas secreções, ou seja, no leite, saliva e lágrimas (WOLFSON e SUMNER, 1993).

Todas as peroxidases são química e imunologicamente similares. São glicoproteínas que possuem um grupo heme no centro catalítico, ligado covalentemente a uma cadeia polipeptídica (THANABAL e LA MAR, 1989), como representado na Figura 1 (PONCE, 2007), e apresentam como função principal a de catalisar a oxidação de diversos componentes na presença de peróxido de hidrogênio, gerando produtos intermediários com propriedades antimicrobianas (ORAM e REITER, 1966; REITER e HARNULV, 1984; WOLFSON e SUMNER, 1993).

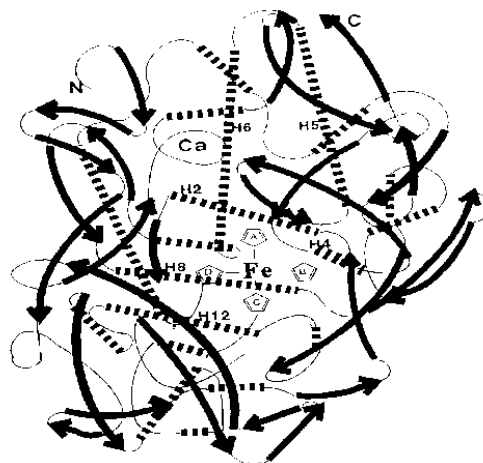


Figura 1. Estrutura da enzima lactoperoxidase

Especificamente no leite, a LP constitui uma das principais proteínas que apresentam concentrações médias de 30 mg/L, bem superiores às necessidades biológicas requeridas para uma ótima reação enzimática (SHARMA e RAJ, 1999; FONTEH et al., 2002). Em termos de unidades de atividade enzimática/mL, a concentração dessa enzima varia amplamente entre as espécies. Concentrações de 1,2 –19,4 (BJORCK et al., 1975; REITER et al., 1976; REITER e HARNULV, 1984); 0,14 – 2,38 (MEDINA et al., 1989); 0,95 – 2,15 (ZAPICO et al., 1991) e 0,9 UA/mL (HARNULV e KANDASAMY, 1982) foram encontradas em leite de vaca, ovelha, cabra e búfala, respectivamente. A concentração mínima para sua ação bactericida é de 0,02 unidades/mL, o que garante que em qualquer condição do leite cru exista a atividade requerida (SEIFU et al., 2005).

O papel biológico fundamental da LP está associado à proteção da glândula mamária e do trato intestinal dos recém nascidos contra os microrganismos patógenos presentes no leite (SEIFU et al, 2005).

2.2.2. Íon tiocianato

O tiocianato (SCN^-) é uma substância ubíqua nos órgãos (rins, estômago etc.), fluidos (espinhal, linfático, plasmático etc.) e secreções (leite, saliva, etc.) dos mamíferos (WOLFSON e SUMNER, 1993; KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000), sendo suas concentrações variáveis nos diversos fluidos e secreções que participa. Especificamente no leite bovino, têm sido reportadas concentrações de 0,02 a 0,6 mmol/L (BJORCK, 1978; PONCE, 2001). Segundo Kusendrager e Hooijdonk (2000), as concentrações de tiocianato em leite são reflexos das concentrações sanguíneas, as quais variam de acordo com a raça, regime de alimentação, saúde do úbere, fatores fisiológicos e tipos de alimentos. As fontes principais de SCN^- são os glucosinolatos presentes nas hortaliças, como repolho, couve-flor, etc., e os glucosídeos cianogênicos, presentes em diversas fontes alimentares como repolho, batata, milho etc. que durante sua hidrólise geram tiocianato, além de outros compostos (REITER e HARNULV, 1984).

De acordo com Reiter e Harnulv (1984), a ingestão excessiva de tiocianato pode produzir bócio (ou deprimir a hiperatividade das glândulas tireóides) indiretamente, através de sua interferência no metabolismo do iodo. No entanto, do ponto de vista do risco químico, o íon tiocianato, utilizado como parte da ativação do SLP, dentro dos níveis estabelecidos pelas diretrizes, não possui significado importante; primeiramente pelo fato de constituir um componente natural do leite, bem como pelo fato de suas concentrações finais não ultrapassarem os níveis fisiológicos extremos relatados em leite de mamíferos, sendo, inclusive, muito inferiores às concentrações existentes na saliva e no suco gástrico dos seres humanos (WILSON e MATTHEUS, 1966). Com respeito aos produtos intermediários gerados pela sua oxidação, tem sido relatado que estes são muito instáveis no leite, especialmente sob elevadas temperaturas.

Desse modo, o tratamento térmico a 65 °C garante que tais elementos não estejam presentes no leite no momento de seu consumo ou da produção de derivados lácteos (PONCE, 2007).

Com base em seu papel como um mecanismo de defesa natural de secreções como a saliva (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000) e do trato intestinal, reporta-se o uso potencial do tiocianato em cremes dentais, cosméticos, tratamentos de diarreias e no controle da *Helicobacter pylori* (DAVIDSON, 2001; SHIN et al, 2002).

2.2.3. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o terceiro componente do SLP. O H_2O_2 pode se formar, endogenamente, pelos leucócitos durante o processo de fagocitose e por um conjunto de bactérias como os lactobacilos, lactococos e estreptococos, bem como por algumas células epiteliais (WOLFSON e SUMNER, 1993). Não obstante, o H_2O_2 pode ter procedência exógena, podendo ser adicionado na forma de percarbonato de sódio ou de peróxido de magnésio (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000).

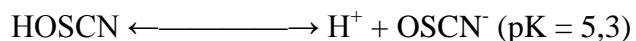
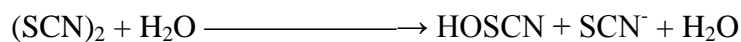
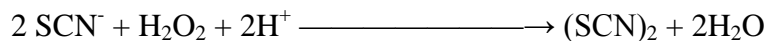
Segundo Pérez (1987), o excesso de peróxido inibe a ação da enzima lactoperoxidase, razão pela qual, quando se adiciona água oxigenada no leite em valores acima de 60 mmoles/L, a enzima se torna inativa. De acordo com Bjorck (1992), a ativação do SLP requer quantidades mínimas de H_2O_2 . O critério estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para ativação exógena do SLP em leite é de 8 mg/L de H_2O_2 . Tal concentração é cem vezes menor que a utilizada para conservação do leite mediante o uso unicamente do H_2O_2 , que requer entre 500- 800 mg/L.

2.3. Mecanismos de Ação do Sistema Lactoperoxidase

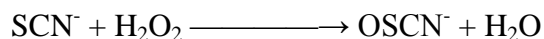
A enzima lactoperoxidase catalisa a oxidação do tiocianato (SCN^-). Nestas reações de oxidação são formados compostos intermediários transitórios, que podem sofrer oxidações posteriores adicionais para formar produtos finais, como sulfato, dióxido de carbono e amoníaco, como também podem reciclar-se para novamente gerar SCN^- (REITER e HARNULV, 1984). Os produtos intermediários são os que possuem atividade antimicrobiana. O metabólito principal e o que se forma em maior quantidade é o hipotiocianato (OSCN^-) (WOLFSON e SUMNER, 1993). O OSCN^- pode ser produzido por duas diferentes rotas (KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000):

1- A oxidação de SCN^- , catalisada pela enzima LP, pode dar lugar a tiocianógeno $[(\text{SCN})_2]$, que rapidamente se hidrolisa e gera ácido hipotiocianoso (HOSCN) em equilíbrio ácido-base com o OSCN^- ($\text{pK} = 5,3$). A este valor de pH existem quantidades equimolares dos dois compostos.

Ambos possuem atividade antimicrobiana:



2 – Na outra via, o SCN^- pode oxidar-se diretamente a OSCN^- :



A atividade antimicrobiana é a chave do SLP, que resulta na oxidação dos grupos sulfidrílicos de diversas enzimas e de outras proteínas microbianas (REITER e HARNULV, 1984), o que se traduz na inibição do crescimento bacteriano. O OSCN^- pode também oxidar o NADH e o NADPH a NAD^+ e NADP^+ (HOOGENDOORN, 1977), alterando os sistemas de

transporte de energia e aminoácidos ou a atividade das enzimas glicolíticas (REITER e HARNULV, 1984).

Segundo Farrag et al. (1992) e Pitt et al. (2000), o dano causado na estrutura das proteínas bacterianas é consequência da ação oxidativa sobre a membrana citoplasmática, resultando na perda de íons de potássio, aminoácidos e polipeptídeos para o meio. Consequentemente, altera-se o consumo de glucose, aminoácidos e purinas, o que afeta a síntese de proteínas pelos bloqueios concomitantes das funções do DNA e RNA. A expressão da atividade do sistema lactoperoxidase pode ser bacteriostática e/ou bactericida, dependendo da susceptibilidade dos microrganismos, que incluem bactérias, vírus e fungos (CLAESSON, 1993).

Para ativação exógena do SLP em leite, preconiza-se a adição de peróxido de hidrogênio e de tiocianato de sódio nas concentrações de 8 e 14 ppm, respectivamente, de maneira que alcance concentrações equimolares de cada componente na ordem de 0,20-0,25 mmoles/L (CAC, 1991).

2.4. Atividade Antimicrobiana do Sistema Lactoperoxidase

A atividade antimicrobiana do SLP pode ocasionar lesões ou modificações nas diversas estruturas (parede celular, membrana citoplasmática, sistema de transporte, enzimas glicolíticas, ácidos nucleicos) da célula microbiana e, em consequência, ocasionar a morte ou a inibição do crescimento ou do metabolismo dos microrganismos afetados.

A eficácia do SLP pode variar em função de numerosos fatores. Entre estes, a presença de componentes de baixo peso molecular no meio (HOOGENDOORN et al., 1977), a quantidade de H_2O_2 disponível e a forma de subministrá-la (REITER e HARNULV, 1984).

Apesar dessa variabilidade na eficácia antimicrobiana do SLP, pode-se dizer que o sistema possui ação não somente inibidora como também bactericida (dependendo das condições do meio) sobre as bactérias Gram negativas, catalase positivas como coliformes, pseudomonas, salmonelas etc. que, inclusive, eventualmente, podem sofrer lise (BJORCK, 1978; WILKINS e BOARD, 1989; KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000). As bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* são mais resistentes; neste caso, o SLP possui somente ação inibitória sobre os seus crescimentos (BJORCK, 1978; WILKINS e BOARD, 1989; KUSSENDRAGER e HOOIJDONK, 2000). As variações de sensibilidade entre as bactérias Gram positivas e negativas podem ser explicadas levando-se em conta as diferenças nas estruturas da parede celular e os compostos inibidores gerados pelas mesmas (REITER e HARNULV, 1984; WITT e HOOYDONK, 1996).

Devido às suas propriedades antimicrobianas e por constituir um mecanismo de defesa natural, o SLP tem sido objeto de uma ampla investigação nos últimos 40 anos, sobretudo em países europeus, sendo aprovado como método de conservação do leite cru pelo *Codex Alimentarius*, em 1991 (CAC, 1991). Com base nesses estudos, reconhece-se nesse método um importante potencial de utilização em condições de limitações de infraestrutura de refrigeração e outras situações (FAO/WHO, 2006). Nesse sentido, considerando que a eficiência do SLP depende de diversos fatores relacionados ao ambiente em geral (alimentação, volume produtivo, tipos de microrganismos envolvidos etc.), torna-se extremamente necessária a realização de estudos e avaliações específicas para cada país ou região, sobretudo para aquelas áreas onde o SLP teria maior potencial de aplicação, como as regiões Norte e Nordeste do País.

Nesse contexto, as dificuldades técnicas, climáticas e econômicas encontradas nas referidas regiões, somadas à necessidade de utilização de métodos alternativos e/ou complementares ao

processo de refrigeração que venham contribuir para a obtenção de leite e derivados lácteos de melhor qualidade para a indústria e consumidor motivaram a realização deste trabalho. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru refrigerado e não-refrigerado, como também sobre a qualidade do leite em situações que simulam a falta de energia elétrica durante o armazenamento sob refrigeração, o que é muito comum em zonas rurais, e em situações que simulam a exposição do leite à temperatura ambiente por longos períodos, antes de seu resfriamento ou de sua utilização pela indústria de processamento.

3. Referências Bibliográficas

- BJORCK, L. et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other gram-negative bacteria. **Appl. Microbiol.**, n. 30, p.199-204, 1975.
- BJORCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 45, p.109-118, 1978.
- BJORCK, L. Lactoperoxidase. In: FOX, P F. **Advanced Dairy Chemistry: Protein**. Londres: Elsevier, 1992. p. 332-338.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 8-13.
- CAC. *Codex alimentarius*. Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la lactoperoxidasa. **CAC/GL**. 1991.
- CLAESSON, O et al. The use of the lactoperoxidase system. In: SEMINAR ON DAIRY DEVELOPMENT POLICY AND IMPLEMENTATION: SHARING OF EXPERIENCES BETWEEN AFRICA AND ASIA, 1993, Asia. Harare, Zimbabwe. **Proceedings...** . Roma: FAO, 1994. p. 254 - 261.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobials compounds. In: DOYLE, M P; BEUCHAT, L R; MONTVILLE, T J. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: Asm Press, 2001. p. 593-627.
- FAO/WHO. **Beneficios y riesgos potenciales del sistema de la lactoperoxidasa en la conservación de la leche cruda**: informe de la reunión técnica de la FAO/WHO. Roma, 2005. Roma: FAO, 2006. 55 p.
- FARRAG, S. A.; EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Use of lactoperoxidase system to inactivate Escherichia coli 0157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. **Milchwiss**, Kiel, n. 47, p.15-17, 1992.
- FONTEH, F. A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows and goats milk throughout lactation. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 69, p.401-409, 2002.
- HARNULV, B. G.; KANDASAMY, C. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: results from Sri Lanka. **Milchwiss**, Kiel, n. 37, p.454-457, 1982.

