



Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Campus RJ

Cíntia Aparecida Costa Rabêlo

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE LEITE ORGÂNICO E DERIVADOS COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

Rio de Janeiro

2017

Cíntia Aparecida Costa Rabêlo

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS GRAM-NEGATIVAS
ISOLADAS DE LEITE ORGÂNICO E DERIVADOS COMERCIALIZADOS NO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de mestre em Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Emanuel de Oliveira Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes Cruz

Rio de Janeiro - RJ

2017

Cíntia Aparecida Costa Rabêlo

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS GRAM-NEGATIVAS
ISOLADAS DE LEITE ORGÂNICO E DERIVADOS COMERCIALIZADOS NO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção de título de mestre em Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Data de aprovação:

Prof. Dr. Leonardo Emanuel de Oliveira Costa

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Thais Souza Silveira Majerowicz

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Barbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro - RJ

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força e pela oportunidade.

Aos meus pais, minha irmã e minha família pelo apoio e pela compreensão.

Aos professores do IFRJ pelas contínuas instruções e orientações.

Aos colegas de turma que trabalharam comigo no laboratório compartilhando momentos, experiências e carinho.

Aos técnicos e monitores do laboratório por todo carinho e atenção, sem eles eu não teria conseguido.

Ao IFRJ por fazer todo esse sonho possível.

RABELO, C. A. C. *Caracterização de bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de leite orgânico e derivados comercializados no município do Rio de Janeiro*. 62p. Dissertação. Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus RJ, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

RESUMO

A tendência da população de ter uma alimentação mais saudável está levando ao aumento da procura por alimentos orgânicos, que além de nutritivos minimizam o uso de substâncias químicas prejudiciais a saúde. Dentre os orgânicos destacam-se o leite e derivados que são largamente apreciados pela população e os produzidos na modalidade orgânica abstêm-se de antibióticos e medicamentos veterinários tornando-os ainda mais atrativos. Produtos lácteos são altamente perecíveis e necessitam de refrigeração para seu armazenamento e transporte. Diante desta necessidade eles se tornam alvos das bactérias psicrotróficas que sobrevivem e se multiplicam bem em temperaturas entre 0 a 7°C. As bactérias psicrotróficas produzem enzimas deterioradoras que agem nos constituintes dos alimentos alterando sua textura, cor, sabor e odor, levando sua rejeição pelos consumidores e pela indústria de alimentos. Muitas psicrotróficas também são capazes de produzir biofilmes, uma matriz extracelular protetora, que dificulta a eliminação das bactérias das superfícies além de protegê-las da ação de antibióticos e sanitizantes. Neste trabalho analisamos a qualidade microbiológica de leites e derivados orgânicos quanto à presença de bactérias psicrotróficas e também avaliamos o perfil de ácidos graxos dos produtos elucidando um pouco mais sobre questões nutricionais dos orgânicos. Foram analisadas vinte e sete amostras sendo nove de leite, nove de iogurte e nove de queijo minas. O perfil de ácidos graxos foi avaliado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Basicamente ácidos graxos saturados foram encontrados nas amostras não havendo presença significativa de ácidos graxos monoinsaturados e ausência de ácidos graxos poliinsaturados. O único ácido graxo de cadeia curta encontrado foi o butírico. A degradação lipolítica por psicrotróficas acarreta na liberação destes ácidos que alteram odores e sabores dos produtos. Vinte amostras (74,07%) apresentaram crescimento de microrganismos psicrotróficos sendo cinco (18,51%) de leite, nove (33,33%) de queijo minas e seis (22,22%) de iogurte. O crescimento microbiano variou de $(5,6 \times 10^5$ a $3,5 \times 10^6)$, $(2,5 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^6)$ e $(3,1 \times 10^3$ a $4,1 \times 10^4)$ nas amostras de leite, queijo e iogurte respectivamente. Das amostras analisadas sete (25,92%) apresentaram crescimento microbiano acima de 6 log UFC/, caga microbiana onde pesquisas consideram que psicrotróficas podem produzir as enzimas. Foram isoladas e purificadas 5% do total de colônias dos microrganismos psicrotróficos e obtidos 210 isolados dos quais 99 (47,14%) eram de bactérias Gram-negativas. Destes isolados Gram-negativos 39,39% pertencem ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e 23,23%, 10,10% e 6,06% pertencendo respectivamente às espécies *Burkoderia pseudomallei*, *Halfnia alvei* e *Pseudomonas aeruginosa*. Quanto à capacidade de produção de enzimas deterioradoras, 36,36% do total de isolados foram produtores de protease, 41,41% produtores de lecitinase e apenas 4,04% de lipase. Foi analisada a capacidade de produção de biofilmes pelos isolados e 24,24% deles se mostraram não produtores, 44,44% fracamente produtores, 28,28% moderadamente produtores e apenas 3,03% fortemente produtores de biofilme. Consideração que muitas psicrotróficas avaliadas apresentaram habilidade de produzir enzimas deterioradoras e formar

biofilmes torna-se necessário evitar sua presença e multiplicação em leites e derivados orgânicos através das boas práticas de fabricação assegurando assim sua qualidade e segurança.

Palavras-chave: Psicotróficas. Leite e derivados. Orgânicos. Enzimas. Biofilme.

RABELO, C. A. C. *Caracterização de bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de leite orgânico e derivados comercializados no município do Rio de Janeiro*. 62p. Dissertação. Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus RJ, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

ABSTRACT

The actual population tendency to have a healthier diet increased the demand of organic foods, that besides being nutritious minimize the use of harmful substances to health. Among organic products, milk and its derivatives are widely appreciated by the population and those produced in the organic modality avoid residues of antibiotics and veterinary drugs, what makes them even more attractive. Dairy products are highly perishable and needs adequate refrigeration in storage and transportation. Because of this necessity they become target of psychrotrophic bacteria that survive and multiply well in temperatures between 0 and 7°C. Psychrotrophic bacteria produce deteriorating enzymes that acts on food constituents altering their texture, color, taste and odor, causing rejection of these products by consumers and also by the dairy industry. Many psychrotrophic are also capable to produce biofilms, a protector extracellular matrix that make it difficult to remove bacteria from surfaces and protect them from antibiotics and sanitizers. In this work we analyzed the microbiological quality of organic milk and derivatives related with the presence of psychrotrophic bacteria and also evaluated the fatty acids profile of the products elucidating a little more about the nutritional facts of organics. Twenty-seven samples were analyzed, being nine of milk, nine yoghurt and nine fresh cheese. The fatty acid profile was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Basically saturated fatty acids were found with no significant presence of monounsaturated fatty acids and absence of polyunsaturated fatty acids. The only short chain fatty acid found was the butyric. The lipolytic degradation caused by psychrotrophs leads to the release of these acids that alter odors and flavors in the products. Twenty samples (74,07%) presented growth of psychrotrophic bacteria, five (18,51%) in milk, nine (33,33%) in cheese and six (22,22%) in yoghurt. The microbial growth varied from ($5,6 \times 10^5$ to $3,5 \times 10^6$), ($2,5 \times 10^4$ to $3,0 \times 10^6$) and ($3,1 \times 10^3$ to $4,1 \times 10^4$) in milk, cheese and yogurt respectively. From the total analyzed samples seven (25,92%) presented microbial growth above 6 log CFU/mL, amount of microorganisms that studies have considered that the psychrotrophic can produce deteriorating enzymes. We isolated and purified 5% of the colonies of psychrotrophic microorganisms and obtained 210 isolates of which 99 (47,14%) were Gram-negative bacteria. Among these Gram-negative isolates 39,39% belonged to the *Acinetobacter baumannii* /*calcoaceticus* complex and 23,23%, 10,10% and 6,06% belonging respectively to the species *Burkoderia pseudomallei*, *Halfnia alvei* and *Pseudomonas aeruginosa*. The capacity of producing deteriorating enzymes by these bacteria was evaluated. Of the total isolates, 36,36% were protease producers, 41,41% lecithinase producers and only 4,04% lipase producers. The biofilm production capacity of the isolates was analyzed and 24,24% of isolates were non-producers, 44,44% were weak producers, 28,28% were moderately producers and only 3,03% were strong producers. Considering the quantity of psychrotrophs that were capable to produce deteriorating enzymes and also biofilms, it is necessary to avoid the presence and multiplication of these microorganisms in organic milk and derivatives through good manufacturing practices, ensuring their quality and safety.

Keywords: Psychrotrophic. Milk and derivatives. Organic. Enzymes. Biofilm.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 LEITES ORGÂNICOS	12
2.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE	13
2.3 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS	14
2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO IOGURTE	15
2.5 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS EM LEITE E DERIVADOS	15
2.6 ENZIMAS DETERIORADORAS	18
2.7 FORMAÇÃO DE BIOFILMES	19
2.8 QUALIDADE NUTRICIONAL DE LEITES E DERIVADOS ORGÂNICOS	20
2.8.1 Perfil de ácidos graxos de leite e derivados orgânicos	21
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS	24
5.2 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS	24
5.3 OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS PARA IDENTIFICAÇÃO	25
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	25
5.5 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	25
5.6 DETECÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	26
5.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS	29
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS	31
6.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	33
6.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	36
6.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS	38
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	42
ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

A população, mais consciente da essencialidade de uma alimentação nutritiva e equilibrada para se ter uma vida saudável, está cada vez mais interessada e voltada a consumir alimentos naturais, seguros do ponto de vista microbiológico e com concentrações mínimas de substâncias químicas que podem ser prejudiciais à saúde. Devido a esta nova tendência houve um aumento do consumo de alimentos orgânicos que dentre outras características minimizam a utilização de produtos químicos como conservantes, aditivos, agrotóxicos e antibióticos (BRASIL, 2014). Os consumidores priorizam estes alimentos porque acreditam que são mais nutritivos que os convencionais, possuem sabor mais pronunciado, são mais seguros, apresentam mais benefícios a saúde e tem melhor qualidade. O consumo de orgânicos também é fortemente motivado por questões filosóficas como a preocupação com o meio ambiente, com o bem estar dos animais e com a sustentabilidade (LIAN *et al.*, 2016; BRASIL, 2003). Alguns fatores ainda limitam o consumo de orgânicos como preços elevados, pouca disponibilidade no mercado e falta de variedade (BARBOSA *et al.* 2011).