- HOOGENDOORN, H. et al. Hypothiocyanite ion: the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. **Caries Res.**, Londres, n. 11, p.77-84, 1977.
- KUSSENDRAGER, K. D.; HOOIJDONK M., A. C. Van. Lactoperoxidase: Physico-Chemical properties, occurrence, mechanism of action and application. **Brit. J. Nutr.**, Cambridge, n. 84, p.519-525, 2000.
- LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos no leite cru de dois estados da Região Sul.** 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MATHUR, B. N.; CHOPRA, R. Current issues concerning safety of Lp-system for preservation of raw milk. **Ind. Dairyman**, Anand, India, n. 47, p.4-11, 1995.
- MEDINA, M.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M. The lactoperoxidase system in ewes milk: levels of lactoperoxidase and thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol**, Cardiff, Uk, n. 8, p.147-149, 1989.
- ORAM, J. D.; REITER, B. The oxidation of thiocyanate and the nature of inhibitory compound. **Biochemical J.**, n. 100, p.273-386, 1966.
- PÉREZ, L. O. Efecto de inhibición del peróxido de hidrógeno sobre la enzima lactoperoxidasa de origen bovino y caprino. **Rev. Biología**, Havana, n. 1, p.13-20, 1987.
- PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, Mcd. Bactérias psicotróficas proteolíticas e potencial determinante a temperaturas de refrigeração. **Revista do ILCT**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p.110-117, 2004.
- PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, H. R. Investigation of the antimicrobial activity of raw milk against several foodborne pathogens. **Milchwiss**, Kiel, n. 55, p.249-252, 2000.
- PONCE, P. Experiencia nacional e internacional de Cuba en la aplicación del sistema lactoperoxidasa para la conservación de leche cruda. In: GLOBAL LACTOPEROXIDASE PROGRAMME (FAO-GLP) (Cuba). **Tercera Reunión Anual del Grupo de Expertos Lactoperoxidasa.** Havana: FAO, 2001.
- PONCE, P. **Activación del sistema lactoperoxidasa: un nuevo enfoque para la conservación de la leche cruda en tropico americano.** 2007. 150 f. Tese (Segundo Doutorado) – CENSA, San José de las Lajas, Cuba, 2007. Disponível em: <http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=253&Itemid=105>. Acesso em set. de 2009.

- REITER, B. et al. Nonspecific bacterial activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens. **Infect. Immun.**, n. 13, p.800-807, 1976.
- REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Prot.**, n. 47, p.724-732, 1984.
- SEIFU, E.; BUYS, E.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Food Sci. And Techn.**, n. 16, p.137-154, 2005.
- SHARMA, V.; RAJ, D. Lactoperoxidase system origin, efficacy and its effect on milk constituent: a review. **Indian J. Dairy Bioscience**, n. 10, p.9-13, 1999.
- SHIN, K. et al. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and its urease activity to the peroxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system: a review. **J. Med. Microb.**, n. 51, p.231-237, 2002.
- STOCK, L. A. et al. Sistemas de produção e sua representatividade na produção de leite no Brasil. In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2007, Cuzco. **Anais... .** Cuzco: Alpa, 2007.
- THANABAL, V.; LA MAR, G. N. A nuclear Overhauser effect investigation of the molecular and electronic structure of the heme crevice in lactoperoxidase. **Biochemistry**, n. 28, p.7038-7044, 1989.
- VANOIRBEECK, S. J. et al. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.**, n. 156, p.225-232, 2005.
- WILKINS, K. M.; BOARD, R. G. Natural antimicrobial systems. In: GOULD, G. W. (Org.). **Mechanisms of action of food preservation procedures.** Londres: Elsevier Applied Science, 1989. p. 285-362.
- WILSON, J.; MATTHEUS, D. M. Metabolic interrelations between cyanide, thiocyanate and vitamins B12 in smokers and non-smokers. **Clinical Sci.**, n. 31, p.1-5, 1966.
- WITT, J. N.; HOOYDONK, A. C. M. Van. Structure, function and application of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. **Milk Dairy J.**, n. 50, p.227-244, 1996.
- WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **J. Food Prot.**, n. 56, p.887-892, 1993.
- ZAPICO, P. et al. Influence of breed, animal and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. **J. Dairy Sci.**, n. 74, p.783-787, 1991.

CAPÍTULO I

Efeito da ativação do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado e não-refrigerado em Havana, Cuba

Efeito da ativação do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado e não-refrigerado em Havana, Cuba

Resumo - Foram realizados três ensaios com o objetivo de avaliar a eficiência do sistema lactoperoxidase (SLP) na conservação do leite cru refrigerado e não-refrigerado no estado de Havana, Cuba. No primeiro e no segundo ensaio utilizou-se leite cru armazenado sob temperatura ambiente durante 0, 4, 8 e 12 horas de conservação e o SLP foi ativado em condições de laboratório e de campo, respectivamente. No terceiro ensaio foi utilizado leite cru, refrigerado durante 0, 24, 48, 72 e 120 horas de conservação. Para ativação do SLP utilizou-se um ativador do SLP composto por tiocianato e percarbonato de sódio conhecido como STABILAK[®]. Houve efeito de tratamento (ativado e não-ativado), de tempo de conservação ($P < 0,01$) e da interação tratamento x tempo ($P < 0,05$) sobre a acidez titulável nos três ensaios; efeito de tempo sobre o nível de lactose ($P < 0,05$) e os sólidos totais ($P < 0,01$) no ensaio II e, efeito de tratamento sobre os níveis de gordura, a proteína, os sólidos totais ($P < 0,01$) e a lactose ($P < 0,05$) no ensaio III. Para a contagem de coliformes totais, houve efeito de tratamento ($P < 0,01$, ensaio I; $P < 0,01$, ensaio III), de tempo de conservação ($P < 0,05$, ensaios I e II; $P < 0,01$, ensaio III) e da interação tratamento x tempo ($P < 0,05$, ensaio III). Para a contagem de psicrotóxicos observou-se efeito de tratamento ($P < 0,05$) e de tempo de conservação ($P < 0,01$). O SLP inibiu o crescimento da população de coliformes em leite cru não-refrigerado e manteve o nível de acidez dentro dos limites aceitáveis até 8 horas, dependendo da qualidade inicial do leite. Em leite cru refrigerado o efeito inibitório do SLP sobre a contagem de coliformes totais foi prolongado até 120 horas e a acidez foi mantida dentro dos limites aceitáveis até 48 horas pós-ativação. Não foi observado efeito do SLP sobre a população de psicrotóxicos ao longo dos tempos de conservação. O SLP não alterou as concentrações iniciais de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, em todos os ensaios realizados, e conseguiu evitar que ocorresse degradação de tais componentes por períodos de até 120 horas, em leite cru refrigerado.

Palavras-chaves: qualidade do leite, ativador do sistema lactoperoxidase, conservação do leite.

Effect of lactoperoxidase system activation on the microbiological quality and physico-chemical raw milk refrigerated and non refrigerated in Havana, Cuba

Abstract - This study was to evaluate, through 3 trials, the efficiency of the lactoperoxidase system (LPS) activation on the preservation of refrigerated and non-refrigerated cow milk in Havana, Cuba. In the first and second trial was used raw milk stored at environmental temperature for 0, 4, 8 and 12 hours of storage and the SLP has been activated in the laboratory and camp, respectively. In the third trial was used raw milk refrigerated for 0, 24, 48, 72 and 120 hours of storage. SLP has been activated by the product STABILAK[®], a commercial activator containing sodium thiocyanate and Sodium percarbonate. There was observed effect of treatment (activated and not activated) of storage time ($P < 0.01$) and of interaction treatment x time ($P < 0.05$) on the acidity in the three trials, effect of storage time on the lactose ($P < 0.05$) and total solids ($P < 0.01$) in trial II and effect of treatment on fat, protein, total solids ($P < 0.01$) and lactose ($P < 0.05$) in trial III. For the coliforms count, was observed effect of treatment ($P < 0.01$, trial I; $P < 0.01$, trial III), of storage time ($P < 0.05$, trials I and II; $P < 0.01$, trial III) and treatment x time interaction ($P < 0.05$, trial III). For the psychrotrophic count was observed effect of treatment ($P < 0.05$) and storage time ($P < 0.01$). SLP inhibited the growth of coliforms population in raw milk non-refrigerated and kept the normal level of acidity up to 8 hours depending on the initial quality of milk. In refrigerated raw milk the inhibitory effect of SLP on the coliforms count was extended to 120 hours and the acidity was kept the normal level up to 48 hours after activation. There was no effect of SLP on the psychrotrophic population over the storage times. The SLP did not alter the initial concentrations of fat, protein, lactose and solids in all trials, and managed to prevent the degradation such components for periods of up to 120 hours in refrigerated raw milk.

Keywords: milk quality, lactoperoxidase system activator, preservation of milk.

1. Introdução

O sistema lactoperoxidase (SLP) é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária de todos os mamíferos, composto pela enzima lactoperoxidase (LP), uma proteína sintetizada na glândula mamária, por íons tiocianato (SCN^-), originados do metabolismo hepático, e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e outras células. Compreende uma série de reações que se produzem no leite como parte dos mecanismos intrínsecos à proteção da glândula mamária e em outros fluidos biológicos como sangue, saliva, suco gástrico, linfa e urina (ORAM e REITER, 1966; SHARMA e RAJ, 1999; VANOIRBEECK et al. 2005).

A ativação exógena do SLP gera uma ação no leite do tipo bacteriostática e/ou bactericida, o que limita o crescimento da população das bactérias contaminantes e a produção de ácidos, permitindo, conseqüentemente, que a qualidade microbiológica e físico-química do leite se mantenha por um maior período de tempo (ORAM e REITER, 1966; BJORCK et al., 1975; BJORCK, 1978; PONCE et al., 2001). A aplicação prática desse sistema consiste em adicionar concentrações de 8 e 14 ppm de peróxido de hidrogênio e de tiocianato de sódio, respectivamente, de maneira que alcance concentrações equimolares de cada componente na ordem de 0,20-0,25 mmoles/L (CAC, 1991).

Os principais fatores que determinam a eficiência da ativação exógena do SLP são a temperatura de conservação e o nível de contaminação inicial do leite. Entretanto, também há influência da concentração natural de tiocianato no leite, do nível produtivo do rebanho, da ordem de lactação, da idade da vaca, do sistema de alimentação e do estado sanitário do úbere (PONCE et al., 1998).

Apesar de diversos estudos demonstrarem a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru, vale ressaltar que a refrigeração continua sendo, sem dúvida, o principal método de conservação do leite durante seu armazenamento no local de produção e transporte até a indústria de beneficiamento. Entretanto, devido aos altos custos de investimento e de operação que esse processo necessita, seu uso continua sendo limitado, principalmente em propriedades com baixa escala de produção. Ademais, a eletrificação em zonas rurais continua sendo um fator técnico limitante nos países em desenvolvimento.

Nesse sentido, a importância do SLP reside, principalmente, em sua aplicação em situações nas quais, por razões técnicas, econômicas e/ou práticas, o uso de instalações de refrigeração para manter a qualidade do leite cru seja impossibilitado. Além disso, o SLP pode ser utilizado em complementação ao processo de refrigeração, retardando ainda mais o processo de deterioração, uma vez que também reduz o desenvolvimento de bactérias psicrófilas presentes no leite armazenado sob baixas temperaturas (FAO/WHO, 2006).

O presente estudo objetivou avaliar a eficácia do SLP sobre a conservação do leite cru refrigerado e não-refrigerado, em condições de laboratório e situação prática de campo, mediante a utilização de um ativador do SLP composto por tiocianato e percarbonato de sódio conhecido como STABILAK[®].

2. Material e Métodos

Foram realizados três ensaios, cada um com duas repetições, para avaliar a eficiência da ativação do sistema lactoperoxidase (SLP) na conservação do leite cru refrigerado e não-refrigerado. No primeiro ensaio foi avaliado o efeito da ativação do SLP, em condições de

laboratório, sobre a qualidade do leite cru de vaca não-refrigerado; no segundo ensaio, a mesma situação, sendo o SLP ativado em condições práticas de campo e, no terceiro ensaio, o efeito da ativação do SLP sobre a qualidade do leite cru armazenado sob temperatura de refrigeração (4-7°C). Todos os ensaios e procedimentos de análises foram realizados no Centro Nacional de Sanidade Animal (CENSA), localizado na Cidade de San José de Las Lajas, em Havana, Cuba.

Para ativação do SLP utilizou-se o produto STABILAK[®], um ativador comercial apresentado em doses em pó para 50 litros de leite, distribuídas em dois sachês, sendo um contendo 0,45g de tiocianato de sódio (ativador 1) e outro contendo 1,7g de peróxido de hidrogênio na forma de percarbonato de sódio (ativador 2).

Para realização do primeiro ensaio foram obtidos 4L de leite do tanque de armazenamento do CENSA, devidamente homogeneizado, depois de concluída a ordenha. Esta quantidade inicial foi dividida em duas alíquotas de 2L. A primeira alíquota foi identificada como ativada e a segunda como não-ativada. Ambas foram transferidas ao laboratório do CENSA onde, à alíquota ativada adicionou-se inicialmente o ativador 1 do SLP, com posterior homogeneização do leite durante 1 minuto. Seguidamente, adicionou-se o ativador 2 e a alíquota de leite foi novamente homogeneizada por mais dois minutos, de acordo com as recomendações do fabricante.

Depois de ativado o SLP, as alíquotas de 2L de leite (ativada e não-ativada) foram divididas em quatro amostras de 500 mL, cada uma, para realização das análises nos períodos de 0, 4, 8 e 12 horas de conservação, pós-ativação do SLP. Todas as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas à temperatura ambiente (28 a 30 °C).

As análises das amostras correspondentes ao tempo 0 h, foram realizadas 20 minutos depois de completar o processo de ativação do SLP (tempo correspondente ao processo de separação e identificação das amostras). As outras amostras foram analisadas nos tempos de 4, 8 e 12 horas

depois do processo de ativação do SLP. Todos os procedimentos de manipulação e de análises das amostras ativadas e não-ativadas foram realizados de maneira similar.

As análises foram realizadas segundo as metodologias estabelecidas pelas Normas ISO, FIL-IDF e pelas Normas Cubanas (NC), ou procedimentos do Centro de Ensaio para o Controle da Qualidade do Leite e Derivados Lácteos (CENLAC/CENSA), normalizados pelo Ministério de Agricultura de Cuba (MINAGRI).

Para avaliar o estado higiênico-sanitário do leite foram realizadas as análises tempo de redutase do azul de metileno (CUBA, 1983a), acidez titulável (CUBA, 1983b) e a contagem de coliformes totais, expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro de leite (UFC/mL) (ISO, 1986). Os componentes físico-químicos do leite como gordura, proteína e lactose foram determinados por radiação infravermelha, mediante o equipamento MilkoScan 104 (AS Foss).

Para o segundo ensaio, em condições de campo, uma alíquota não-ativada de 2L de leite foi tomada de um tanque coletor de uma granja leiteira, depois de concluída a ordenha e da adequada homogeneização do tanque. Em seguida, todo o leite do tanque foi ativado com os ativadores 1 e 2, dosificados de acordo com o volume de leite remanescente, segundo as recomendações do fabricante. Depois de concluído o processo de ativação, outra alíquota de 2L de leite, dessa vez ativada, foi tomada do tanque. Ambas as alíquotas (ativada e não-ativada) foram rapidamente transferidas ao laboratório do CENSA (tempo aproximado de 20 minutos), onde foram subdivididas em 4 amostras de igual volume para realização das análises (similares as do ensaio I) nos tempos de 0, 4, 8 e 12 horas. Até o momento de análise as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (28 a 30 °C).

As análises das amostras correspondentes ao tempo 0 h foram realizadas 20 minutos depois de completar o processo de ativação do SLP (tempo correspondente ao transporte das alíquotas

até o laboratório de análises). As outras amostras foram analisadas nos tempos de 4, 8 e 12 horas depois do processo de ativação do SLP.

Para realização do terceiro ensaio, uma alíquota de 3L de leite não-ativado foi tomada do tanque de armazenamento do rebanho do CENSA, previamente homogeneizado. Imediatamente depois, todo o leite do tanque foi ativado com os ativadores 1 e 2 (segundo recomendações do fabricante), dosificados de acordo com volume de leite remanescente. Depois de concluído o processo de ativação, uma alíquota de 3L de leite ativado foi tomada. Ambas as alíquotas (ativada e não-ativada) foram rapidamente transferidas para o laboratório do CENSA (tempo aproximado de 20 minutos), onde foram divididas em 6 amostras cada uma, e estocadas sob refrigeração (4-7⁰C). As amostras foram analisadas quanto à composição química, acidez titulável, contagem de coliformes totais e contagem de bactérias psicotróficas após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de conservação pós-ativação do SLP.

As análises das amostras correspondentes ao tempo 0 h foram realizadas 20 minutos depois de completar o processo de ativação do SLP (tempo correspondente ao transporte das alíquotas até o laboratório de análises). As outras amostras foram analisadas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas depois do processo de ativação do SLP.

Para as análises estatísticas, os resultados da contagem de coliformes totais e da contagem de microrganismos psicotróficos foram transformados para log base 10 (Log_{10} UFC/mL), com o objetivo de normalizar a distribuição dos dados.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do SAS (SAS, 2007). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 para os ensaios I e II, sendo dois tratamentos (ativado e não-ativado) e quatro tempos de conservação do leite sob temperatura ambiente (0, 4, 8 e 12 horas), e 2x6 para o ensaio III,

sendo dois tratamentos (ativado e não-ativado) e seis tempos de conservação do leite sob temperatura de refrigeração (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

3. Resultados e discussão

A tabela 1 apresenta os resumos das análises de variância da acidez titulável e da composição físico-química do leite para os três ensaios realizados.

Tabela 1. Análises de variância da acidez e da composição centesimal em leite cru armazenado sob temperatura ambiente (ensaios I e II) e sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III)

Fonte de Variação	G L	Acidez (QM) ²	Gordura (QM) ²	Proteína (QM) ²	Lactose (QM) ²	Sólidos totais (QM) ²
<i>Ensaio I</i>						
Tratamento	1	0,00523520**	0,00332112	0,00234612	0,00681528	0,00369800
Tempo	3	0,00560296**	0,04059658	0,00094217	0,00308353	0,04123587
Trat*temp ¹	3	0,00148522*	0,04753021	0,00001946	0,00599878	0,03946308
<i>Ensaio II</i>						
Tratamento	1	0,00267363**	0,12625313	0,00063012	0,00569778	0,00000703
Tempo	3	0,00776718**	0,10137275	0,00182471	0,01308978*	0,44202603**
Trat*temp ¹	3	0,00048144*	0,08033921	0,00031238	0,00236011	0,03176136
<i>Ensaio III</i>						
Tratamento	1	0,00210013**	10,28693419**	0,02571502**	0,04581852*	9,61498519**
Tempo	5	0,00185822**	0,43621237	0,00185714	0,00203277	0,39968427
Trat*temp ¹	5	0,00019656*	0,14675794	0,00019017	0,00115627	0,13888004

¹Trat*Temp = efeito da interação tratamento x tempo

²QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Observou-se efeito significativo de tratamento ($P < 0,01$), de tempo de conservação do leite ($P < 0,01$), bem como da interação tratamento x tempo ($P < 0,05$) sobre a acidez do leite avaliado em todos os ensaios (Tabela 1).

Para todos os ensaios, o valor médio de acidez do tratamento ativado foi significativamente menor ($P < 0,01$) que a média de acidez do tratamento não-ativado. Com relação à fonte de variação tempo, foi observado que em todos os ensaios houve aumento na acidez do leite, à medida que o tempo de armazenamento se prolongava.

Nos ensaios I e II, além da análise de acidez, também foi realizada a prova do tempo de redutase ao azul de metileno (TRAM) como indicador de controle higiênico-sanitário. Os resultados de ambas as análises, bem como o teste de comparação de médias para a acidez, encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2. Tempo de redutase ao azul de metileno (TRAM) e acidez titulável do leite cru ativado e não-ativado em condições de laboratório (ensaio I) e em condições práticas de campo (ensaio II)

Tratamentos		Tempo (h)			
		0	4	8	12
<i>Ensaio I</i>					
¹ TRAM	<i>Ativado</i>	8h15	5h00	1h30	1h00
	<i>Não-ativado</i>	2h00	1h30	30min	30min
² Acidez Titulável (g de ác. láctico/100mL)	<i>Ativado</i>	0,16 ^a	0,16 ^a	0,16 ^a	0,19 ^a
	<i>Não-ativado</i>	0,16 ^a	0,17 ^a	0,19 ^b	0,25 ^b
<i>Ensaio II</i>					
¹ TRAM	<i>Ativado</i>	1h30	1h00	30min	30min
	<i>Não-ativado</i>	30min	30min	30min	30min
² Acidez Titulável (g de ác. láctico/100mL)	<i>Ativado</i>	0,18 ^a	0,19 ^a	0,22 ^a	0,24 ^a
	<i>Não-ativado</i>	0,18 ^a	0,21 ^a	0,23 ^a	0,28 ^b

¹TRAM - Tempo aceitável = mínimo de 1 hora e 30 minutos (BRASIL, 2002).

²Acidez Titulável - quantidade aceitável = de 0,14 a 0,18 g de ác. láctico/100mL (BRASIL, 2002). Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, observou-se diminuição no TRAM e aumento da acidez do leite com o passar do tempo. Entretanto, no ensaio I, tanto o TRAM quanto a acidez do leite se mantiveram dentro dos limites aceitáveis até 8 horas pós-ativação do SLP no tratamento ativado, e até 4 horas, no tratamento não-ativado. Ainda no ensaio I, os valores de acidez apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), entre os tratamentos ativado e não-ativado, nos períodos de 8 e 12 horas de conservação (tabela 2).

É notória a má qualidade inicial do leite em que o SLP foi ativado em condições práticas de campo (ensaio II), uma vez que o tratamento ativado apresentou valores de TRAM fora dos limites aceitáveis em 4 horas de conservação e o tratamento não-ativado imediatamente após a ativação do SLP (0 h). Os tratamentos ativado e não-ativado apresentaram acidez aceitável somente no primeiro momento após a ativação do SLP (0h) e valores diferentes entre si ($P < 0,05$) no período de 12 horas de conservação (tabela 2).

Mediante os resultados de TRAM e acidez obtidos nesses dois ensaios pode-se concluir que o SLP pode ser utilizado para conservar a qualidade do leite cru por um período de até 8 horas de armazenamento sob temperatura ambiente, sendo necessário para tanto, que o leite apresente boa qualidade inicial.

Ponce et al. (1987) ao avaliarem a eficiência do SLP sobre a conservação do leite cru em Cuba, observaram que os indicadores TRAM e acidez titulável se mantiveram dentro dos limites aceitáveis por um período de 12 horas de armazenamento sob temperatura ambiente, em um primeiro ensaio, e de 16 horas, em sua repetição. Diversos outros estudos também apresentam o

SLP como método bem sucedido de preservação do leite à temperatura ambiente (PONCE et al., 2005; LUDEÑA et al., 2006; ASAAH, et al., 2007).

A figura 1 ilustra a acidez do leite cru ativado e não-ativado, armazenado por períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (ensaio III).

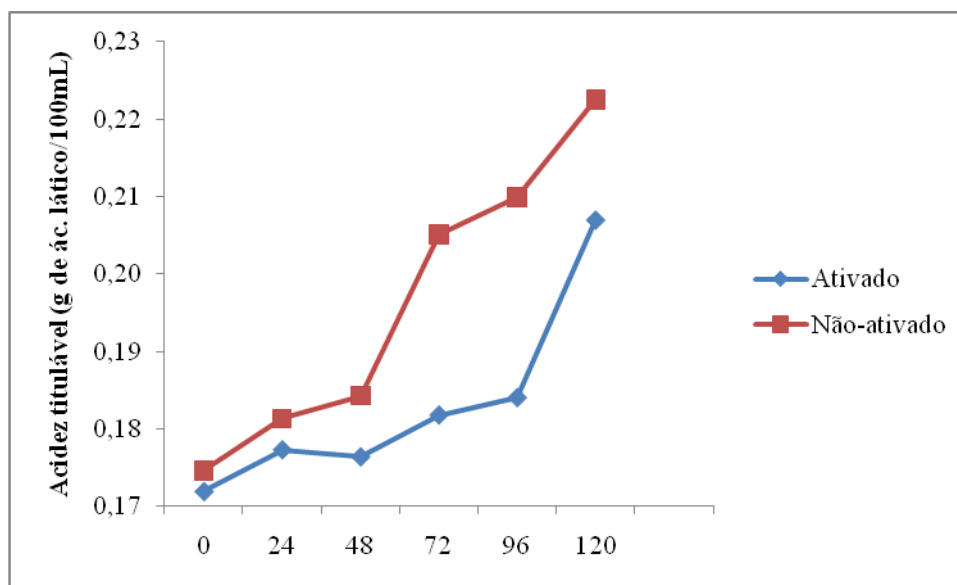


Figura 1. Acidez titulável em leite cru ativado e não ativado, armazenado durante 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III)

Do mesmo modo, em leite refrigerado (ensaio III), verificou-se aumento na acidez à medida que o tempo de armazenamento do leite se prolongava, tanto para o tratamento ativado quanto para o não-ativado. Entretanto, a acidez do leite ativado se manteve abaixo do limite de 0,18g até 48 horas de armazenamento sob refrigeração, enquanto o leite não-ativado se acidificou logo nas primeiras 24 horas de conservação (Figura 1). Tais resultados indicam que o SLP aumenta o tempo de conservação do leite quando utilizado em complementação ao processo de refrigeração.

De acordo com Ponce et al. (2005), através de seus estudos realizados durante 20 anos e envolvendo mais de 100 ensaios avaliativos sobre a acidez titulável, composição química e

qualidade dos produtos lácteos, foi evidenciado que a ativação do SLP mantém a acidez inicial do leite dentro dos limites aceitáveis pelas normas internacionais em um tempo que oscila entre 8 a mais de 36 horas, dependendo da temperatura de armazenamento e da qualidade inicial do leite.

Nas análises de variância para a composição química foi verificado que, em leite armazenado por períodos de 0 a 12 horas sob temperatura ambiente (ensaios I e II), nenhuma das fontes de variação avaliadas exerceu efeito significativo ($P > 0,05$) sobre os componentes gordura, proteína, lactose e sólidos totais, indicando que a ativação exógena do sistema lactoperoxidase, bem como os tempos de armazenamento avaliados nos referidos ensaios, de modo geral, não interferem na concentração dos componentes químicos do leite (Tabela 1). Em contrapartida, em leite armazenado por períodos de 0 a 120 horas sob refrigeração (ensaio III), a fonte de variação tratamento exerceu efeito significativo sobre os componentes gordura, proteína e sólidos totais ($P < 0,01$) e lactose ($P < 0,05$) (Tabela 1).