A certificação é uma ferramenta que garante aos consumidores que os produtos são realmente elaborados de acordo com as normas e preceitos legais. Segundo a lei nº10.831 de 23 de dezembro de 2003 os alimentos orgânicos necessitam ser certificados por organismos reconhecidos para poderem ser comercializados, salvo os distribuídos por venda direta aos consumidores, produzidos por agricultores familiares previamente cadastrados juntos ao órgão fiscalizador, onde nestes casos a certificação é facultativa (BRASIL, 2003).

Dentre os alimentos, destacamos o leite e seus derivados. O leite é um alimento amplamente consumido por adultos e principalmente por crianças por ser uma boa fonte de proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais (SALVADOR *et al.*, 2012). Queijos e iogurtes são largamente apreciados e consumidos pela população por suas propriedades nutricionais. Leites e conseqüentemente seus derivados pertencentes à modalidade orgânica contêm seus benefícios nutricionais já bem conhecidos e são elaborados no manejo orgânico que suprime o uso de substâncias químicas (GARCIA, COUTO, FERREIRA, 2014). Os produtos são obtidos de animais bem tratados, que ingerem alimentos autorizados e que fazem uso somente de substâncias permitidas para o tratamento e prevenção de enfermidades, inibindo a utilização de quimiossintéticos artificiais (BRASIL, 2014).

Porém, justamente por sua composição nutricional leites e derivados tradicionais e orgânicos, são um meio de crescimento e desenvolvimento de inúmeras bactérias. Estas podem provocar doenças no consumidor ou serem decompositoras do alimento prejudicando suas características organolépticas (MENEZES *et al.*, 2014). As fontes de bactérias no leite cru são muitas como equipamentos de ordenha, úbere, ar, água, capim, ração, fezes e solo (MACHADO *et al.*, 2017). Por determinação da Instrução Normativa n° 62, de 29 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tornou-se obrigatória a refrigeração do leite a 4°C após a ordenha com o intuito de melhorar a qualidade do leite brasileiro (BRASIL, 2011). A refrigeração evita a multiplicação rápida de bactérias mesófilas que degradam e acidificam o produto. Além disto, muitas bactérias mesófilas são patógenos alimentares (FRANCO e LANDGRAF, 1996). No entanto, a utilização da refrigeração no transporte e acondicionamento do leite até seu beneficiamento favoreceu a disseminação de bactérias psicrófilas em detrimento das mesófilas, que por esta razão deixaram de ser os principais deterioradores do produto (MACHADO *et al.*, 2017; PINTO, MARTINS, VANETTI, 2006).

Bactérias mesófilas conseguem de desenvolver em temperaturas entre 20°C e 40°C enquanto as psicrófilas entre 0 e 7°C, temperaturas de refrigeração (EMBRAPA, 2017). Normalmente ocorre abuso nas temperaturas de refrigeração do leite nas propriedades leiteiras, que ficam entre 5 e 10°C, o que contribui ainda mais para o desenvolvimento das psicrófilas (SANTOS, 2001).

Então as bactérias psicrófilas ganharam destaque e se tornaram uma preocupação para a indústria leiteira uma vez que produzem enzimas termorresistentes deterioradoras como proteases, lipases e lecitinases que degradam os constituintes do alimento produzindo efeitos indesejáveis como alteração em sua textura, cor, sabor e odor (MACHADO *et al.*, 2017, ARCURI *et al.*, 2008). As alterações causadas por estas enzimas levam a rejeição do leite pelo consumidor e impossibilitam seu uso pela indústria de laticínios gerando perdas econômicas para produtores e comercializadores. As bactérias são facilmente destruídas durante o processamento, mas suas enzimas são termorresistentes e podem permanecer nos produtos lácteos alterando suas características sensoriais e reduzindo seus prazos de validade (MACHADO *et al.*, 2017; VITHANAGE *et al.*, 2014). Outro fato importante é que muitas bactérias psicrófilas são formadoras de biofilme, uma matriz extracelular que dificulta a eliminação das bactérias das superfícies de equipamentos e utensílios além de protegê-las da ação de agentes sanitizantes, tornando-as mais resistentes. Os biofilmes podem abrigar

diversos microrganismos deterioradores e causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTA's). São comumente formados nas reentrâncias de equipamentos e utensílios, podendo contaminar ou re-contaminar os alimentos comprometendo assim sua qualidade tecnológica e segurança. São por isso vistos como um problema relevante na indústria de alimentos (COUGHLAN *et. al.*, 2016).

A contaminação por estas bactérias psicrotróficas pode ocorrer em todas as etapas do processamento, desde a ordenha até a distribuição (VISSERS, DRIEHUIS, 2009). Normalmente sua presença no produto final se dá pelo processamento térmico ineficiente ou contaminação após o processamento.

Devido da pouca disponibilidade de dados sobre a composição nutricional dos produtos lácteos orgânicos, caracterizamos também o perfil de ácidos graxos das amostras e comparamos os achados com outros estudos feitos com leite orgânico. No entanto é importante considerar que a composição de nutrientes como estes no leite e conseqüentemente em seus derivados é influenciada entre outros fatores pela alimentação oferecida aos animais, pelo sistema de produção e pelas condições climáticas e geográficas de onde os rebanhos são criados (VARGAS *et al.*, 2016). Do ponto de vista microbiológico, a ação da enzima lipase produzida pelas bactérias psicrotróficas sobre os triglicerídeos do leite levam a liberação de ácidos graxos de cadeia curta e causam as primeiras alterações nos sabores e odores dos produtos (DE JONGHE *et al.*, 2011; DEETH, 2006; MA *et al.*, 2000).

Observados os aspectos acima, para a obtenção de laticínios orgânicos nutritivos, de boa qualidade sensorial e com aspectos microbiológicos adequados a produção do leite e de dos derivados deve adotar manejos adequados, com dietas balanceadas e seguir rigorosamente as boas práticas de fabricação, obedecendo normas de higiene e respeitando os binômios de tempo e temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITES ORGÂNICOS

O aumento da preocupação dos consumidores com a segurança alimentar e com o meio ambiente acarretou em mudanças importantes no setor agrícola e alimentar (BARBOSA *et al.* 2011). A população está mais interessada em consumir alimentos naturais, benéficos à saúde, com boa composição de nutrientes e ausência de contaminação com produtos químicos e agrotóxicos (FERNANDEZ, 2010).

Percebe-se o crescimento mundial no consumo de alimentos naturais, orgânicos, pois estes alimentos se tornaram sinônimo de preocupação com a saúde, com o corpo e com o meio ambiente (MONTEIRO *et al.* 2004). Este aumento de consumo está fortemente associado à percepção dos consumidores de que este tipo de alimento é mais benéfico à saúde, nutritivo e tem melhor qualidade (LIAN *et al.*, 2016). Os alimentos orgânicos são aqueles obtidos de sistemas orgânicos de produção, que dentre outras características, otimizam o uso dos recursos naturais, respeitam a integridade cultural das comunidades rurais, objetivam a sustentabilidade, a maximização dos benefícios sociais e a proteção do meio ambiente e minimizam a utilização de materiais sintéticos, de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, onde uma das finalidades é a obtenção de produtos saudáveis e ausentes de contaminantes intencionais (BRASIL, 2003). Ou seja, para o alimento ser considerado orgânico, além de ser cultivado em condições de sustentabilidade social, cultural, ambiental e econômica, não pode conter diversos produtos químicos, agroquímicos e transgênicos, podendo apresentar somente substâncias estabelecidas por lei (BRASIL, 2014).

A regulamentação da produção orgânica no Brasil se dá pelo Decreto Nº 6.323 de 27 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). A Instrução Normativa nº 17 de 18 de junho de 2014 altera trechos da Instrução Normativa nº 46 de 6 de outubro de 2011 e estabelece o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal e estabelece as listas de substâncias e práticas permitidas nos sistemas orgânicos (BRASIL, 2014).

Acompanhando esta vertente de consumo de orgânicos, houve aumento da procura e interesse por alimentos orgânicos de origem animal destacando-se o leite e seus derivados (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Em 2010 os dados do MAPA indicaram que o Brasil produziu cerca de 5,5 milhões de litros de leite orgânico (BRASIL, 2010). Com o aumento da produção de leite orgânico no Brasil começam a ter relevância questões como a qualidade do produto, se seus parâmetros estão de acordo com os estabelecidos na legislação e se obedecem aos princípios da produção orgânica (CAMPOS, 2004). No sistema de produção orgânica animal há grande preocupação com o bem-estar dos animais fazendo-se uso de manejos menos estressantes (BRASIL, 2014). E como não há utilização indiscriminada de substâncias químicas ou medicamentos, os produtos gerados são superiores em qualidade (ALVES, 2005).

No Brasil, muitos produtores adotam sistema de produção ecológica de leite, mas não comercializam o produto como orgânico devido a dificuldades de se adequarem a todas as normas das legislações vigentes e também por serem pequenos produtores (FERNANDEZ, 2010). A Instrução Normativa do MAPA nº 17 de junho 2014 veio alterar alguns trechos da Instrução Normativa nº 46 de outubro de 2011, viabilizando um pouco mais a adequação de produtores as normas orgânicas. Outro fato importante que também contribuiu para a inserção de interessados a esta modalidade é que lei nº 10.831 de dezembro de 2003 permite que agricultores familiares devidamente cadastrados no MAPA vendam seus produtos como orgânicos, em caso específico previsto nesta lei (BRASIL, 2014; BRASIL, 2003).

2.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

O leite é o produto proveniente da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, obtido em totais condições de higiene (BRASIL, 2011). É um alimento rico em nutrientes como gorduras, carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas sendo por isso largamente consumido pela população (SALVADOR *et al.*, 2012).

Para ser considerado de boa qualidade o leite deve dispor de características sensoriais apropriadas, ter alto valor nutricional, não conter contaminantes microbiológicos e sujidades e apresentar sua constituição natural, sem adição de água e outras substâncias (SANTOS e FONSECA, 2007).

Justamente por seus constituintes nutricionais e por conter pH-neutro o leite é um excelente meio de crescimento para diversas populações microbianas. A microbiota do leite cru é diversa e origina-se de várias fontes de como úbere, equipamentos de ordenha, ar, água, ração, capim, fezes e solo MACHADO *et al.*, 2017).