A figura 2 representa as alterações sofridas entre os componentes químicos dos tratamentos ativado e não-ativado do ensaio III.

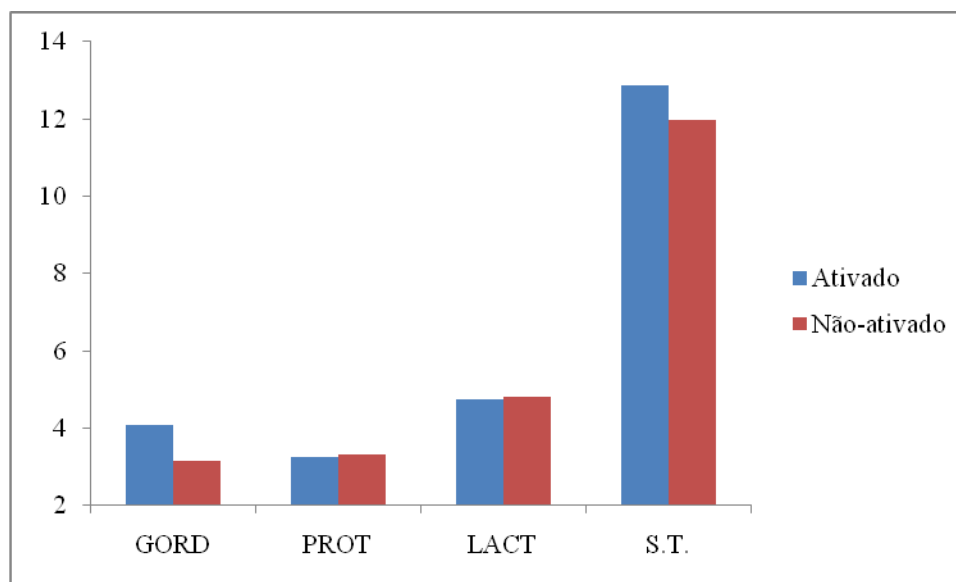


Figura 2. Valores percentuais dos componentes gordura (GORD), proteína (PROT), lactose (LACT) e sólidos totais (S.T.) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado durante 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III)

Para todos os componentes químicos avaliados, o tratamento ativado apresentou valores médios maiores e diferentes significativamente dos valores médios observados no tratamento não-ativado. Tais resultados são indicativos da ocorrência de degradação dos componentes centesimais do leite não-ativado e demonstram a eficiência do SLP em conservar a qualidade físico-química do leite cru armazenado por períodos de até 120 horas sob temperatura de refrigeração (Figura 2). Nesse sentido, é importante ressaltar que a ativação do SLP não alterou a composição química avaliada nesse terceiro ensaio, e sim possibilitou que a composição química inicial do leite se mantivesse por um maior período de tempo.

A tabela 3 apresenta os resumos das análises de variância para as análises microbiológicas contagem de coliformes totais (ensaios I, II e III) e contagem de microrganismos psicrotóxicos (ensaio III).

Tabela 3. Análises de variância para a contagem de coliformes totais (ensaios I, II e III) e contagem de microrganismos psicrotróficos (ensaio III)

Fonte de Variação	G L	Coliformes Totais (QM) ²	Psicrotróficos (QM) ²
<i>Ensaio I</i>			
Tratamento	1	4,66824673**	-
Tempo	3	1,78053671*	-
Trat*temp ¹	3	0,26875231	-
<i>Ensaio II</i>			
Tratamento	1	0,37264514	-
Tempo	3	1,57393270*	-
Trat*temp ¹	3	0,00407109	-
<i>Ensaio III</i>			
Tratamento	1	3,97440506**	0,29533107*
Tempo	5	1,14320257**	1,15437697**
Trat*temp ¹	5	0,26225173*	0,02082188

¹Trat*Temp = efeito da interação tratamento x tempo

²QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Na análise de variância para coliformes totais houve efeito significativo de tratamento ($P < 0,01$, ensaios I; $P < 0,01$, ensaio III), de tempo de conservação ($P < 0,05$, ensaios I e II; $P < 0,01$, ensaio III) e da interação tratamento x tempo ($P < 0,05$, ensaio III) (tabela 3).

Na análise de variância para a contagem de microrganismos psicrotróficos, realizada no ensaio III, houve efeito significativo das fontes de variação tratamento ($P < 0,05$) e tempo de conservação ($P < 0,01$). Não foi observada influência significativa ($P > 0,05$) da interação tratamento x tempo sobre a quantificação de psicrotróficos (tabela 3).

A figura 3 ilustra o desenvolvimento da população de coliformes em leite cru ativado e não-ativado, armazenado sob temperatura ambiente por períodos de 0, 4, 8 e 12 horas, pós-ativação do SLP, em condições de laboratório (ensaio I) e em condições práticas de campo (ensaio II).

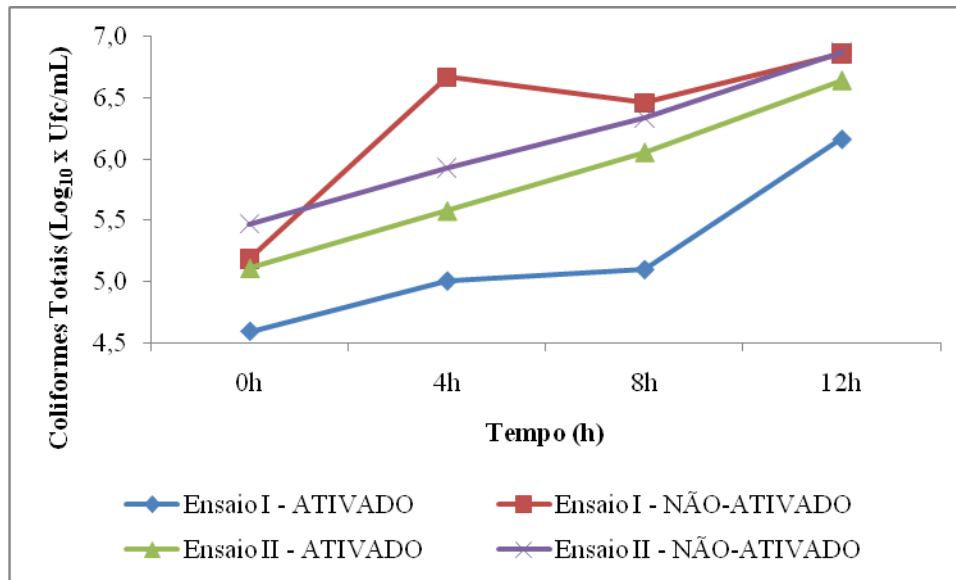


Figura 3. Coliformes totais em leite cru ativado e não-ativado armazenado sob temperatura ambiente por períodos de 0, 4, 8 e 12 horas pós-ativação do SLP em condições de laboratório (ensaio I) e de campo (ensaio II)

De modo geral, observou-se aumento na contagem de coliformes totais à medida que o tempo de conservação do leite se prolongava. No entanto, a ativação do SLP, em condições de laboratório (ensaio I), promoveu um retardo no desenvolvimento da população de coliformes totais, mantendo-a em torno de $5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ ($100 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$) até 8 horas de conservação do leite sob temperatura ambiente, enquanto no tratamento não-ativado a população destes microrganismos ultrapassou o total de $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ ($1000 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$) nas primeiras 4 horas de armazenamento do leite (Figura 3).

Outros estudos também demonstraram que o SLP foi eficiente em manter a qualidade do leite cru por períodos de até 7-8 horas de armazenamento sob temperatura ambiente (HARNULV e KANDASAMY, 1982; PONCE et al., 2005). Resultados como estes são de extrema importância, sobretudo para aquelas situações nas quais o beneficiamento do leite é realizado em

laticínios próximos ao local de obtenção, uma vez que o período de 8 horas representa tempo suficiente para realização da coleta da matéria-prima e seu processamento.

Não foi observado efeito bacteriostático do SLP sobre a população de coliformes quando a ativação foi realizada em condições práticas de campo (ensaio II) (Figura 3). Tal resultado pode ser atribuído à má qualidade inicial do leite utilizado neste ensaio, tanto em termos de acidez e TRAM (Tabela 2), como em relação à contagem de coliformes totais (Figura 3), o que reduziu substancialmente a eficiência do SLP na conservação da matéria-prima.

De acordo com a FAO/WHO (2006) a população destes microrganismos continua aumentando em leite, apresentando alta carga bacteriana inicial ($> 500 \times 10^3$ UFC/mL), independentemente do efeito do SLP. Entretanto, em leite de excelente qualidade (contagens menores que 100×10^3 UFC/mL), os níveis de contaminação inicial se mantêm pelo menos até 8 horas após o processo de ativação do SLP.

Na figura 4 encontram-se representadas as contagens de coliformes totais e de microrganismos psicrotróficos, em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (ensaio III).

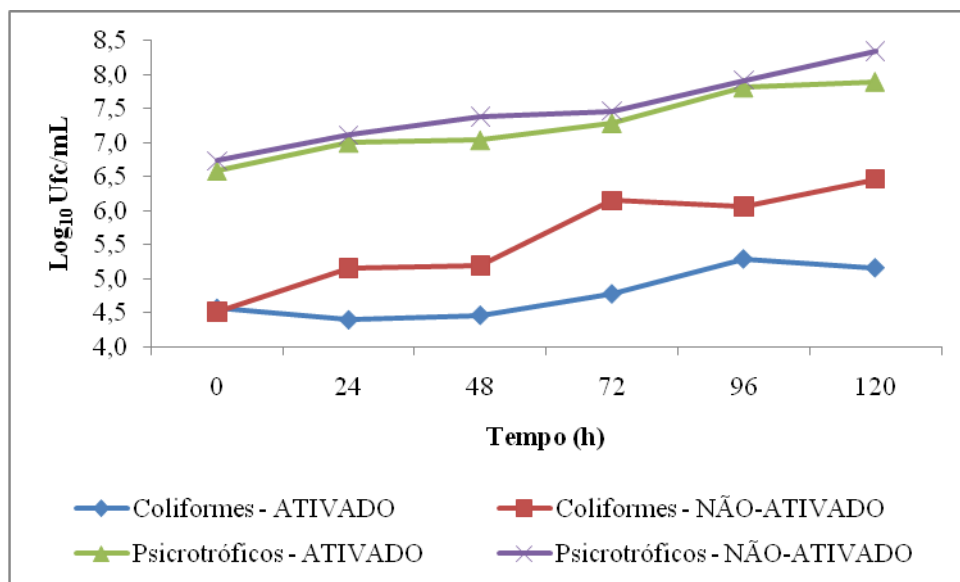


Figura 4. Coliformes totais e de psicrotróficos em leite cru ativado e não-ativado armazenado por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas sob temperatura de refrigeração (4-7°C) (ensaio III)

Com respeito à contagem de coliformes totais em leite refrigerado, a ativação do SLP conseguiu manter a população destes microrganismos abaixo de 5,3 Log₁₀ UFC/mL (200×10^3 UFC/mL) até as 120 horas de conservação. Em contrapartida, no tratamento não-ativado, a contagem de coliformes ultrapassou o valor de 6 Log₁₀ UFC/mL ($> 1000 \times 10^3$ UFC/mL) em 72 horas de conservação. Em termos estatísticos, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre as contagens de coliformes dos tratamentos ativado e não-ativado, nos tempos de 72 e 120 horas de conservação (Figura 4).

Tais resultados apontam a possibilidade de ampliação do período de coleta do leite refrigerado na propriedade rural, bem como a possibilidade de melhorar a qualidade do leite que chega à indústria, mediante a utilização do SLP como método de conservação complementar ao processo de refrigeração. Nesse sentido, de acordo com a FAO/WHO (2006), o SLP tem sido mais eficiente em retardar o processo de deterioração do leite armazenado sob baixas temperaturas, em comparação com o uso exclusivo da refrigeração.

De modo geral, a contagem de bactérias psicrotróficas em leite refrigerado foi menor ($P < 0,05$) no tratamento ativado ($7,26 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$) que no tratamento não-ativado ($7,49 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$). Entretanto, quando foi feita a comparação em função do tempo (interação tratamento x tempo), observa-se que a população destes microrganismos foi bastante elevada inicialmente (0h) e continuou se desenvolvendo de maneira semelhante ($P > 0,05$) nos tratamentos ativado e não-ativado, à medida que o tempo de armazenamento se prolongava (Figura 4).

Tais resultados devem ter sido decorrentes das elevadas contagens iniciais de psicrotróficos no leite avaliado, o que reduziu substancialmente ação bacteriostática/bactericida do SLP sobre a população destes microrganismos. De acordo com Ponce (2001), a ativação do SLP permite manter o leite armazenado sob refrigeração durante um período que oscila entre 48 a 72 horas, sem alterações na contagem total de bactérias psicrotróficas, dependendo da qualidade inicial. O autor chegou à conclusão que quando se trata de leite de alta qualidade, ou seja, quando a contagem de psicrotróficos inicial é inferior a $5 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$, a carga microbiana psicrotrófica inicial pode se manter estável até 72 horas de armazenamento e, até 48 horas, quando o leite apresenta baixa qualidade inicial. Vale ressaltar que, no presente estudo, a contagem de psicrotróficos inicial (0h) foi superior a $1000 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$, tanto no leite não-ativado quanto no ativado.

Um forte efeito do SLP contra bactérias psicrotróficas Gram-negativas também tem sido demonstrado por uma série de estudos específicos (BJORCK, 1978; REITER e HARNULV, 1984; WOLFSON e SUMMER, 1993) indicando possível novo caminho para melhorar o armazenamento de leite cru refrigerado.

De modo geral, a partir dos resultados obtidos no presente estudo verifica-se que tanto o SLP como o processo de refrigeração não elimina e não paralisa totalmente o desenvolvimento

da flora bacteriana presente inicialmente no leite, nem seu processo de deterioração, sendo fundamental tornar a contaminação inicial a menor possível. Portanto, para se garantir a qualidade do leite é extremamente importante que ele seja obtido sob condições higiênico-sanitárias adequadas, a fim de diminuir a contaminação inicial e, desta forma, a utilização de métodos de conservação, tais como a refrigeração e/ou a ativação do SLP, e consiga manter a contagem microbiana em níveis baixos.

4. Conclusões

A ativação do sistema lactoperoxidase (SLP) não altera a concentração dos componentes lácteos gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

Quando utilizado em complementação, a refrigeração o SLP retarda a degradação dos componentes químicos do leite por períodos de até 120 horas.

A ativação do SLP apresenta efeito inibitório sobre o desenvolvimento da população bacteriana presente inicialmente no leite e sobre seu processo de deterioração, permitindo, desse modo, que a conservação da qualidade do leite se mantenha por certo período de tempo, dependendo da qualidade inicial e da temperatura de armazenamento.

O SLP pode ser utilizado como único método de conservação, em situações nas quais não seja possível resfriar o leite na propriedade ou como método complementar ao processo de refrigeração. Neste último caso, a maior relevância de sua utilização está em reduzir ainda mais o desenvolvimento da carga bacteriana inicial, com vistas à obtenção de leite apresentando melhor qualidade, bem como na possibilidade de ampliação no tempo de armazenamento do leite na propriedade rural, com reflexos na otimização do sistema de coleta a granel.

5. Referencias Bibliográficas

- ASAAH, N. O. et al. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. **African Journal Of Food Agriculture Nutrition And Development**, Nairobi, Kenya, v. 2, n. 7, p.1-15, 2007. Disponível em: <<http://www.ajfand.net/Issue13/PDFs/Ndambi-2155.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2009.
- BJORCK, L. et al. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonas and other gram-negative bacteria. **Appl. Microbiol.**, n. 30, p.199-204, 1975.
- BJORCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 45, p.109-118, 1978.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 8-13.
- CAC. *Codex alimentarius*. Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la lactoperoxidasa. CAC/GL. 1991.
- CUBA. Ministerio de La Agricultura. Prueba de reducción de azul de metileno en leche. **NC 78-11-08**. Havana, 1983a.
- CUBA. Ministerio de La Agricultura. Determinación de la acidez en leche. **NC 78-11-01**. Havana, 1983b.
- FAO/WHO. **Beneficios y riesgos potenciales del sistema de la lactoperoxidasa en la conservación de la leche cruda**: informe de la reunión técnica de la FAO/WHO. Roma, 2005. Roma: FAO, 2006. 55 p.
- FIL-IDF. Milk. Enumeration of psychrotrophic microorganisms. Colony count technique at 6,5°C. **FIL-IDF Standard 101A:1991**. 1991. 3p.
- HARNULV, B. G.; KANDASAMY, C. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: results from Sri Lanka. **Milchwiss**, Kiel, n. 37, p.454-457, 1982.
- ISO. Milk and Milk Products. Enumeration of Coliforms. Part 1. Colony Count Technique at 30°C. **ISO 5541/1: 1986**.1986.
- LUDEÑA, F. et al. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de cabra y su conservación mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. **Mosaico Científico**, n. 3, p.17-30, 2006.

- MATHUR, B. N.; CHOPRA, R. Current issues concerning safety of Lp-system for preservation of raw milk. **Ind. Dairyman**, Anand, India, n. 47, p.4-11, 1995.
- ORAM, J. D.; REITER, B. The oxidation of thiocyanate and the nature of inhibitory compound. **Biochemical J.**, n. 100, p.273-386, 1966.
- PONCE, P. et al. Conservación de la leche en Cuba mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. **Rev. Mundial Zootec.**, n. 73, p.31-41, 1992.
- PONCE, P. et al. Factores asociados al contenido de tiocianato en leche cruda. **Rev. Salud Anim.**, Havana, n. 76, p.96-99, 1998.
- PONCE, P. Experiencia nacional e internacional de Cuba en la aplicación del sistema lactoperoxidasa para la conservación de leche cruda. In: GLOBAL LACTOPEROXIDASE PROGRAMME (FAO-GLP) (Cuba). **Tercera Reunión Anual del Grupo de Expertos Lactoperoxidasa**. Havana: FAO, 2001.
- PONCE, P.; LÓPEZ, M. G.; MARTÍNEZ, E. Conservación de leche cruda mediante la activación del sistema Lactoperoxidasa /tiocianato/peróxido de hidrogeno. **Rev. Salud Anim.**, Havana, n. 9, p.120-128, 1987.
- PONCE, P. et al. Evaluation of microbiological and chemical risks of the lactoperoxidase system activation in raw milk. **Reporte Técnico de Vigilancia**, Havana, v. 9, n. 5, p. 1-21, 2005. Disponível em:< http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.htm>. Acesso em maio de 2009.
- REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Prot.**, n. 47, p.724-732, 1984.
- SAS Institute. The SAS System for Windows. Release 9.2. **SAS Institute**. Cary, NC, 2007.
- SHARMA, V.; RAJ, D. Lactoperoxidase system origin, efficacy and its effect on milk constituent: a review. **Indian J. Dairy Bioscience**, n. 10, p.9-13, 1999.
- VANOIRBEECK, S. J. et al. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in Escherichia coli. **Res. Microbiol.**, n. 156, p.225-232, 2005.
- WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **J. Food Prot.**, n. 56, p.887-892, 1993.

CAPÍTULO II

Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru conservado sob diferentes condições de armazenamento no nordeste pernambucano

Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru conservado sob diferentes condições de armazenamento no nordeste brasileiro

Resumo – O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da ativação do sistema lactoperoxidase (SLP) sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru conservado sob diferentes condições de armazenamento. Para tanto, foram realizados quatro ensaios. No primeiro ensaio avaliou-se a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração, por períodos de 4 e 8 horas pós-ativação; no segundo, a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru refrigerado, armazenado por períodos de 4, 8 e 24 horas pós-ativação; no terceiro, a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru refrigerado, na ocorrência da falta de energia elétrica durante o período de armazenamento; e no quarto ensaio, a eficiência do SLP sobre a qualidade do leite cru refrigerado, previamente exposto, por longos períodos, à temperatura ambiente. Para todos os ensaios houve efeito de fazenda ($P < 0,01$) sobre todos os componentes químicos do leite, bem como efeito da interação fazenda x tratamento ($P < 0,05$) sobre a lactose, nos ensaios I e II. Não foi observado efeito de tratamento sobre a composição centesimal do leite como um todo, em nenhum dos quatro ensaios. A fonte de variação fazenda exerceu efeito significativo ($P < 0,01$) sobre a CBT do leite utilizado nos quatro ensaios. O efeito de tratamento foi significativo ($P < 0,01$) sobre a CBT nos ensaios I, III e IV e o efeito da interação fazenda x tratamento exerceu influência sobre a CBT no ensaio IV ($P < 0,01$). Em todos esses casos, a CBT foi menor em leite ativado que em leite não-ativado (controle). Não houve efeito ($P > 0,05$) de tratamento nem da interação fazenda x tratamento sobre a CBT no ensaio II (em leite refrigerado), entretanto os valores de CBT dos tratamentos ativados foram menores que os valores dos tratamentos não-ativados em todos os tempos de conservação. Pode-se concluir que a ativação exógena do SLP não interfere na concentração dos componentes químicos do leite e, de modo geral, exerce efeito inibitório sobre o desenvolvimento da população bacteriana em leite armazenado sob diferentes condições, tempos e temperaturas de conservação.

Palavras-chave: qualidade do leite, métodos de conservação, refrigeração, enzima lactoperoxidase.

Effect of lactoperoxidase system activation on the microbiological quality and physico-chemical raw milk conserved under different storage conditions in Pernambuco, Northeastern Brazil

Abstract - This study was to evaluate, through 3 trials, the efficiency of the lactoperoxidase system (LPS) activation on the microbiological quality and physico-chemical raw milk under different storage conditions. In the first trial evaluated the efficiency of the SLP on the quality of raw milk stored at environmental temperature and under refrigeration for periods of 4 and 8 hours post-activation; in the second, the efficiency of the SLP on the quality of refrigerated raw milk, stored for periods of 4, 8 and 24 hours post-activation; in the third, the efficiency of the SLP on the quality of refrigerated raw milk, in the event of power failure during the storage period, and in the fourth trial, the efficiency of the SLP on the quality of refrigerated raw milk, previously exposed for long periods at environmental temperature. For all trials was observed effect of farm ($P < 0.01$) on all the chemical components of milk and the effect of farm x treatment interaction ($P < 0.05$) on the lactose in the trials I and II. There wasn't observed effect of treatment on the composition of milk as a whole, in any of the four trials. The source of variation farm had a significant effect ($P < 0.01$) on the CBT of the milk used in four trials. The treatment effect was significant ($P < 0.01$) on the CBT in the trials I, III and IV and the treatment x farm interaction have any influence on the CBT in the trial IV ($P < 0.01$). In all these cases CBT was lower in activated milk than in non-activated milk (control). There wasn't observed effect ($P > 0.05$) of treatment and of farm x treatment interaction on the CBT in the trial II, however the values of CBT treatments activated were less than the values of non-activated treatments in all storage times. It can be concluded that the SLP exogenous activation does not interfere with the concentration of the chemical components of milk, and generally has an inhibitory effect on the development of bacterial populations in milk stored under different conditions, times and storage temperatures.

Keywords: milk quality, storage's methods, refrigeration, lactoperoxidase enzyme.

1. Introdução

A qualidade do leite produzido no Brasil, sobretudo a microbiológica, constitui um problema crônico devido ao envolvimento de fatores de ordem social, cultural e econômica. O perfil da produção leiteira do país é caracterizado por baixo desenvolvimento tecnológico e higienização inadequada durante os procedimentos de ordenha, armazenagem e conservação do leite, originando produto de baixa qualidade e de fácil deterioração.

Além da maior conscientização dos produtores quanto à importância das práticas higiênicas de ordenha, a medida que tem causado maior impacto na qualidade do leite produzido ao nível de fazenda e reduzido as perdas da matéria-prima por acidificação tem sido a adoção do resfriamento imediato do leite após a ordenha, regulamentada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em 2002, através da Instrução Normativa N° 51 (BRASIL, 2002).

Com a implantação desta normativa, todo o leite processado em estabelecimentos sob fiscalização federal passou ser refrigerado na propriedade à temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha. Entretanto, deve-se considerar que o resfriamento do leite acima da temperatura de 4°C ou por períodos prolongados de tempo pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicrófilas (Pinto et al., 2004).

Além disso, convém considerar que, na prática, com a existência do transporte do leite em latões das propriedades até os tanques de resfriamento comunitários ou até as plataformas de laticínios, o tempo real gasto para o resfriamento do leite pode exceder o tempo limite estabelecido, o que agrava ainda mais os problemas relacionados ao aumento da carga bacteriana contaminante do leite cru refrigerado. Outros fatores de ordem técnica e/ou econômica

relacionados à disponibilidade e regularidade no fornecimento de energia elétrica em determinadas áreas do país, às possíveis falhas nos equipamentos de resfriamento durante a estocagem do leite, bem como ao baixo poder de investimento da maioria dos pequenos produtores, também podem comprometer a qualidade da matéria-prima.

Tendo em vista as dificuldades encontradas para atender todos os pré-requisitos necessários à refrigeração eficiente do leite (tempo e temperatura adequada, estabilidade da corrente elétrica, manutenção dos equipamentos de resfriamento etc.), torna-se necessária a adoção de novas técnicas de fácil execução, que venham complementar o processo de refrigeração e proporcionar a obtenção de leite e produtos lácteos de melhor qualidade e inócuos à saúde do consumidor.

O sistema lactoperoxidase (SLP) é um mecanismo natural de defesa da glândula mamária de todos os mamíferos, composto pela enzima lactoperoxidase (LP), uma proteína sintetizada na glândula mamária por íons tiocianato (SCN^-), originados do metabolismo hepático, e por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), derivado da atividade dos leucócitos e outras células. A ativação exógena desse sistema no leite gera uma ação do tipo bacteriostática e/ou bactericida, que limita o crescimento da população das bactérias contaminantes e a produção de ácidos, permitindo, com isso, que a qualidade microbiológica e físico-química da matéria-prima se mantenha por maior período de tempo.

Devido às suas propriedades antimicrobianas e por constituir um mecanismo de defesa natural, o SLP tem sido objeto de uma ampla investigação nos últimos 40 anos, sobretudo em países europeus, sendo aprovado como método de conservação do leite cru pelo *Codex Alimentarius*, em 1991 (CAC, 1991). Em contrapartida, poucos estudos e avaliações específicas têm sido realizados em países ou regiões onde o SLP teria maior potencial de aplicação, como o Brasil.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do SLP na conservação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento no nordeste pernambucano.

2. Material e Métodos

Foram realizados quatro ensaios para avaliar a eficiência do SLP na conservação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento. As especificações de cada ensaio encontram-se dispostas na Tabela 1.