SILVA e colaboradores (2011) realizaram uma pesquisa para determinar os principais pontos de contaminação microbiológica do leite durante este procedimento e apontaram que entre as maiores fontes estão água residual contaminada nos latões, utensílios como baldes e teteiras contaminados, mãos dos manipuladores e os tetos dos animais mostrando que o desrespeito as boas práticas de fabricação durante a ordenha possibilita a contaminação do produto por inúmeros microrganismos.

Alguns fatores são determinantes para a estabilidade e o prazo de validade do leite pasteurizado como a carga microbiana inicial do leite cru, a pasteurização adequada do produto, resistência microbiana a pasteurização (CROMIE, 1991), embalagens apropriadas (SINGH *et al.*, 2012) e controle das temperaturas (MONTANHINI, 2015), sendo indispensável a utilização leite cru de boa procedência para se obter um leite processado de qualidade e com seus benefícios nutricionais (GOFF e GRIFFITHS, 2006).

2.3 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS

O queijo minas frescal é popularmente conhecido, obtido através da coagulação do leite pela atuação do coalho e de bactérias lácticas presentes ou intencionalmente adicionadas (SANGALETTI, 2007). É largamente produzido e utilizado pela população e por seu alto teor de umidade é muito susceptível a contaminações (QUINTANA e CARNEIRO, 2007) sendo extremamente perecível até mesmo quando refrigerado (FURTADO, 2005; HOFFMAN, SILVA, VINTURIM, 2002; PERRY, 2004; SILVA *et al.*, 2003). Queijos macios e outros derivados de leite são ótimos veículos de microrganismos deterioradores e até patogênicos devido a sua composição (LEJEUNE, 2009; RUDOL, 2001).

Fato importante é que a qualidade e o rendimento dos queijos estão diretamente relacionados à qualidade microbiológica dos leites utilizados em sua confecção (FURTADO, 1991), assim como as características organolépticas e os prazos de validade dos derivados de leite em geral (SAMARŽIJA *et al.*, 2012). Matéria-prima com carga microbiana elevada, recontaminação da matéria-prima após a pasteurização e abusos de temperatura na elaboração e armazenamento comprometem o produto final (SANTOS, NOGUEIRA, CUNHA, 1995). Portanto, para a obtenção de queijos de qualidade, boas práticas e controles higiênicos sanitários são extremamente recomendados (PICOLI *et al.*, 2006).

A acidez dos queijos é uma forma de conservação dos mesmos, pois inibe a presença de microrganismos patogênicos (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989). A RDC nº 12, de

2 de janeiro de 2001 estabelece padrões microbiológicos para vários tipos de queijo que deverão ser respeitados garantido assim a qualidade e a segurança destes produtos.

2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO IOGURTE

O iogurte é um leite fermentado obtido por fermentação láctica pela ação de microrganismos específicos que devem permanecer ativos, viáveis e abundantes no produto até o término de seu prazo de validade (BRASIL, 2007). Os iogurtes e demais produtos de origem animal necessitam ter carga microbiana controlada. Para garantir sua qualidade microbiológica e organoléptica estes devem ser produzidos seguindo determinadas condições (OLIVEIRA, LYRA, ESTEVES, 2013) e as boas práticas de fabricação são essenciais para prevenir a veiculação de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) (FERNANDEZ, 2003; FORSYTHE, 2002). Os leites utilizados para a fabricação dos iogurtes devem ser frescos, obtidos de forma higiênica, ter carga microbiana reduzida e ausência de patógenos alimentares (LOBATO, 2000), ainda assim devem receber adequado tratamento térmico de modo a minimizar ainda mais a presença de microrganismos aumentando assim sua segurança e conservação (SPREER, 1991). Segundo Arashiro e colaboradores (2008) leites com altas contagens de células somáticas resultam em produto final de qualidade inferior. A acidez típica dos iogurtes é um meio de conservação para os mesmos por inibir bactérias Gram-negativas (SILVA *et al.*, 2012). A RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 também estabelece padrões microbiológicos para iogurtes. Porém, apesar de sua importância, esta legislação não estabelece padrões para presença de bactérias psicotróficas e a pesquisa destes microrganismos é fundamental, pois são indicadores de qualidade nos alimentos (LIMA *et al.*, 2014).

2.5 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS EM LEITE E DERIVADOS

As bactérias psicotróficas podem crescer em temperaturas em torno de 0 a 7°C, mas sua temperatura ótima de crescimento é maior que esta, entre 20 a 30°C, onde expressam sua melhor atividade metabólica. Elas vêm sendo alvo de pesquisas devido aos procedimentos de

manejo e distribuição refrigerada, pois baixas temperaturas permitem seu crescimento (BARBANO, MA e SANTOS, 2006; SCHINIK, 1999; SORHAUG e STEPANIAK 1997; CHAMPAGNE *et al.*, 1994). Portanto para assegurar a manutenção das características nutricionais e físico-químicas do leite este deve ser obtido de forma higiênica e ser refrigerado até seu beneficiamento (BONFOH *et al.*, 2003). A refrigeração reduz custos e perdas de matéria-prima por se evitar a atividade acidificante das bactérias mesófilas (NÖRNBERG *et al.*, 2009). Entretanto, com a difusão do uso da cadeia de frio como estratégia para manter as características microbiológicas e sensoriais do leite, microrganismos psicrotróficos se tornaram os mais relevantes para a indústria de laticínios (MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006). Para Nero e colaboradores (2005) a quantificação de bactérias psicrotróficas constitui um forte indicador de qualidade do leite levando-se em conta estas novas formas de armazenamento e transporte refrigerados determinadas por lei. Esses microrganismos psicrotróficos são causa de preocupações constantes na produção de laticínios por seu papel na redução da vida de prateleira dos produtos e pelas mudanças indesejáveis na textura, cor e sabor (DECIMO *et al.*, 2014).

A quantidade de psicrotróficas no leite cru é determinada pelas condições de higiene na produção, pelo tempo de estocagem e pela temperatura de armazenamento (ARCURII *et al.*, 2008). Normalmente representam menos de 10% do total de bactérias no leite cru, porém este percentual pode aumentar para até 90% se o produto for armazenado em refrigeração (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Elas constituem flora predominante quando o leite é estocado em refrigeração (HANTIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007). Há bactérias psicrotróficas Gram-negativas e Gram-positivas, no entanto, em estudos realizados em países de clima temperado os gêneros mais comumente isolados são as Gram-negativas *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes* e as Gram-positivas *Microbacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Arthrobacter* e *Bacillus* (SHAH, 1994; SORHOUG e STEPANIAK, 1997).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são microrganismos ubíquos e podem chegar ao leite cru através do solo, água e vegetação. São os principais deterioradores de leite e derivados (VISSERS e DRIEHUIS, 2009).

Porém, dentre os diversos gêneros já isolados o *Pseudomonas* é predominante em leite cru refrigerado (DE JONGHE *et al.*, 2011; RAATS *et al.*, 2011) justamente por estar amplamente distribuído na natureza como na água e no solo contaminando assim facilmente os tetos dos animais e equipamentos de ordenha (FONSECA e SANTOS, 2000). Este gênero

possui maior atividade produtora de enzimas com tendência lipolítica em temperatura de 4°C a 7°C (NÖRNBERG *et al.*, 2010) mas também são conhecidos na indústria de laticínios como produtores de enzimas proteases na cadeia de frio (MARCHAND *et al.*, 2009; SORHAUG e STEPANIAK, 1997). As *Pseudomonas* estão conhecidas contaminantes pós pasteurização e estão envolvidas na deterioração e perda de produtos lácteos pasteurizados, devido a isso sua redução e a de outras bactérias Gram-negativas no ambiente e nos produtos prontos para consumo é fundamental para uma maior conservação e ampliação dos prazos de validade (VAN TASSELL *et al.*, 2012).

Em geral a contaminação de leite e derivados por bactérias psicotróficas se dá após a pasteurização (MOSELEY, 1980; RALYEA, 1998) como é normalmente o caso das *Pseudomonas* (VAN TASSELL *et al.*, 2012).

Em pesquisa realizada por nosso grupo de pesquisas, Pereira (2014) encontrou bactérias psicotróficas Gram-negativas quando avaliava a qualidade microbiológica de leites orgânicos e convencionais distribuído no Rio de Janeiro no que diz respeito à presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp.

A Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária não estabelece padrões microbiológicos de psicotróficas para leite e derivados, mas segundo Gehring (1980) para o leite cru em geral tenha boa qualidade é fundamental que presença de psicotróficas totais seja inferior a 10% da contagem total de bactérias.

Não é recomendada a utilização do leite e nem a produção de seus derivados quando é constatada a presença de psicotróficas acima de 6 log UFC/mL, pois nestas quantidades há chances destes microrganismos terem produzido enzimas deterioradoras (MARTINS *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006). As enzimas normalmente são produzidas no final da fase log de crescimento quando há crescimento microbiano maior ou igual a 6 log UFC/mL. (HELLIO *et al.* 1993; MAKHZOUM *et al.*, 1995; RAJMOHAN *et al.* 2002; SORHAUG e STEPANIAK 1997).

Assim como no leite os microrganismos psicotróficos causam deterioração em queijos (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). Em estudo realizado por Sangaletti e colaboradores (2009) em que pesquisava a vida útil de queijos minas quantificando bactérias psicotróficas, entre outras, foi observado um aumento gradativo nas populações de psicotróficas totais, psicotróficas lipolíticas e psicotróficas proteolíticas em produtos armazenados sob refrigeração com o passar dos dias. As reações bioquímicas provocadas pelas enzimas deterioradoras produzidas por psicotróficas geram compostos que alteram os

produtos e reduzem seu prazo de validade (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005; MOURA, 1997). Em pesquisa realizada por Morales e colaboradores (2005) foi constatada a presença de compostos voláteis como aldeídos, cetonas e compostos benzênicos e sulfurosos em queijos contaminados com *Pseudomonas* armazenados por 12 dias em refrigeração.

2.6 ENZIMAS DETERIORADORAS

Diversos gêneros de bactérias psicrotólicas degradam leite e derivados reduzindo sua qualidade e vida de prateleira através da produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas (MACHADO *et al.* 2017). As enzimas deterioradoras alteram os produtos, causam sabores indesejáveis de amargor e de ranço (BORAN e UGUR, 2010; DE JONGHE *et al.*, 2011; NICODEME *et al.*, 2005; WIEDMANN *et al.*, 2000) e limitam sua qualidade tecnológica por modificar sua textura, cor e odor (DECIMO *et al.*, 2014).