Tabela 1. Especificações das condições, tempos e temperaturas de armazenamento do leite por ensaio

Ensaio	Condições de armazenamento	Temperaturas (°C)	Tempos (h)
I	Leite cru refrigerado e não-refrigerado	2-5 e 28-30	4 e 8
II	Leite cru refrigerado	2-5	4, 8 e 24
III	Leite cru refrigerado sob simulação da falta de energia elétrica durante o período de armazenamento	2-5 (Refrigeração) e 28-30 (Ambiente)	8 (4hRef + 4hAmb) ¹ ; 24 (4hRef + 4hAmb + 16hRef) ²
IV	Leite cru refrigerado, previamente exposto por longos períodos a temperatura ambiente	28-30 (Ambiente) e 2-5 (Refrigeração)	8 (4hAmb + 4hRef) ³ ; 24 (4hAmb + 20hRef) ⁴ ; 24 (8hAmb + 16hRef) ⁵

¹Armazenamento durante 4 horas sob refrigeração mais 4 horas sob temperatura ambiente, em simulação a falta de energia elétrica.

²Armazenamento durante 4 horas sob refrigeração mais 4 horas sob temperatura ambiente, em simulação a falta de energia elétrica, e mais 16 horas sob nova refrigeração.

³Armazenamento durante 4 horas sob temperatura ambiente mais 4 horas sob refrigeração, em simulação ao resfriamento tardio do leite.

⁴Armazenamento durante 4 horas sob temperatura ambiente mais 20 horas sob refrigeração, em simulação ao resfriamento tardio do leite.

⁵Armazenamento durante 8 horas sob temperatura ambiente mais 16 horas sob refrigeração, em simulação ao resfriamento tardio do leite.

Para realização desse estudo, amostras de leite foram coletadas de cinco propriedades leiteiras, nos períodos de fevereiro a junho de 2009, sendo três propriedades localizadas na mesorregião do Agreste pernambucano e duas na Zona da Mata pernambucana. Na Zona da Mata, o clima é predominantemente pseudotropical, com fortes chuvas no outono e inverno. Já no Agreste, as condições climáticas são diversificadas por ser uma região de ecótone, apresentando áreas mais úmidas e outras mais secas, onde predomina o clima semi-árido.

Quatro entre as cinco propriedades avaliadas são compostas por rebanhos mestiços Holandês-Zebu, que produzem entre 1000 a 2800kg de leite/dia e, uma delas, contempla um pequeno rebanho puro holandês produzindo diariamente 100kg de leite, em média. De modo geral, os animais são criados em pastagens do gênero *Brachiaria* e suplementados em cochos contendo ração volumosa e concentrada, além de sal mineralizado *ad libitum*. Os alimentos volumosos são comumente compostos por silagem de milho (*Zea* spp.) e de sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e palma forrageira (*Opuntia fícus-indica*). Como alimentos concentrados são usualmente fornecidos os farelos de milho, de trigo (*Triticum* spp.) e de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], como também a raspa da mandioca-brava (*Manihot esculenta*).

Todas as propriedades utilizam ordenha mecânica, tanques de expansão para resfriamento do leite e práticas de higienização nos procedimentos de ordenha, tais como: lavagem dos tetos, pré-dipping, pós-dipping e desprezo dos três primeiros jatos de leite.

Em cada propriedade foram realizadas três coletas para obtenção das distintas amostras

utilizadas nos quatro ensaios. Desse modo, foram totalizadas 15 repetições para cada ensaio (5 propriedades x 3 coletas).

Para ativação do SLP utilizou-se o produto STABILAK[®], um ativador comercial apresentado em doses em pó para 50 litros de leite, distribuídas em dois sachês, sendo um contendo 0,45g de tiocianato de sódio (ativador 1) e outro contendo 1,7g de peróxido de hidrogênio na forma de percarbonato de sódio (ativador 2).

2.1. Coleta do leite e ativação do sistema lactoperoxidase

Em cada coleta foram obtidas inicialmente duas alíquotas de 50 litros de leite, depois de concluída a ordenha, sendo uma das alíquotas identificada como ativada e a outra como não-ativada. À alíquota ativada adicionou-se inicialmente o ativador 1 do SLP, com posterior homogeneização do leite durante 1 minuto. Seguidamente, adicionou-se o ativador 2 e a alíquota de leite foi novamente homogeneizada por mais dois minutos, de acordo com as recomendações do fabricante.

Após ativação do SLP verificou-se a hora de tal ocorrência (hora de ativação) e, posteriormente, as alíquotas foram novamente homogeneizadas para aferição da temperatura e do pH do leite, bem como para a realização do teste do alizarol, o qual permite estimar o pH e auxiliar na diferenciação entre o desequilíbrio salino e a acidez excessiva. Seguidamente foram coletadas vinte amostras de leite de cada alíquota (ativada e não-ativada), cada uma com três réplicas, totalizando 60 amostras de leite ativado e 60 amostras de leite não-ativado. Para tanto, foram utilizados frascos estéreis com capacidade para armazenar 55 mL de leite, previamente identificados.

As amostras coletadas foram submetidas a diferentes condições de armazenamento, de acordo com a identificação contida nos frascos, para posterior utilização nos distintos ensaios.

2.2. Identificação das amostras específicas a cada ensaio

Para identificação das amostras (frascos) e posterior utilização dessas nos distintos ensaios, considerou-se a ativação do SLP (ativado e não-ativado), a temperatura de conservação (ambiente e refrigerado), o tempo de permanência da amostra sob determinada temperatura de conservação (4, 8, 16 e 24 horas) e o tempo total de armazenamento da amostra (4, 8 e 24 horas), desde a ativação do SLP até o momento da análise.

A tabela 2 representa o procedimento de identificação das amostras, bem como indica em quais ensaios tais amostras foram utilizadas.

Tabela 2. Identificação e destino das amostras utilizadas nos quatro ensaios

SLP	T° (ambiente e refrigerado) x tempo (h) de conservação	Tempo de armazenamento (horas pós-ativação)	Ensaio
Ativado ou Não-ativado	Ambiente (4h)	4h	I
	Ambiente (8h)	8h	I
	Refrigeração (4h)	4h	I e II
	Refrigeração (8h)	8h	I e II
	Refrigeração (24h)	24h	II
	Refrigeração (4h) / Ambiente (4h)	8h	III
	Refrigeração (4h) / Ambiente (4h) / Refrigeração (16h)	24h	III
	Ambiente (4h) / Refrigeração (4h)	8h	IV
Ambiente (4h) / Refrigeração (20h)	24h	IV	
Ambiente (8h) / Refrigeração (16h)	24h	IV	

2.3. Acondicionamento e transporte das amostras

Após a coleta, parte das amostras foi acondicionada em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhada ao Laboratório do Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), situado em Recife, no Departamento de Zootecnia da UFRPE. A outra parte foi mantida e transportada até o laboratório de análises sob temperatura ambiente.

Após chegar ao laboratório, foi feita a separação e devido armazenamento das amostras, de acordo com a identificação, para posterior realização das análises.

2.4. Manuseio das amostras

Depois de separadas e armazenadas, as amostras foram manuseadas de maneira distintas, conforme as informações apresentadas em sua identificação, para utilização nos diferentes ensaios.

Para realização do ensaio I, amostras mantidas sob temperatura ambiente (28-30⁰C) e sob temperatura de refrigeração (2-5⁰C) foram analisadas quanto à composição química e a contagem bacteriana total (CBT), 4 e 8 horas depois da ativação do SLP na propriedade.

Para realização do ensaio II, utilizaram-se as análises das amostras refrigeradas realizadas 4, 8 e 24 horas pós-ativação do SLP.

Para realização do ensaio III, amostras de leite cru refrigerado, ativadas e não-ativadas, foram colocadas à temperatura ambiente, depois de armazenadas durante 4 horas sob refrigeração, em simulação a falta de energia elétrica. Seguidamente, após 4 horas de armazenamento sob temperatura ambiente, parte dessas amostras foi submetida às análises de composição química e CBT (8 horas pós-ativação) e a outra parte voltou a ser armazenada por

mais 16 horas sob refrigeração, quando então foram realizadas as referidas análises (24 horas pós-ativação).

Para realização do ensaio IV, amostras de leite, ativadas e não-ativadas, foram submetidas à refrigeração após 4 e 8 horas de armazenamento sob temperatura ambiente, a fim de simular o resfriamento tardio do leite, situação ainda comum em estações de resfriamento de algumas regiões do país que recebem leite transportados em latões, provenientes de pequenas propriedades rurais. Para tanto, parte das amostras que permaneceu 4 horas sob temperatura ambiente foi armazenada por mais 4 horas e outra parte por mais 20 horas sob refrigeração, quando então foram realizadas as análises dos componentes químicos e da CBT, após 8 e 24 horas de conservação pós-ativação, respectivamente. As amostras, inicialmente armazenadas durante 8 horas sob temperatura ambiente, foram posteriormente submetidas a mais 16 horas de armazenamento sob refrigeração, totalizando 24 horas de conservação pós-tratamento, no momento em que foram realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas.

2.5. Análises físico-químicas e microbiológicas

As análises de determinação dos valores percentuais de gordura, proteína bruta, lactose e sólidos totais foram realizadas eletronicamente mediante espectrofotometria por radiação infravermelha pelo equipamento Combi 2300, da Bentley Instruments[®]. Esta técnica consiste na mensuração da absorção de energia mediante comprimentos de ondas selecionados por filtros, os quais passam por um feixe de raio *laser* durante cada ciclo de análise (BENTLEY,1998, IDF, 2000). Para tanto, amostras de leite previamente aquecidas a 40°C em banho-maria e homogeneizadas por inversão do recipiente são aspiradas para o interior do equipamento, onde

recebem a irradiação pelo feixe de luz infravermelha. A diferença de energia absorvida entre as amostras sob análise e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada, sendo transformada em teores dos componentes, de acordo com a curva de calibração (BENTLEY, 1998).

Para as análises de determinação da contagem bacteriana total (CBT) utilizou-se o equipamento Bactocount IBC, da Bentley Instruments[®], o qual emprega a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica consiste na adição de brometo de etídio ao leite para que o DNA e RNA das bactérias sejam corados. O leite com o corante é injetado num capilar acoplado a um sistema óptico, que recebe constantemente, um feixe de laser. Ao passar por este feixe, cada bactéria emite fluorescência, a qual é captada pelo sistema óptico, e, com isso, o número de bactérias é expresso em contagem individual de bactérias (CIB), que posteriormente é convertido em unidades formadoras de colônias (UFC), após transformação estatística automática, baseada em uma curva de calibração previamente elaborada (BENTLEY, 2002).

2.6. Análises estatísticas

Para todos os ensaios foram analisadas as variáveis gordura, proteína, lactose, sólidos totais e a contagem bacteriana total (CBT).

Para as análises estatísticas e apresentação das tabelas e gráficos, os resultados da CBT ($\times 10^3$ Ufc/mL) foram transformados para log base 10 (Log_{10} Ufc/mL), com o objetivo de normalizar a distribuição dos dados.

A significância dos efeitos fixos de fazenda, tratamento e da interação fazenda x tratamento foi determinada por análise de variância e as médias ajustadas foram comparadas pelo Teste de Tukey a 1% e a 5% de significância, através do procedimento GLM do SAS (2007).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x2 para o ensaio I:

$$y_{ijklm} = \mu + F_i + A_j + T_k + P_l + (F.ATP)_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

em que:

μ é a média;

F_i é o efeito da i-ésima fazenda (i = 1, 2, 3, 4 e 5);

A_j é o efeito da j-ésima ativação do sistema lactoperoxidase (j = ativado e não-ativado);

T_k é o efeito da k-ésima temperatura de conservação (k = 28-30°C e 2-5°C);

P_l é o efeito do l-ésimo período de conservação (l = 4 e 8 horas);

$(F.ATP)_{ijkl}$ é o efeito da interação entre fazenda e os fatores ativação do SLP x temperatura x período de conservação;

ε_{ijklm} é o erro aleatório

2x3 para o ensaio II:

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + A_j + P_k + (F.AP)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

P_k é o efeito do k-ésimo período de conservação do leite cru sob refrigeração (k = 4, 8 e 24 horas);

$(F.AP)_{ijk}$ é o efeito da interação entre fazenda e os fatores ativação do SLP x período de conservação do leite cru sob refrigeração;

2x2 para o ensaio III:

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + A_j + S_k + (F.AS)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

S_k é o efeito da k-ésima simulação da falta de energia elétrica durante o armazenamento sob refrigeração (k = Ref-4h/Amb-4h e Ref-4h/Amb-4h/Ref-16);

$(F.AS)_{ijk}$ é o efeito da interação entre fazenda e os fatores ativação do SLP x simulação da falta de energia elétrica durante o armazenamento sob refrigeração;

e 2x3 para o ensaio IV:

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + A_j + S_k + (F.AS)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

S_k é o efeito da k-ésima simulação do período de exposição do leite a temperatura ambiente antes de seu armazenamento sob refrigeração (k = Amb-4h/Ref-4h, Amb-4h/Ref-20 e Amb-8h/Ref-16h);

$(F.AS)_{ijk}$ é o efeito da interação entre fazenda e os fatores ativação do SLP x simulação do período de exposição do leite a temperatura ambiente antes de seu armazenamento sob refrigeração;

3. Resultados e Discussão

As amostras de leite ativado e não-ativado, coletadas das cinco propriedades leiteiras e armazenadas sob diferentes condições envolvendo o binômio tempo x temperatura, deram origem a 4 ensaios comparativos para avaliar a eficiência do sistema lactoperoxidase sob a conservação da matéria-prima.

3.1. Ensaio I: Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração por períodos de 4 e 8 horas pós-ativação.

A tabela 3 apresenta as análises de variância da composição físico-química e da contagem bacteriana total (CBT) do leite proveniente de 5 propriedades, submetido a diferentes

combinações envolvendo a ativação do SLP, a temperatura e o tempo de armazenamento do leite (tratamentos).

Tabela 3. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração, por períodos de 4 e 8 horas pós-ativação

FV	GL	Gordura (QM)¹	Proteína (QM)¹	Lactose (QM)¹	Sólidos totais (QM)¹	CBT (QM)¹
Fazenda	4	5,65524485**	0,80646472**	1,11618280**	3,39255215**	7,62143535**
Tratamento	7	0,01997691	0,01064042	0,01717629	0,01332473	4,04203573**
Fazenda*tratamento	28	0,01232554	0,01017080	0,01779351*	0,03064013	0,19353113

¹QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Na análise de variância para a composição química do leite foi comprovado que, para todos os componentes, houve efeito significativo de fazenda ($P < 0,01$), bem como efeito significativo da interação fazenda x tratamento ($P < 0,05$) sobre o componente lactose. Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) de tratamento sobre a composição centesimal do leite como um todo, demonstrando que a ativação exógena do SLP em leite cru, nas condições de armazenamento (diferentes tempos x temperaturas) avaliadas no presente estudo, não interfere na concentração dos componentes químicos do leite (Tabela 3).

Na análise de variância para a CBT houve efeito significativo ($P < 0,01$) de fazenda e tratamento. Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da interação fazenda x tratamento sobre a CBT (Tabela 3).

O efeito de fazenda sobre os componentes químicos e sobre a CBT indicam a existência de variações na qualidade físico-química e microbiológica do leite obtido das cinco propriedades leiteiras.

A fim de evidenciar o efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento bacteriano a figura 1 ilustra a CBT em leite cru ativado e não ativado, submetido a diferentes combinações de temperatura x tempo de conservação.

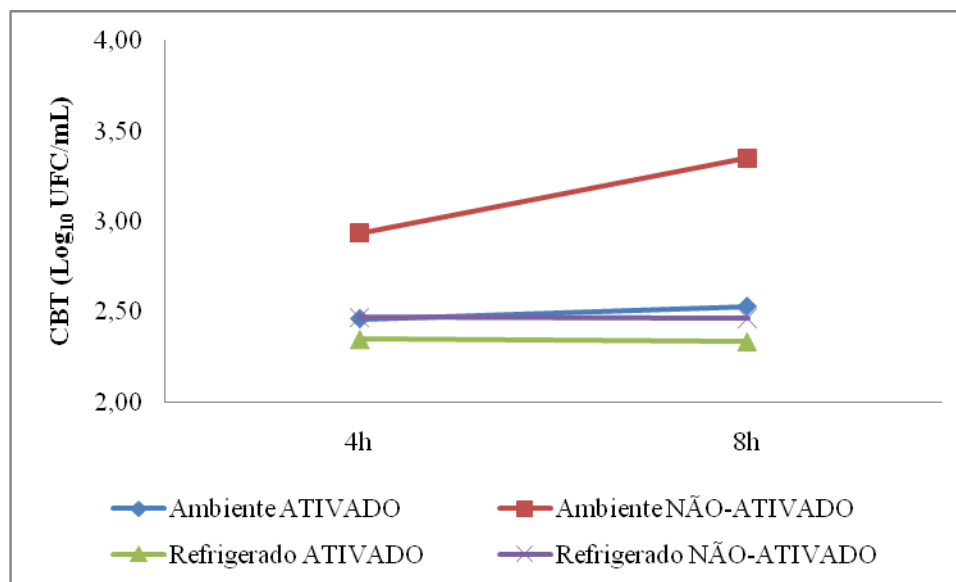


Figura 1. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado sob temperatura ambiente e sob refrigeração por períodos de 4 e 8 horas

A população bacteriana se desenvolveu rapidamente no leite armazenado sem nenhum método de conservação (Ambiente NÃO-ATIVADO), de modo que logo após 4 e 8 horas de armazenamento sob temperatura ambiente o leite não-ativado já apresentava CBT de 2,94 e 3,35 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente. Tais valores se diferenciaram significativamente entre si ($P < 0,01$) e entre os valores de CBT apresentados pelos demais tratamentos ($P < 0,01$) (Figura 1). Em contrapartida, quando ativado, o SLP conseguiu manter a carga bacteriana do leite cru armazenado sob temperatura ambiente (Ambiente ATIVADO) em torno de 2,5 Log₁₀ UFC/mL, semelhantemente ($P > 0,05$) ao que foi conseguido unicamente com a refrigeração (Refrigerado NÃO-ATIVADO), durante 4 e 8 horas de armazenamento (Figura 1).

Tais resultados comprovam que o SLP pode ser utilizado como único método de conservação em situações em que não seja possível refrigerar o leite (ex: falta de corrente elétrica, manutenção do equipamento de resfriamento). Diversos outros estudos apresentam o SLP como método bem sucedido de preservação do leite à temperatura ambiente (PONCE et al., 2005; LUDEÑA 2006; ASAAH, et al., 2007).

Assim como na presente avaliação, Harnulv e Kandasamy (1982) e Ponce et al. (2005) verificaram que a ativação do SLP foi eficiente em manter a qualidade do leite cru até 7-8 horas de armazenamento sob temperatura de 30°C, tempo suficiente para realização da coleta da matéria-prima e o seu processamento.

O processo de refrigeração foi eficiente em retardar o crescimento bacteriano com e sem a ativação do SLP (Refrigerado ATIVADO e NÃO-ATIVADO), de modo que os valores de CBT de ambos os tratamentos se mantiveram constantes após 4 e 8 horas de armazenamento e não apresentaram diferença significativa entre si ($P > 0,05$). Apesar disso, observa-se que a CBT do leite refrigerado ativado foi inferior a CBT dos demais tratamentos. Tal resultado pode ser considerado de extrema importância para a logística da produção e beneficiamento do leite, uma vez que quanto menor a carga bacteriana maior a possibilidade de ampliação do tempo de armazenamento do leite no tanque de resfriamento, com reflexos à otimização do sistema de coleta a granel. Nesse sentido, um forte efeito do SLP contra bactérias psicotróficas Gram-negativas tem sido demonstrado por uma série de estudos específicos (BJORCK, 1978; REITER e HARNULV, 1984; WOLFSON e SUMMER, 1993), indicando possível novo caminho para melhorar o armazenamento leite cru refrigerado. Nos estudos de Ludeña et al. (2006) o SLP aumentou a vida de prateleira do leite cru de cabra durante seu armazenamento sob temperatura

ambiente e sob refrigeração, sendo mais eficaz em leite armazenado sob temperatura de refrigeração.

3.2. Ensaio II: *Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado armazenado por períodos de 4, 8 e 24 horas pós-ativação.*

A tabela 4 apresenta as análises de variância da composição físico-química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru submetido a tratamentos envolvendo a ativação do SLP e diferentes tempos de conservação sob refrigeração a 2-5°C.

Tabela 4. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru refrigerado, ativado e não-ativado, armazenado por períodos de 4, 8 e 24 horas pós-ativação

FV	GL	Gordura (QM)¹	Proteína (QM)¹	Lactose (QM)¹	Sólidos totais (QM)¹	CBT (QM)¹
Fazenda	4	4,37498322**	0,72515434**	0,85030112**	2,77758095**	7,56343170**
Tratamento	5	0,01240055	0,00761920	0,00764252	0,01952288	0,15264994
Fazenda*tratamento	20	0,01037638	0,00668708	0,01350550*	0,02071372	0,05161326

¹QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Na análise de variância para a composição química do leite observa-se que, para todos os componentes, houve efeito significativo de fazenda ($P < 0,01$), bem como efeito significativo da interação fazenda x tratamento ($P < 0,05$) sobre o componente lactose. Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) de tratamento sobre a composição centesimal do leite como um todo, o

que indica que a ativação exógena do SLP em leite cru não altera a composição química centesimal da matéria-prima (Tabela 4).

Na análise de variância para a CBT observa-se efeito significativo de fazenda ($P < 0,01$). As fontes de variação tratamento e interação fazenda x tratamento não exerceram influência significativa ($P > 0,05$) sobre a CBT (Tabela 4).

O efeito de fazenda sobre os componentes químicos e sobre a CBT indicam a existência de variações na qualidade físico-química e microbiológica do leite obtido das cinco propriedades leiteiras.

A figura 2 ilustra a CBT em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4, 8 e 24 horas sob temperatura de refrigeração.

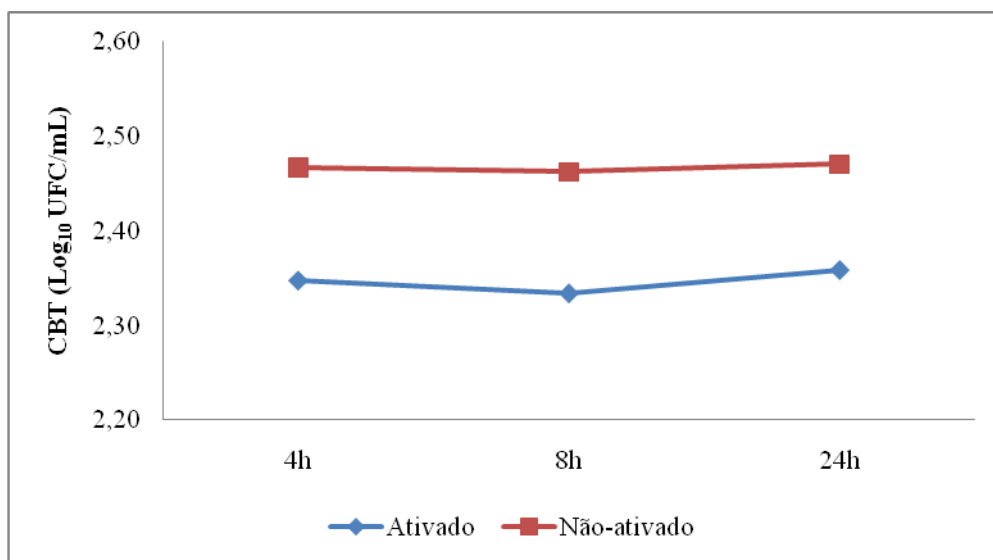


Figura 2. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru refrigerado ativado e não-ativado, conservado por períodos de 4, 8 e 24 horas

Apesar de não ter sido verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos ativado e não-ativado, observa-se que o tratamento ativado apresentou menor CBT em todos os tempos de armazenamento sob refrigeração (4, 8 e 24 horas). Também é possível observar que a

CBT, tanto do tratamento ativado quanto do não-ativado, não se desenvolveu no intervalo de tempo avaliado, o que demonstra a eficiência do processo de refrigeração em retardar o desenvolvimento bacteriano, sendo o SLP complementar ou não (Figura 2).

Tais resultados apontam que tanto a utilização da refrigeração como único método de conservação, como em conjunto com a ativação exógena do SLP, é eficiente em conservar a qualidade microbiológica do leite por pelo menos 24 horas de armazenamento (tempo máximo avaliado no presente estudo). Em contrapartida, uma gama de variações nos tempos de conservação do leite armazenado sob refrigeração, em combinação ou não com a ativação do SLP, tem sido verificada na literatura. De modo geral, os resultados apresentados por estes trabalhos demonstram que a utilização do SLP em complementação ao processo de refrigeração aumenta consideravelmente o tempo de conservação do leite, sobretudo quando este é de boa qualidade.

De acordo com Asaah et al. (2007), o processo de refrigeração pode conservar o leite cru por cerca de dois dias (42-60 horas) e até uma semana (168 horas), quando utilizado em combinação com a ativação do SLP. Entretanto, segundo Ponce (2001), a ativação do SLP permite manter o leite refrigerado armazenado, durante um tempo que oscila de 48 a 72 horas, sem alterações na contagem total de bactérias psicrótrofas, dependendo da sua qualidade inicial. O autor constatou que quando se trata de leite com alta qualidade, ou seja, quando a contagem inicial de psicrótrofos é menor que 5×10^3 Ufc/mL, consegue-se manter a carga microbiana psicrótrofa até 72 horas de armazenamento, e, até 48 horas, quando se trata de leite com má qualidade inicial.

Ludeña et al. (2006), ao avaliarem a eficiência do SLP na conservação da qualidade do leite cru de cabra, observaram tempos máximos de conservação do leite tipo A armazenado sob

temperatura refrigeração de 85 h e 39 min para o tratamento ativado e de apenas 29 h e 50 min para o não-ativado. Em leite tipo B, devido à elevada contagem inicial de coliformes totais apresentada logo no início da avaliação, o tempo de conservação do tratamento não-ativado foi de 0 h e, no tratamento ativado, devido ao forte efeito bactericida apresentado pelo SLP, obteve-se um tempo de conservação de 54 h e 22 min.

3.3. Ensaio III: Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado sob simulação da falta de energia elétrica.

A tabela 5 apresenta as análises de variância da composição físico-química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru submetido a diferentes combinações envolvendo a ativação do SLP e alterações na temperatura de conservação durante o período de armazenamento. Tais alterações foram feitas a fim de simular a falta de energia elétrica durante o período de armazenamento sob refrigeração.

Tabela 5. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 8 e 24 horas em situações que simulam a falta de corrente elétrica

FV	GL	Gordura (QM) ¹	Proteína (QM) ¹	Lactose (QM) ¹	Sólidos totais (QM) ¹	CBT (QM) ¹
Fazenda	4	2,67435576**	0,45835939**	0,58924189**	1,62620945**	5,80264066**
Tratamento	3	0,00109665	0,00963708	0,01272027	0,00279469	1,76385782**
Fazenda*tratamento	12	0,00642203	0,00901209	0,01273869	0,02161460	0,08529507

¹QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Na análise de variância da composição química apenas o efeito de fazenda exerceu influência significativa sob os componentes centesimais do leite ($P < 0,01$) (Tabela 5).