O aquecimento usado na indústria leiteira destrói facilmente as psicrotólicas, mas as lipases, proteases e lecitinases produzidas por estas bactérias psicrotólicas podem permanecer ativas no produto processado (DEETH, 2002; RAY, 2004). Estas enzimas resistem até mesmo a tratamentos UHT sendo uma das principais causas de deterioração de produtos lácteos submetidos e estes procedimentos. Inclusive o leite em pó pode conter estas enzimas, podendo os derivados elaborados a partir desta matéria-prima também serem afetados (MACHADO *et al.* 2017). Proteases e lipases são conhecidas por provocar defeitos nos queijos, diminuir seu rendimento e causar perda de consistência na formação de coágulos. Estas enzimas alteram as características organolépticas como odor e sabor de vários produtos (CHAMPAGNE *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2003; DATTA, DEETH, 2001; SORHOUG e STEPANIAK, 1997).

As proteases termorresistentes hidrolisam todos os tipos de caseína (BAGLINIÈRE *et al.*, 2012) provocando no leite coloração cinza e sabores amargos. Pode causar também gelatinização de leite UHT e perda de rentabilidade nos queijos macios (MITCHELL e EWINGS 1986), pois na hidrólise da k-caseína, caseína mais propensa a ação das proteases, ocorre desestabilização e coagulação das micelas (GAUCHER *et al.*, 2008). O leite UHT é mais propenso a ação das proteases devido aos longos períodos de armazenamento a temperatura ambiente (MCKELLAR, 1981).

As enzimas fosfolipases são resistentes ao tratamento UHT. A degradação por estas enzimas se dá por sua atuação nas membranas dos glóbulos de gordura do leite expondo os

triglicerídeos à ação das lípases (KOKA e WEIMER, 2001). As lecitinases também atuam nos fosfolipídios das membranas dos glóbulos de gordura. Com a ruptura das membranas há formação de uma emulsão instável das gorduras e vulnerabilidade dos triglicerídeos a ação de lipases (HERRERA, 2001; RAY, 2004; SHAH, 1994, FOX, 2002). A lipase catalisa a hidrólise de triglicerídeos e levam a formação de sabores adstringentes de ranço e sabão (DE JONGHE *et al.*, 2011). A degradação lipolítica não é predominante como a proteolítica, mas é a que causa as primeiras alterações nos sabores e odores dos produtos pela liberação de ácidos graxos livres. Estas alterações afetam a aceitabilidade do produto (DEETH, 2006; MA *et al.*, 2000). Os ácidos graxos livres liberados, principalmente os de cadeia curta, são os principais causadores da rancidez (DEETH, 1993; DEETH e FITZ-GERALD, 1975). A rancidez nos queijos é causada pela ação da lipólise nos triglicerídeos (PERRY, 2004).

Apesar de relevantes, existem poucos dados a respeito da atividade de lipases e lecitinases de bactérias psicrotróficas. Dados como estes são essenciais para o estabelecimento de estratégias de controle para melhorar a qualidade e a durabilidade dos alimentos (DECIMO *et al.*, 2014).

2.7 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Outra característica importante de psicrotróficas associadas a leite e derivados é sua capacidade de secretar exopolissacarídeos formando os biofilmes. Estas substâncias permitem a aderência das bactérias às superfícies (COUGHLAN *et al.*, 2016; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010; WATNICK e KOLTER, 2000) e quando estas se aderem irreversivelmente a alguma superfície a formação do biofilme é iniciada (AGUILAR *et al.*, 2007; LOPEZ, VLAMAKIS, KOLTER, 2010). Devido a isso os processos de higienização de equipamentos, utensílios e de superfícies devem ser corretamente executados, pois a presença de sujidades facilita a adesão microbiana e a formação dos biofilmes (DE ANDRADE, 2008; DONLAN, 2002). As propriedades das superfícies das células bacterianas como a presença de proteínas de adesão, pili e flagelo influenciam em sua capacidade de adesão, assim como qualquer alteração nas superfícies das células (KUMAR, ANAND, 1998; RYU, BEUCHAT, 2004).

Os biofilmes podem ser caracterizados como uma matriz extracelular de compostos poliméricos que se formam em superfície sólida e que abrigam uma comunidade de microrganismos (COUGHLAN *et al.*, 2016). Esta matriz formada principalmente por exopolissacarídeos, proteínas e por vezes DNA é protetora, por isso quando em biofilmes as

bactérias se tornam mais resistentes a antibióticos, desinfetantes (AGUILAR *et al.*, 2007; COUGHLAN *et al.*, 2016; LOPEZ, VLAMAKIS, KOLTER, 2010), a mudanças ambientais como a exposição à radiação ultravioleta (BERNBOM, VOGEL, GRAM, 2011), a ácidos e a dissecação (MCNEILL e HAMILTON, 2003). Devido à proteção oferecida por esta matriz muitos sanitizantes químicos são ineficientes na remoção da maioria das bactérias (ISLAM *et al.*, 2014), pois estes produtos tem dificuldade de se difundir na matriz (SINGHAL *et al.*, 2011). As células bacterianas em biofilmes são mais resistentes que quando em sua forma planctônica (BURMOLLE *et al.*, 2010)

Os biofilmes são associados a contaminações por bactérias deterioradoras e patogênicas e são extremamente difíceis de serem eliminados (COUGHLAN *et al.*, 2016). Espécies patogênicas como *Salmonella*, *Listeria*, *Estafilococos* entre outras tem habilidade de se aderir a plástico, borracha, vidro e metal e formar biofilmes (ELHARIRY, 2008; RYU, KIM, BEUCHAT, 2005; SINDE, CARBALLO, 2000). Eventualmente ocorre destacamento das células do biofilme contaminando os alimentos com bactérias que podem ser resistentes a antimicrobianos, uma vez que a formação dos biofilmes propicia a aquisição de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons que podem conter genes de resistência (SALISBURY *et al.*, 2002; TEALE, 2002). Em biofilmes as propriedades fisiológicas das células bacterianas são alteradas o que também contribui para o aumento da resistência (O'TOOLE *et al.*, 2000; VLKOVA *et al.*, 2008).

Os biofilmes são também uma forma de proteção das bactérias quando estas são expostas a condições adversas como mudanças de temperatura, redução de disponibilidade de nutrientes, ação de desinfetantes e antibióticos (BRIDIER *et al.*, 2011; HALL-STOODLEY *et al.*, 2004). Eles são comuns no processamento de produtos lácteos, carne, peixe (SREY *et al.*, 2013). Outro fato importante é que segundo Teh e colaboradores (2012) as bactérias psicotróficas produzem mais enzimas proteolíticas quando estão protegidas dentro de biofilmes.

2.8 QUALIDADE NUTRICIONAL DE LEITES E DERIVADOS ORGÂNICOS

A procura lácteos orgânicos vem aumentado consideravelmente (WILLER, KILCHER, 2011). Esta tendência é associada à percepção dos consumidores de que estes produtos são melhores que os convencionais em termos de qualidade e benefícios a saúde, além da motivação por questões sustentáveis (SCHWENDEL, *et al.*, 2015). No entanto ainda

há dúvidas se as práticas orgânicas realmente resultam em produtos mais nutritivos e com maior qualidade (ŚREDNICKA-TOBER *et al.*, 2016).

Sabe-se que a composição nutricional do leite, orgânico e convencional, e de conseqüentemente seus derivados, no que se refere a proteínas, gorduras e vitaminas, está diretamente relacionada à dieta dos animais (SAKOWSKI *et al.*, 2012), outros fatores como a raça também interferem na composição (SCHWENDEL, *et al.*, 2015).

Produtos oriundos de diferentes países com diferentes manejos agrícolas podem apresentar diferenças nos aspectos nutricionais (SCHWENDEL, *et al.*, 2015), inclusive a composição de ácidos graxos encontrada pode variar de estudos realizados em localidades distintas por conta dos fatores acima citados e também pelos climáticos e geográficos. (ZHUKOVA, PETROV, PETRYSHCHENKO, 2016).

2.8.1 Perfil de ácidos graxos de leite e derivados orgânicos

O perfil lipídico do leite varia muito em decorrência da dieta oferecida ao rebanho sendo este fator mais determinante que a diferença entre manejos orgânicos e convencionais (SCHWENDEL, *et al.*, 2015). A dieta interfere também nos aspectos sensoriais do leite, dietas à base de pastagens com propriedades odoríferas afetam as características do produto (COULON, PRIOLO, 2002). Uma das fontes dos ácidos graxos do leite são os lipídeos da corrente sangüínea que são oriundos da absorção intestinal dos lipídeos da dieta (GRUMMER, 1991). Os ácidos graxos são produtos da fermentação microbiana dos compostos dietéticos no rúmen (BERCHIELLI *et al.*, 2006). Dependendo do tipo os ácidos graxos podem ser benéficos ou prejudiciais à saúde. Os saturados como o mirístico e o palmístico alteram as taxas de colesterol LDL e HDL e são relacionados a doenças cardiovasculares (HU, MANSON, WILLETT, 2011), ao contrário dos insaturados linoléico, α -linolênico, EPA, DPA e DHA que são protetores e previnem diversas patologias (SUN, MA, CAMPOS, 2007). Os ácidos graxos α -linolênico (ômega 3) e o linoléico (ômega 6) são essenciais, obtidos exclusivamente através da alimentação, uma vez que não são sintetizados pelos seres humanos. O consumo equilibrado de ômega 3 e 6 está ligado à prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias, câncer, diabetes e hipertensão (GLIGOR, S., GLIGOR, R., 2016). Devido a estas questões relacionadas à saúde produtores têm se esforçado para melhorar os conteúdos de ácidos graxos benéficos nos laticínios (MELE, 2009; CHILLIARD *et al.*, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

A procura da população por alimentos mais saudáveis levou ao aumento da produção e comercialização de produtos orgânicos como o leite e seus derivados. O maior valor de mercado deste tipo de alimento tem incentivado produtores a aderirem a esta modalidade. Estes alimentos devem ser seguros do ponto de vista microbiológico assim como ter qualidade nutricional, tecnológica e sensorial.