Na análise de variância da contagem bacteriana total (CBT) houve efeito significativo de fazenda ($P < 0,01$) e tratamento ($P < 0,01$). Não houve efeito significativo da interação fazenda x tratamento ($P > 0,05$) sobre a CBT (Tabela 5).

O efeito de fazenda sobre os componentes químicos e sobre a CBT indicam a existência de variações na qualidade do leite obtido nas cinco propriedades.

A figura 3 apresenta a CBT em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob temperatura de refrigeração e por mais 4 horas sob temperatura ambiente, bem como a CBT em leite cru ativado e não-ativado sob o mesmo tratamento, seguido de uma nova refrigeração por mais 16 horas. Tais situações representam simulações da falta de energia elétrica durante o armazenamento do leite na propriedade.

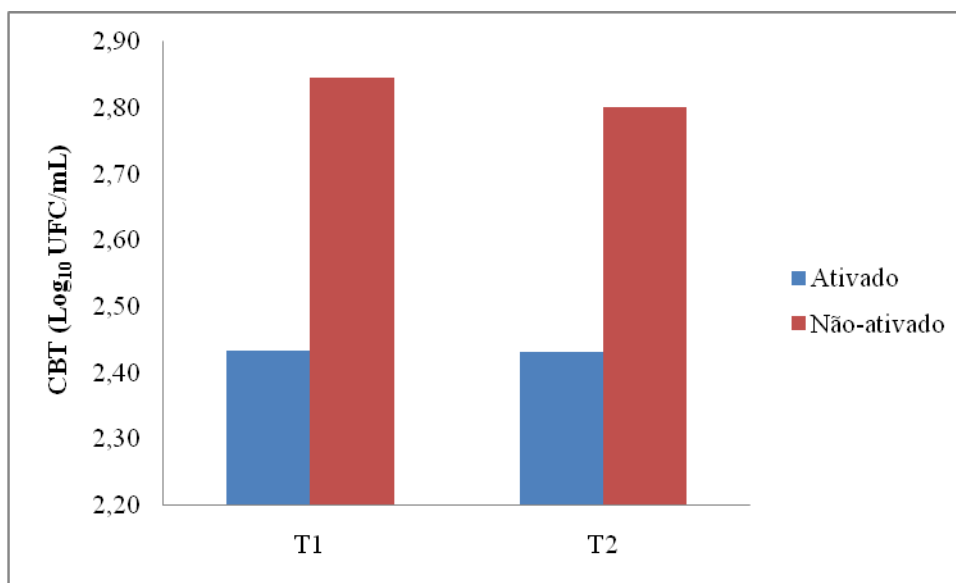


Figura 3. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob refrigeração e por mais 4 horas sob temperatura ambiente (T1) e em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob refrigeração, por mais 4 horas sob temperatura ambiente e novamente sob refrigeração por mais 16 horas (T2)

Observa-se que a ativação do SLP propiciou a manutenção da carga bacteriana abaixo de $2,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$, mesmo após a suspensão da refrigeração durante as últimas de 4 horas de armazenamento (T1 - Ativado), bem como após a suspensão da refrigeração durante 4 horas de armazenamento, seguida de uma nova refrigeração do leite por mais 16 horas (T2 - Ativado). Em contrapartida, nessas mesmas condições de armazenamento, a carga bacteriana dos tratamentos não-ativados se desenvolveu consideravelmente, apresentando valores de CBT superiores e diferentes estatisticamente dos valores observados nos tratamentos ativados (Figura 3).

Tais resultados demonstram a eficiência do SLP em manter a qualidade microbiológica do leite cru frente à ocorrência de aumento na temperatura de conservação durante o período armazenamento sob refrigeração. Desse modo, considerando que grande parte das propriedades leiteiras é deficiente em termos de infraestrutura de rede e qualidade de energia elétrica, a ativação do SLP em complementação ao processo de refrigeração seria uma boa alternativa para reduzir problemas que resultam em penalizações e prejuízos financeiros ao produtor, tais como redução da qualidade e perda total do leite armazenado no tanque de resfriamento.

3.4. Ensaio IV: *Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado, com exposição prévia a temperatura ambiente.*

A tabela 6 apresenta as análises de variância da composição físico-química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por diferentes períodos sob refrigeração, após permanência prévia sob temperatura ambiente, por períodos de 4 e 8 horas.

Tabela 6. Análises de variância da composição química e da contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, tardiamente refrigerado

FV	GL	Gordura (QM)¹	Proteína (QM)¹	Lactose (QM)¹	Sólidos totais (QM)¹	CBT (QM)¹
Fazenda	4	4,37407589**	0,58755704**	0,86657660**	5,83395791**	6,08936969**
Tratamento	5	0,00227292	0,01316169	0,02210720	0,00764348	2,68202523**
Fazenda*tratamento	20	0,00506243	0,00793083	0,01038582	0,02165336	0,19191543**

¹QM (Quadrado Médio) seguido de um ou de dois asteriscos (* ou **) indica efeito significativo a 5 ou a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente

Na análise de variância da composição química apenas o efeito de fazenda exerceu influência significativa sobre os componentes centesimais do leite ($P < 0,01$) (Tabela 6).

Na análise de variância da contagem bacteriana total (CBT) houve efeito significativo de fazenda ($P < 0,01$), tratamento ($P < 0,01$), bem como da interação fazenda x tratamento ($P < 0,01$) (Tabela 6).

O efeito de fazenda sobre os componentes químicos e sobre a CBT indicam a existência de variações na qualidade físico-química e microbiológica do leite obtido das cinco propriedades leiteiras.

A fim de melhor visualizar o comportamento da carga bacteriana presente no leite ativado e não-ativado nas diferentes condições de armazenamento avaliadas, a figura 4 ilustra a CBT nos tratamentos: leite cru ativado e não-ativado armazenado por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 4 horas sob refrigeração (T1); leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 20 sob refrigeração (T2), e em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 8 horas sob temperatura ambiente e por 16 horas sob refrigeração (T3).

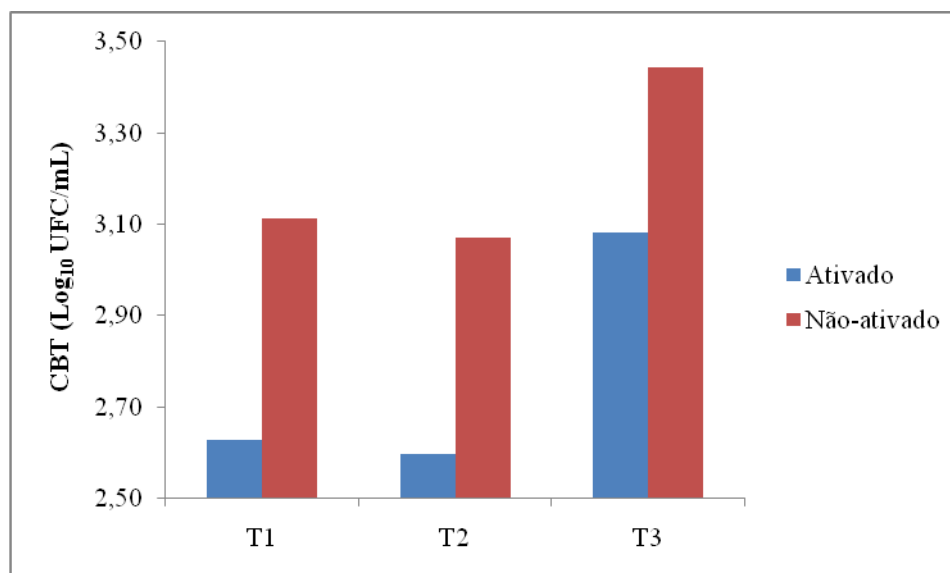


Figura 4. Contagem bacteriana total (CBT) em leite cru ativado e não-ativado, armazenado por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 4 horas sob refrigeração (T1); por 4 horas sob temperatura ambiente e por mais 20 sob refrigeração (T2); por 8 horas sob temperatura ambiente e por 16 horas sob refrigeração (T3)

Comparando-se os tratamentos ativados com os não-ativados, verifica-se que a ativação do SLP foi eficiente em retardar o desenvolvimento bacteriano apresentando valores de CBT baixos (em torno de 2,6 Log₁₀ UFC/mL) e diferentes estatisticamente ($P < 0,01$) dos valores apresentados pelos tratamentos não-ativados (em torno de 3 Log₁₀ UFC/mL) nas situações em que o leite ficou exposto à temperatura ambiente durante 4 horas, antes de ser armazenado sob refrigeração por mais 4 (T1) e 20 horas (T2) (Figura 4). Quando o leite ficou exposto à temperatura ambiente durante 8 horas, antes de ser armazenado sob refrigeração por mais 16 horas (T3), a CBT também foi significativamente menor ($P < 0,01$) no tratamento ativado quando comparado com o tratamento não-ativado sob as mesmas condições de armazenamento. Entretanto, devido ao longo período de exposição do leite à temperatura ambiente (8 horas) antes da refrigeração, o valor da CBT do tratamento ativado foi semelhante ao elevado valor obtido do tratamento não-

ativado nas situações em que o leite ficou exposto a temperatura ambiente durante 4 horas, antes do armazenamento sob temperatura de refrigeração (T1 e T2).

O processo de refrigeração é utilizado como método principal para manter a qualidade inicial do leite logo após sua obtenção. O não-resfriamento imediato do leite na propriedade pode acarretar uma série de problemas relacionados ao rápido desenvolvimento de bactérias oriundas da contaminação inicial, o qual é potencializado pelos períodos de exposição da matéria-prima a elevadas temperaturas ambientais.

Os resultados verificados nesse último ensaio apontam a eficiência do SLP em manter a qualidade do leite exposto à temperatura ambiente, por períodos de até 4 horas (T1 e T2), antes do armazenamento sob refrigeração, e apresentam relevada importância prática, uma vez que grande parte dos produtores leiteiros brasileiros utiliza tanques de expansão comunitários como alternativa para refrigerar o leite produzido. A ativação do SLP em situações como estas possibilitaria melhores condições de conservação do leite durante seu transporte da propriedade até os pontos de coleta, com garantias a qualidade microbiológica, desde que o tempo de transporte não ultrapasse o período de 4 horas.

4. Conclusões

A ativação do sistema lactoperoxidase (SLP) não altera a concentração dos componentes lácteos gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

O sistema lactoperoxidase possui efeito inibitório sobre o desenvolvimento da população bacteriana em leite cru armazenado sob temperatura ambiente.

A ativação do SLP permite conservar a qualidade inicial do leite cru por pelo menos 8 horas de armazenamento sob temperatura ambiente e 24 horas sob temperatura de refrigeração (tempos máximos avaliados no presente estudo).

O SLP retarda o desenvolvimento bacteriano em leite tardiamente refrigerado, bem como em leite submetido à elevação da temperatura durante o armazenamento sob refrigeração.

Com base nas conclusões apresentadas, a importância do SLP consiste principalmente na possibilidade de sua utilização como método complementar ao processo de refrigeração, sobretudo em situações emergenciais nas quais o leite necessite ficar exposto a temperaturas ambientais por períodos consideráveis de tempo, antes de seu armazenamento sob refrigeração (ex.: transporte até o ponto de coleta), como também em situações de interrupção da energia elétrica ou falhas nos equipamentos de resfriamento durante o período de armazenamento da matéria-prima.

5. Referências Bibliográficas

- ASAAH, N. O. et al. Activation of the lactoperoxidase system as a method of preserving raw milk in areas without cooling facilities. **African Journal Of Food Agriculture Nutrition And Development**, Nairobi, Kenya, v. 2, n. 7, p.1-15, 2007. Disponível em: <<http://www.ajfand.net/Issue13/PDFs/Ndambi-2155.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2009.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bentley 2000 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.
- BJORCK, L. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. **J. Dairy Res.**, Cambridge, Uk, n. 45, p.109-118, 1978.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 8-13.
- CAC. *Codex alimentarius*. Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la lactoperoxidasa. CAC/GL. 1991.
- HARNULV, B. G.; KANDASAMY, C. Increasing the keeping quality of milk by activation of its lactoperoxidase system: results from Sri Lanka. **Milchwiss**, Kiel, n. 37, p.454-457, 1982.
- LUDEÑA, F. et al. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de cabra y su conservación mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. **Mosaico Científico**, n. 3, p.17-30, 2006.
- ORAM, J. D.; REITER, B. The oxidation of thiocyanate and the nature of inhibitory compound. **Biochemical J.**, n. 100, p.273-386, 1966.
- PONCE, P. et al. Evaluación de riesgos microbiológicos y químicos de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda. **Reporte Técnico de Vigilancia**, Havana, v. 9, n. 5, p.1-21, 2005. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/uats/rtv_files/2005/rtv0505.htm>. Acesso em: 28 nov. 2009.
- PONCE, P. Experiencia nacional e internacional de Cuba en la aplicación del sistema lactoperoxidasa para la conservación de leche cruda. In: GLOBAL LACTOPEROXIDASE

- PROGRAMA (FAO-GLP) (Cuba). **Tercera Reunión Anual del Grupo de Expertos Lactoperoxidasa**. Havana: Fao, 2001.
- REITER, B.; HARNULV, G. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. **J. Food Prot.**, n. 47, p.724-732, 1984.
- SHARMA, V.; RAJ, D. Lactoperoxidase system origin, efficacy and its effect on milk constituent: a review. **Indian J. Dairy Bioscience**, n. 10, p.9-13, 1999.
- VANOIRBEECK, S. J. et al. Unique stress response to the lactoperoxidase-thiocyanate enzyme system in Escherichia coli. **Res. Microbiol.**, n. 156, p.225-232, 2005.
- WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system: a review. **J. Food Prot.**, n. 56, p.887-892, 1993.