Com a aplicação da cadeia de frio na produção leiteira os microrganismos mesófilos deixaram de ser os principais deterioradores enquanto os psicrotróficos e suas enzimas deterioradoras proteases, lipases e lecitinases passaram a desempenhar um papel fundamental neste processo. Estas enzimas reduzem a vida de prateleira de leites e derivados e produzem mudanças indesejáveis em sua textura, cor e sabor levando à sua rejeição pelos consumidores e pela indústria de alimentos.

Estas bactérias psicrotróficas também têm capacidade de formar biofilmes que dificultam a ação de agentes antimicrobianos e sanitizantes e sua eliminação das superfícies de equipamentos e utensílios.

A degradação do leite pasteurizado normalmente se dá pela contaminação por estas bactérias após o processamento ou pela presença das enzimas termorresistentes que permanecem ativas no produto mesmo após os tratamentos térmicos.

Existem muitos dados na literatura sobre os aspectos microbiológicos de leite convencional, mas, apesar de sua relevância, há poucas pesquisas disponíveis a respeito da qualidade microbiológica de leites e derivados orgânicos e principalmente sobre seu conteúdo de bactérias psicrotróficas. Há também escassez de estudos esclarecedores sobre o valor nutricional geral de lácteos produzidos nesta modalidade.

Nosso trabalho vem contribuir neste contexto trazendo informações sobre a qualidade microbiológica de leite e derivados orgânicos comercializados no município do Rio de Janeiro quanto à presença, quantificação e identificação de bactérias psicrotróficas, informando se as espécies encontradas nestes lácteos produzem enzimas deterioradoras e são produtoras de biofilme. A pesquisa traz também mais dados sobre as questões nutricionais de alimentos orgânicos, mais precisamente sobre seu conteúdo lipídico, com a identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nestes alimentos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, caracterizar as bactérias psicrotróficas Gram-negativas obtidas de leites e derivados produzidos de forma orgânica comercializados no município do Rio de Janeiro.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, identificar, caracterizar e quantificar bactérias psicrotróficas Gram-negativas,
- Verificar a capacidade das bactérias psicrotróficas isoladas de produzir enzimas deterioradoras proteases, lipases e lecitinases que impactam diretamente na qualidade, aproveitamento, vida de prateleira e até mesmo nas características nutricionais dos produtos lácteos.
- Verificar capacidade das bactérias psicrotróficas isoladas obtidas em formar biofilmes que as tornam mais resistentes os processos de sanitização e higienização, favorecendo sua permanência em equipamentos e utensílios utilizados pela indústria alimentícia, contribuindo para a contaminação ou re-contaminação dos alimentos.
- Avaliar o perfil lipídico dos lácteos orgânicos identificando e quantificando os tipos de ácidos graxos presentes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foram adquiridas vinte e sete amostras de conveniência de leite e derivados orgânicos sendo nove de leite, nove de iogurte e nove de queijo. Para cada tipo de produto foram compradas três unidades com mesmo lote e prazo de validade de três fornecedores distintos. No momento da compra os produtos estavam armazenados sobre as mesmas condições, com embalagens intactas e igualmente rotulados.

As amostras foram adquiridas em feiras orgânicas e estabelecimentos comerciais convencionais situados em diferentes pontos da cidade do Rio de Janeiro. Estas foram acondicionadas em bolsas térmicas com gelo e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do campus Rio de Janeiro do IFRJ. No laboratório foram armazenadas a 4°C e analisadas em até 24 horas após sua compra.

A maioria dos produtos eram certificadamente orgânicos e continham em suas embalagens selo de certificação. Apenas uma pequena parcela foi adquirida nas feiras orgânicas, mas não tinha o selo de certificação nem outro tipo de documento comprovando sua conformidade orgânica. Com relação à rotulagem, alguns produtos dispunham de informações incompletas deixando de expor dados importantes como lista de ingredientes, tabela nutricional e formas de conservação.

5.2 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

Diluições decimais progressivas dos alimentos foram realizadas até 10^{-3} em água peptonada estéril 0,1%. A partir de cada diluição foi inoculado 0,1 μ L por Spread Plate em placas contendo Ágar PCA + Tetrazólio (Ágar PCA + Tetrazólio a 1% utilizando-se 5mL de solução de tatrazólio para cada 1000mL de PCA). As placas foram incubadas a 7°C e após 10 dias realizadas a contagens de bactérias psicrotróficas totais.

5.3 OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS PARA IDENTIFICAÇÃO

As colônias isoladas nas placas de PCA + tetrazólio foram purificadas em Ágar TSA: foram coletadas 5% do total das colônias crescidas observando-se as morfologias presentes e escolhendo pelo menos uma colônia de cada tipo morfológico para isolamento. Cada colônia selecionada foi purificada pela técnica de esgotamento em três passagens seriadas diferentes. Para a purificação as placas foram incubadas por 24-48h a temperatura de 28°C para melhor desenvolvimento das psicrotróficas. Depois de purificadas, colônias isoladas foram inoculadas em caldo BHI e também incubadas por 24-48h a 28°C. Todos os isolados obtidos foram armazenados em glicerol para futuros projetos do Laboratório de Microbiologia do IFRJ.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a identificação dos isolados obtidos foram realizados os seguintes testes: (i) coloração de Gram; (ii) teste da oxidase utilizando-se fitas de oxidase fornecidas pela Laborclin de acordo com as recomendações do fabricante. As bactérias Gram-negativas, oxidase positivas foram identificadas utilizando o Kit Bactray III (Laborclin) e as bactérias Gram-negativas oxidase negativas com os Kits Bactray I e II (Laborclin), segundo as instruções do fabricante.

5.5 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Todos os isolados de bactérias Gram-negativas identificados foram testados quanto a sua capacidade proteolítica, lipolítica e de produção de lecitinases por meio de ensaios de difusão em ágar em duplicata em Ágar Skim Milk, Ágar Spirit Blue e Ágar PCA + Gema 10% respectivamente. As bactérias foram previamente crescidas em Ágar Nutritivo, incubadas a 28°C por 24h-48h.

A proteólise foi avaliada em Ágar Skim Milk (5% skim milk powder, 3% ágar). As placas inoculadas foram incubadas a temperatura de 7°C por 10 dias e a produção da enzima proteolítica avaliada pela formação de halos claros ao redor das colônias segundo Décimo e colaboradores (2014).

As atividade lipolítica foi determinada em Ágar Spirit Blue com modificações utilizando-se 10g de peptona de caseína, 5g de extrato de levedura, e 20g de ágar para a elaboração do meio e adicionando a ele uma emulsão lipídica vigorosamente agitada contendo 1mL de polisorbato 80, 100mL de azeite de oliva e 400mL de água destilada. Foi utilizada a proporção de 30mL de emulsão para 1000mL de meio. As placas inoculadas foram incubadas a temperatura de 37 °C por 5 dias. A atividade de lipase foi observada como uma zona de hidrólise ao redor das colônias.

A atividade de fosfolipase (lecitinases) foi determinada em PCA suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo como descrito por Dogan e Boor (2003). As placas foram armazenadas a temperatura de 7°C por 10 dias e consideradas positivas as colônias que apresentarem um anel opaco ao seu redor (BATES e LIU, 1963).

5.6 DETECÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

Para a quantificação do biofilme formado pelos isolados Gram-negativos foi empregado protocolo baseado na metodologia descrita por Stepanovic e colaboradores (2000). O método é semi-quantitativo e foi realizado em dois experimentos distintos. Os isolados foram inoculados em Ágar infusão de cérebro-coração (BHI) e incubados a temperatura de 28°C por 24-48h por se tratarem de bactérias psicotróficas. Colônias isoladas a partir do Ágar BHI foram transferidas para tubos contendo 10mL de Caldo BHI e incubadas a 28°C por 24-48h. Após a incubação 200 µL de cada cultura foram aliquoteados em quadruplica em placas de 96 poços de fundo chato e incubados a 37°C por 24h em agitação de 100 rpm para que fosse iniciada a formação de biofilmes no fundo de plástico das placas. O conteúdo dos poços foi descartado, sendo cada poço lavado três vezes com 200 µL de água destilada estéril. Depois das placas serem secas a 37°C por 20 minutos foi adicionado nos poços 100 µL de álcool absoluto por 15 minutos. Depois de secos, foram acrescentados 100 µL de cristal violeta 0,25% (p/v) por 10 minutos em cada poço. O corante foi então descartado e os poços lavados novamente três vezes com água destilada estéril. Após secagem das placas foi adicionado nos poços 200 µL de ácido acético glacial 80 % (v/v) e após 30 minutos a placa foi analisada por espectrofotometria ($\lambda = 600$ nm). Foi utilizado como controle negativo o Caldo BHI e como controle positivo uma linhagem produtora de biofilme o *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. O controle negativo teve o mesmo processo de revelação dos biofilmes, mas sem a formação dos mesmos pela ausência de bactérias. A interpretação dos resultados

foi realizada utilizando-se a média das quatro leituras considerando os parâmetros descritos por Stepanovic e colaboradores (2000). Desta forma, a absorvância média obtida foi comparada com a absorvância do controle negativo e os isolados classificados como: não produtores, quando a densidade óptica do isolado foi menor ou igual à do controle negativo; fracamente produtores, quando a densidade óptica do isolado foi maior do que a do controle negativo, mas menor do que o dobro desta; moderadamente produtores, quando a densidade óptica do isolado foi maior do que o dobro da apresentada pelo controle negativo, mas menor do seu quádruplo e fortemente produtores, quando densidade óptica do isolado foi maior do que o quádruplo da apresentada pelo controle negativo.

5.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Foi utilizada metodologia utilizada por Bligh e Dyer (1959) com alterações. Para a extração lipídica, 1,000g/mL das amostras de leite, queijo e iogurte de cada produtor foram pesados em tubos Falcon de 50mL em balança analítica (Marte, AY220) e adicionados 50µL do mix de padrão interno, ácido heptadecanóico e ácido sórbico (6,0mg mL⁻¹), 4mL de metanol, 2mL de diclorometano e uma ponta de espátula de BHT, para assim proceder a extração líquido-líquido com agitação em shaker orbital (BioSan PSU-20i) a 250 rpm por 3 minutos. Formam adicionados mais 2mL de diclorometano e 2mL de água destilada agitando-se manualmente por mais 20 segundos. Depois de realizadas as 2 extrações líquido-líquido foi feita centrifugação (Centrífuga Thermo Scientific SVT 40R) por 15 minutos a 10000 rpm. Após a centrifugação, foi recolhida a fração apolar composta pelos analitos e aproximadamente 4mL do diclorometano adicionado em tubos de ensaio 16x100mm, em seguida o extrato foi evaporado em sistema de concentração por arraste de nitrogênio (Concentrador Turbovap Zymark) a 40°C, 5psi por 25 minutos até a secagem do solvente.

A derivatização dos ácidos graxos foi realizada com adição de 100µL de BF₃ 1,33M em metanol e a mistura colocada em banho seco a 95 °C por 20 minutos. Fez-se cessar a reação expondo a superfície externa do tubo à água corrente por 30 segundos e logo após isto adicionou-se 1mL de hexano e 1mL de água para terceira extração líquido-líquido, agitando-se em vórtex por 20 segundos. Formaram-se duas fases, onde a camada apolar superior foi transferida para vials de 2mL.

A análise de identificação e quantificação dos ácidos graxos foi feita a partir do CG-EM (Agilent Technologies, 7890A-5975C), como amostrador do tipo CTC PAL (Amostrador

CTC PAL Sampler 120, Agilent Technologies) tendo as seguintes condições cromatográficas: volume de injeção de 1 μ L, razão da divisão de fluxo da fase móvel no injetor 1:100, temperatura do injetor – 240 °C; fluxo da fase móvel: 0,5mL min⁻¹, velocidade linear da fase móvel 36.796 cm seg⁻¹; programação do forno cromatográfico – 70 °C por 1 minuto, com rampa de temperatura - 45°C min⁻¹ até 115°C, seguido de nova rampa a 40°C min⁻¹ até 175°C e por fim 30°C min⁻¹ até 240°C segurando por 4,23 minutos; coluna – DB-FFAP 15m x 0,10mm, 0,10 μ m e detector – EM (espectrômetro de massas) com intervalo de massa 40-400 m/z.

A composição das amostras foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos com mix padrão de ácidos graxos (Sigma FAME 37 18919-1AMP) e dos espectros de massas das amostras com a biblioteca de espectros NIST 11. A quantificação dos ácidos seguiu a ISO 5508:1990, através do software Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis, procedendo com normalização de área a partir do sinal referente ao ácido heptadecanóico para ácidos graxos saturados e ácido sórbico para ácidos graxos insaturados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS

Foi feita a quantificação de microrganismos psicrotróficos nas vinte e sete amostras de leite e derivados orgânicos: nove de leite, nove de queijo minas e nove de iogurte.

Vinte amostras (74,07%) apresentaram crescimento de microrganismos psicrotróficos: cinco (18,51%) de leite, nove (33,33%) de queijo minas e seis (22,22%) de iogurte. Houve crescimento microbiano de psicrotróficos em 55% das amostras analisadas de leite, em 100% das de queijo minas e em 67% das de iogurte. Como demonstrado na Tabela 1, o crescimento microbiano variou de $5,6 \times 10^5$ UFC/mL a $3,5 \times 10^6$ UFC/mL, $2,5 \times 10^4$ UFC/g a $3,0 \times 10^6$ UFC/g e $3,1 \times 10^3$ UFC/ a $4,1 \times 10^4$ UFC/mL nas amostras de leite, queijo e iogurte respectivamente.

Não houve crescimento em nenhuma das amostras de leite do produtor B, produtor certificado, sugerindo a possibilidade de utilização de métodos adicionais de conservação além da pasteurização, lembrando que há proibições quanto ao uso de conservantes químicos em produtos orgânicos. Os resultados mostram a necessidade de mais pesquisas em alimentos orgânicos sobre a presença ou indício de utilização de conservantes químicos ou outros métodos de conservação não admitidos pelos preceitos orgânicos. A Instrução Normativa nº 17 de 2014 estabelece os ingredientes permitidos para uso no controle fitossanitário de produtos orgânicos, assim com as concentrações a serem utilizadas (BRASIL, 2014).

Do total de amostras analisadas sete (25,92%), três de leite e quatro de queijo, apresentaram crescimento microbiano acima de 6 log UFC/, carga microbiana onde pesquisas consideram que as bactérias psicrotróficas conseguem produzir enzimas deterioradoras (MARTINS *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006).

A legislação determina que o leite seja refrigerado após a ordenha o que propicia o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas, porém não estabelece padrões para contagem destes microrganismos que são importantes indicadores de qualidade em leites e derivados refrigerados (SILVA *et al.*, 2011).

Tabela 1 Quantificação de microrganismos psicrotróficos e número de isolados de microrganismos psicrotróficos obtidos por amostra de leite orgânico e derivados.

Amostra	log UFC	Nº Isolados	Tipo de produto	Produtor
1	5,75	7	Leite	A
2	6,00	17	Leite	A
3	5,87	12	Leite	A
4	< 2,00	*	Leite	B
5	< 2,00	*	Leite	B
6	2,00	*	Leite	B
7	6,48	17	Leite	C
8	2,00	*	Leite	C
9	6,54	28	Leite	C
10	6,48	14	Queijo	D
11	6,48	12	Queijo	D
12	6,43	10	Queijo	D
13	5,40	10	Queijo	E
14	4,86	7	Queijo	E
15	4,76	4	Queijo	E
16	6,48	15	Queijo	F
17	4,99	6	Queijo	F
18	4,40	12	Queijo	F
19	2,00	*	Iogurte	G
20	4,32	12	Iogurte	G
21	3,72	7	Iogurte	G
22	4,61	3	Iogurte	H
23	< 2,00	*	Iogurte	H
24	3,86	7	Iogurte	H
25	3,49	3	Iogurte	I
26	< 2,00	*	Iogurte	I
27	3,91	7	Iogurte	I

*Sem obtenção de isolados por não ter havido crescimento microbiano nas amostras.

Diante do grande percentual de amostras contaminadas com microrganismos psicrotróficos vê-se a necessidade de maior controle higiênico-sanitário por parte de produtores e distribuidores no que diz respeito às boas práticas de fabricação, tratamentos térmicos apropriados, controle das temperaturas de acondicionamento de modo a inibir a presença destes microrganismos e consequentemente de suas enzimas deterioradoras.

A partir das amostras analisadas neste trabalho foram estocadas 210 culturas previamente purificadas para identificação.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

O resultado da coloração de Gram mostrou que 176 (83,80%) dos 210 isolados eram bactérias psicrotróficas, os 16,19% restantes eram de leveduras com um total de 34 isolados. Das leveduras encontradas 32 foram provenientes das amostras de iogurte e apenas 2 oriundas do leite. Do total de isolados de bactérias psicrotróficas 99 (56,25%) eram Gram-negativas e 77 (43,75%) Gram-positivas. Todas as bactérias Gram-negativas eram bacilos, enquanto 64,93% das Gram-positivas eram bacilos e 35,06% cocos. As leveduras e bactérias Gram-positivas foram devidamente estocadas para futuros testes e identificação.

Dos 99 isolados de bactérias Gram-negativas 58,58% foram provenientes do leite, 39,39% do queijo e 2,02% iogurte. Todas as Gram-negativas foram identificadas sendo 39,39% delas pertencentes ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, 23,23% a espécie *Burkholderia pseudomallei* e 10,10% a *Hafnia alvei*. As demais espécies apareceram em menores proporções como a *Pseudomonas aeruginosa* 6,06% e *Enterobacter sakazakii* 3,03%. A identificação das bactérias Gram-negativas, os isolados obtidos e sua representatividade em relação aos isolados totais Gram-negativos estão descritos na Tabela 2.

O percentual de bactérias Gram-negativas por tipo de amostra correspondeu a 71,60% (58 dos 81 isolados) nas amostras de leite, 43,33% (39 dos 90 isolados) nas de queijo e 5,12% (2 dos 39 isolado) nas de iogurte. Das bactérias identificadas no leite 51,72% são do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, 13,79% da espécie *Hafnia alvei* e 12,06% da *Burkholderia pseudomallei*. Nas amostras de queijo 41,02% são da espécie *Burkholderia pseudomallei*, 23,07% do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e 7,69% da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Os estoques das amostras de iogurte eram basicamente de leveduras 82,05% (32 de 39 isolados) e apenas 17,94% de bactérias (7 de 39 isolados). Das sete bactérias apenas duas eram Gram-negativas pertencentes as espécies *Enterobacter cloacae* e *Hafnia alvei*.

Tabela 2 Identificação de bactérias psicrotróficas gram-negativas isoladas de leite orgânicos e derivados.

Identificação	NI	%
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	39	39,39%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2,02%
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	23	23,23%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,01%
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	1	1,01%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,01%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	1,01%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3	3,03%
<i>Escherichia coli 1</i>	1	1,01%
<i>Escherichia coli 2</i>	1	1,01%
<i>Hafnia alvei</i>	10	10,10%
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1	1,01%
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	1,01%
<i>Pasteurella aerogenes</i>	2	2,02%
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1,01%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6,06%
<i>Pseudomonas putida</i>	1	1,01%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1,01%
<i>Serratia marcescens</i>	1	1,01%
<i>Shigella dysenteriae sorogrupo a</i>	2	2,01%
TOTAL	99	100%

NI = número de isolados Gram-negativos encontrados nas 27 amostras analisadas. % = representação percentual em relação ao número de isolados Gram-negativos totais.

Na pesquisa realizada por Pereira (2014) já mencionada neste trabalho, enquanto analisavam a qualidade de leites orgânicos comercializados na cidade do Rio de Janeiro foram encontradas diversas bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter sp.*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella rhinoschleromatis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter gergoviae* algumas delas também identificadas em nossa pesquisa. Na Figura 1 listamos todas as espécies encontradas em nosso trabalho por amostra de leite, queijo e iogurte.

Leite Orgânico	Queijo Orgânico	Iogurte Orgânico
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Escherichia coli 1</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli 2</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Hafnia alvei</i>	
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Shigella dysenteriae sorogrupo a</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
	<i>Pasteurella aerogenes</i>	

Figura 1. Espécies de bactérias Gram-negativas identificadas por tipo de amostra: leite, queijo e iogurte.

Os gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter* e *Serratia* são os mais frequentemente encontrados em leite cru refrigerado (HANAMANT e BANSILAL, 2013; LAFARGE *et al.*, 2004; MALLET *et al.*, 2012), e sua presença no leite e também nos derivados orgânicos processados pode ser devido a sobrevivência destes microrganismos aos tratamentos térmicos convencionais aplicados ou por uma contaminação pós-pasteurização. Normalmente o leite é re-contaminado por psicrotóxicas após a pasteurização (MOSELEY, 1980; RALYEA, 1998).

As fontes no leite de bactérias do complexo *Burkholderia cepacia* e das espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia liquefaciens* podem ser diversas como solo, vegetais, água e úbere (EL-SUKHON, 2003), já a presença de *Pseudomonas sp.*, *Shigella sp.* e *Escherichia coli*, pode estar relacionada a proximidade de estábulos aos tanques de resfriamento de leite nas propriedades leiteiras uma vez que já identificaram estas espécies nas moscas de estábulo (MORAES *et al.* 2004). A *Shigella sp.* é uma bactéria extremamente patogênica da família Enterobacteriaceae, que é responsável por grande parte dos episódios de doenças diarréicas no mundo (THE *et al.*, 2016).

6.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES

Todas as 99 bactérias psicrotróficas Gram-negativas produziram pelo menos uma das enzimas deterioradoras. De todas as espécies avaliadas 36,36% foram produtoras de protease, 41,41% foram produtoras de lecitinase e apenas 4,04% produtoras de lipase como apresentado na Figura 2. Dentre os isolados identificados os que tiveram maior atividade de lecitinase foram os do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e maior atividade proteolítica a espécie *Burkholderia pseudomallei*. Segundo Hantis-Zacharov e Halpern (2007) os gêneros *Bacillus*, *Serratia* e *Hafnia* têm forte potencial proteolítico, já os gêneros *Pseudomonas*, com exceção da *P. fluorescens*, *Enterobacter* e *Acinetobacter* têm forte atividade lipolítica.

Houveram isolados que não produziram nenhum tipo de enzima 45,45%, isolados que produziram dois tipos de enzimas 24,24% e uma parcela restrita de 1,01% que conseguiram produzir os três tipos de enzima. Entre as espécies que conseguiram produzir duas enzimas estão as do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* e a *Burkholderia pseudomallei*.

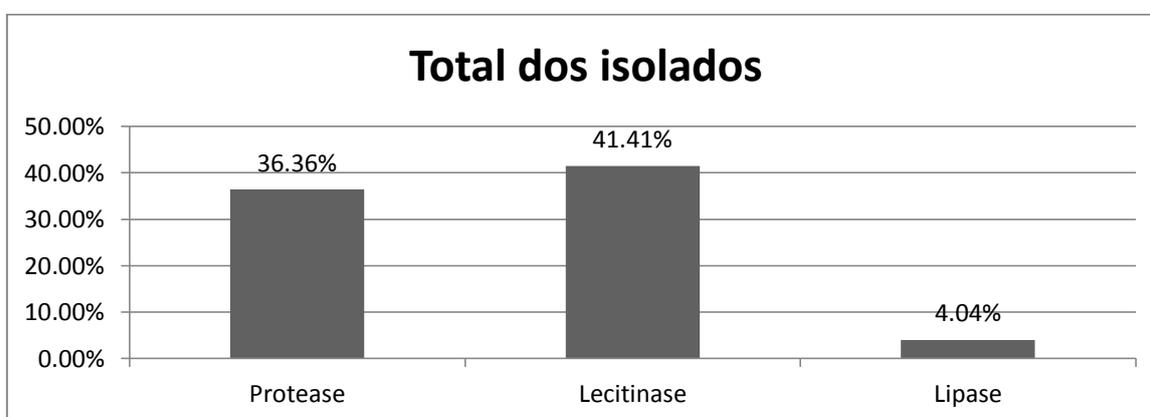


Figura 2 Percentual das bactérias Gram-negativas totais que produziram as enzimas deterioradoras protease, lecitinase e lipase.

Nas figuras 3, 4 e 5 abaixo estão representados os percentuais de produção de enzimas pelos isolados por tipo de amostra.

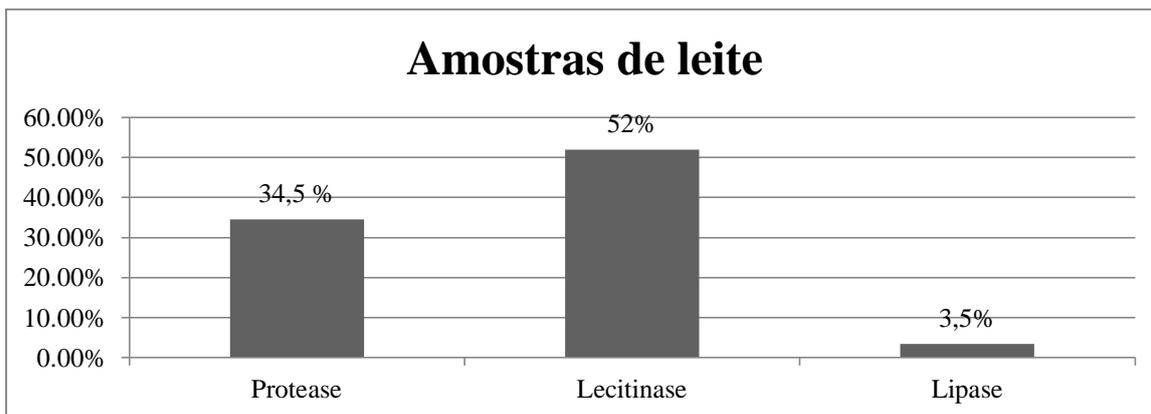


Figura 3 Percentual das bactérias Gram-negativas das amostras de leite que produziram as enzimas deterioradoras protease, lecitinase e lipase.

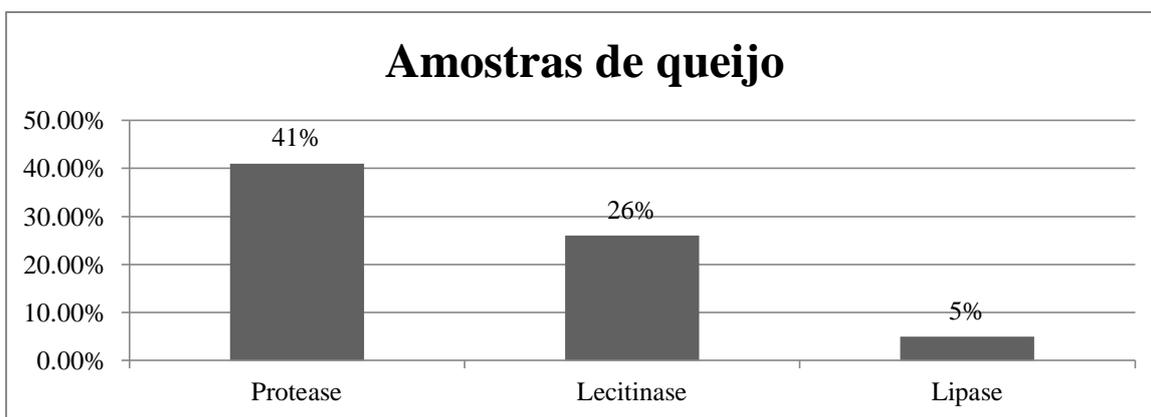


Figura 4. Percentual das bactérias Gram-negativas das amostras de queijo que produziram as enzimas deterioradoras protease, lecitinase e lipase.

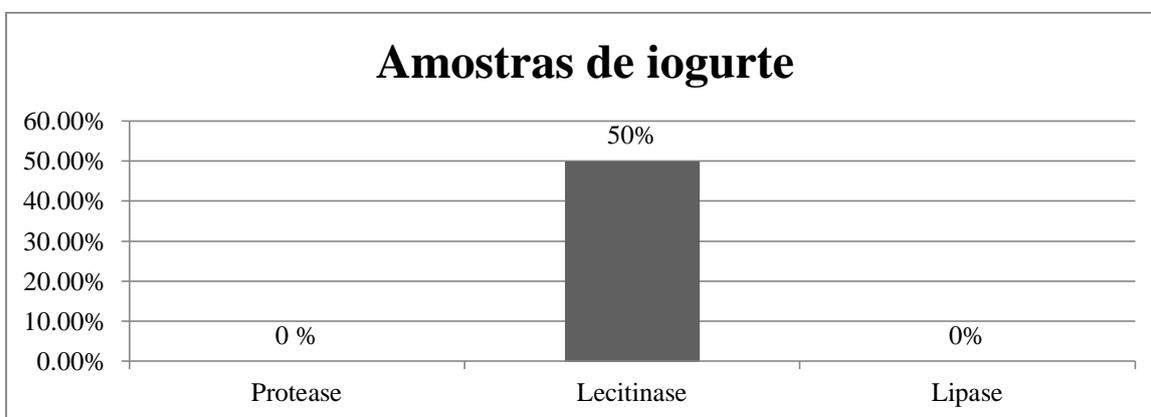


Figura 5. Percentual das bactérias Gram-negativas das amostras de iogurte que produziram as enzimas deterioradoras protease, lecitinase e lipase.

Portanto as bactérias psicrotróficas encontradas em leite e derivados orgânicos demonstram ter capacidade de produzir uma ou mais enzimas que podem alterar as suas características organolépticas e tecnológicas.

Devido à produção destas enzimas que afetam qualitativamente os lácteos as bactérias psicrotróficas se tornaram um dos maiores problemas para a indústria leiteira gerando perdas econômicas para produtores e vendedores (SAMARŽIJA *et al.*, 2012). Os defeitos mais comuns provocados por sua ação nos constituintes dos alimentos são a gelatinização em leite UHT e sabores e odores de ranço em leite em pó e em queijos (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Devido a sua resistência as enzimas podem manter de 30% a 100% de sua atividade após os tratamentos térmicos as quais são submetidas (COUSIN, 1981; NÖRNBERG *et al.*, 2009; SAMARŽIJA *et al.*, 2012; SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

Apesar destas enzimas estarem associadas a deterioração e redução dos prazos de validade de produtos elas podem também ter emprego tecnológico na indústria de alimentos como no desenvolvimento de aroma e textura de queijos na maturação (TAVANO, 2013; HASAN *et al.*, 2006).

6.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

Quanto a capacidade de produção de biofilme, as bactérias psicrotróficas foram classificadas como não produtoras (NP), fracamente produtoras (FrP), moderadamente produtoras (MP) e fortemente produtoras (FoP).

Observou-se que grande parte das bactérias, 68,68%, foram identificados como NP e FrP de biofilme e que satisfatoriamente apenas uma pequena parcela de 3,03% foi classificada como FoP. Foi observado o mesmo pequeno percentual de bactérias FoP fazendo-se a análise por tipo de amostra. Estão representadas na Figura 6 as classificações quanto à produção de biofilme pelas bactérias psicrotróficas totais e também pelas bactérias em cada tipo de amostra.

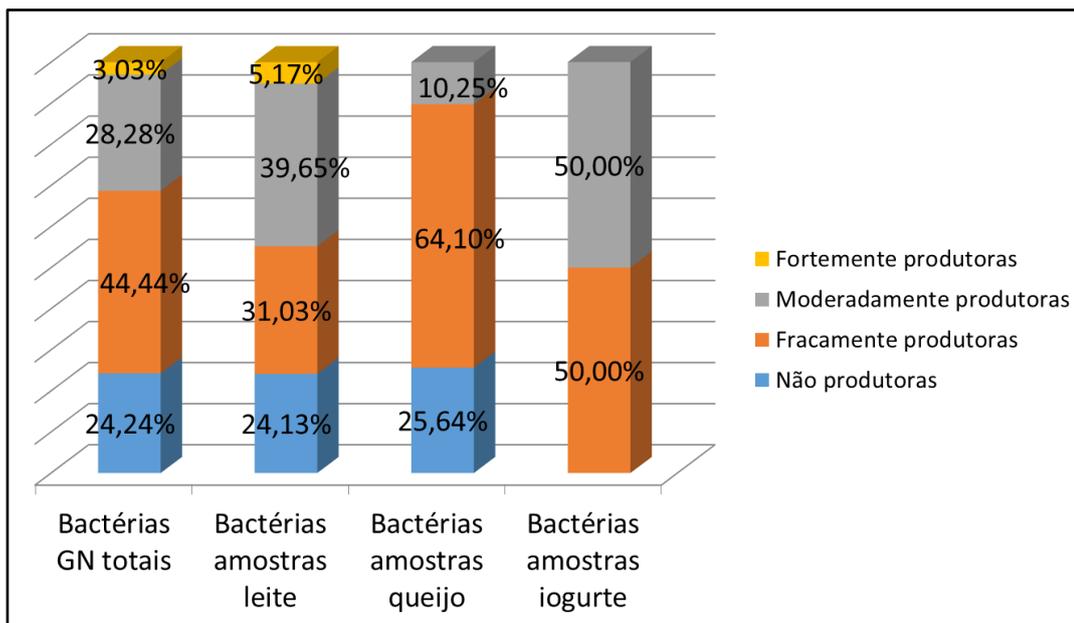


Figura 6. Classificação das bactérias psicrotróficas totais e das bactérias psicrotróficas por amostra de leite e queijo quanto à capacidade de produção de biofilmes. Classificação: não produtoras = NP, fracamente produtoras = FrP, moderadamente produtoras = MP e fortemente produtoras = FoP de biofilmes

A maioria dos isolados das amostras de leite se mostraram MP enquanto as do queijo FrP. Das duas únicas bactérias Gram-negativas isoladas das amostras de iogurte uma foi classificada como FrP e outra com MP.

Como constatado neste trabalho, muitas bactérias psicrotróficas têm capacidade de formar biofilmes. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogênica oportunista e é conhecida por ter esta habilidade de formar biofilmes em diversas superfícies, inclusive a espécie é usada em estudos de formação de biofilmes (FLEMMING e WINGENDER, 2010; KLAUSEN *et al.*, 2003; PAMP, TOLKER-NIELSEN, 2007; WU *et al.*, 2016). Outras espécies de patógenos alimentares como a *Salmonella*, *Bacilos* e *Listeria* também têm esta capacidade. Bactérias produzem biofilmes com facilidade em superfícies de plástico, um material largamente utilizado na produção de equipamentos, utensílios e até embalagens usadas em alimentos (ELHARIRY, 2008; RYU, KIM, BEUCHAT, 2005; SINDE, CARBALLO, 2000).

6.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS AMOSTRAS

Foram encontrados nove tipos de ácidos graxos nas amostras que foram identificados e quantificados na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3 Concentrações de ácidos graxos (g de AG 100g⁻¹ ΣAGs) em leites, queijos e iogurtes orgânicos.

AG	Amostras de leite			Amostras de queijo			Amostras de iogurte		
	Pro A	Pro B	Pro C	Pro D	Pro E	Pro F	Pro G	Pro H	Pro I
Butírico	3.54 ^a	4.20 ^a	3.86 ^a	3.96 ^a	3.02 ^a	3.18 ^a	4.48 ^a	3.54 ^a	3.29 ^a
Caprótico	3.02 ^b	4.23 ^a	3.73 ^{ab}	3.53 ^a	2.49 ^a	3.08 ^a	3.77 ^a	3.18 ^a	3.29 ^a
Caprílico	1.81 ^a	2.13 ^a	1.99 ^a	1.73 ^a	1.08 ^a	1.29 ^a	2.23 ^a	2.10 ^a	1.62 ^a
Cáprico	3.65 ^c	5.87 ^a	4.89 ^b	4.05 ^a	3.23 ^a	3.77 ^a	5.54 ^a	5.12 ^{ab}	4.32 ^b
Láurico	2.72 ^b	3.78 ^a	3.19 ^{ab}	3.21 ^a	2.55 ^a	2.73 ^a	4.20 ^a	3.70 ^{ab}	3.19 ^b
Mirístico	10.77 ^b	14.89 ^a	13.76 ^a	11.17 ^a	9.01 ^a	9.75 ^a	12.77 ^a	11.89 ^a	12.58 ^a
Palmítico	37.26 ^a	38.54 ^a	36.46 ^a	39.87 ^a	41.23 ^a	42.79 ^a	37.73 ^b	41.47 ^a	40.49 ^{ab}
Esteárico	21.65 ^a	14.47 ^b	16.77 ^b	21.46 ^a	24.58 ^a	22.30 ^a	19.62 ^a	20.63 ^a	19.89 ^a
Oléico	15.57 ^a	11.89 ^a	15.35 ^a	11.02 ^a	12.81 ^a	11.13 ^a	9.67 ^a	8.37 ^a	11.34 ^a
ΣSCFA	3.54 ^a	4.20 ^a	3.86 ^a	3.96 ^a	3.02 ^a	3.18 ^a	4.48 ^a	3.54 ^a	3.29 ^a
ΣMCFA	11.20 ^b	16.02 ^a	13.81 ^a	12.52 ^a	9.34 ^a	10.87 ^a	15.74 ^a	14.10 ^{ab}	12.42 ^b
ΣLCFA	85.26 ^a	79.79 ^b	82.34 ^{ab}	83.52 ^a	87.63 ^a	85.96 ^a	79.78 ^b	82.36 ^{ab}	84.29 ^a
ΣMUFA	15.57 ^a	11.89 ^a	15.35 ^a	11.02 ^a	12.81 ^a	11.13 ^a	9.67 ^a	8.37 ^a	11.34 ^a

AG = ácidos graxos. ^{a, b, c, ab} = indicação de diferenças estatísticas entre as amostras. ΣSCFA = somatório de ácidos graxos de cadeia curta. ΣMCFA = somatório de ácidos graxos de cadeia média. ΣLCFA = somatório de ácidos graxos de cadeia longa. ΣMUFA = somatório de ácidos graxos monoinsaturados. Pro A, B, C = Produtores A, B C.

Os ácidos graxos encontrados nas amostras de leite, queijo e iogurte são quase em sua totalidade saturados. As amostras não apresentaram nenhum tipo de ácido graxo poliinsaturado (PUFA) e o único ácido graxo monoinsaturado (MUFA) presente foi o oléico (C18:1n9). Este se apresentou em maiores proporções nas amostras de leite in natura. Foram identificados oito tipos de ácidos graxos saturados (SFA). Os que apresentaram maiores concentrações, em todas as amostras, foram os de cadeia longa mirístico, esteárico e especialmente o palmítico. Entre os de cadeia média o cáprico foi o que apareceu com maiores quantidades. O único de cadeia curta encontrado foi o butírico. Altos níveis de ácidos graxos de cadeia curta estão relacionados à formação de compostos indesejáveis que alteram as características sensoriais do leite (SANZ SAMPELAYO *et al.*, 2007).

Os SFA causam desequilíbrio nas taxas de colesterol e seu consumo elevado é relacionado a doenças cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2000). Os PUFA, ausentes nas amostras, apresentam efeito benéfico à saúde, pois estão envolvidos na prevenção de inúmeras patologias (GLIGOR, S., GLIGOR, R., 2016). O consumo de MUFA está associado ao aumento do bom colesterol HDL e redução do LDL (LOPES, PELUZIO, HERMSDORFF, 2016).

Em estudo realizado por Fanti e colaboradores (2008), onde compararam o perfil lipídico de leites orgânicos e convencionais comercializados na cidade de São Paulo em diferentes estações do ano, foram reportados menores teores de gorduras e menores percentuais de gordura saturada nos leites orgânicos do que nos convencionais. Segundo os autores a sazonalidade e o tipo de manejo, orgânico ou convencional, interferem na composição química dos leites. Os autores não encontraram diferenças relevantes nos principais ácidos graxos do leite, oléico, palmítico, esteárico, e mirístico, entre as estações do ano e entre leites convencionais e orgânicos. Foi pesquisada a composição percentual de ácidos graxos nos produtos. Os SFA encontrados em maiores proporções nas amostras de leite orgânico neste estudo também foram o palmítico, esteárico, e mirístico, porém os autores encontraram mais diversidade destes ácidos. Quanto aos MUFA as amostras apresentaram além do oléico o palmitoléico, entre outros. Foram também encontrados os PUFA linoléico e linolênico que não foram vistos em nossas amostras.

Średnicka-tober e colaboradores (2016) fizeram uma revisão bibliográfica comparando o conteúdo nutricional de leites tradicionais e orgânicos. Os autores concluíram que os orgânicos têm melhor perfil lipídico de ácidos graxos que os convencionais. Não foram encontradas diferenças significativas nos SFA e MUFA, mas as concentrações de PUFA, α -tocoferol e ferro foram consideravelmente maiores nos orgânicos. Estudo realizado por Zhukova, Petrov e Petryshchenko (2016), que também avaliou a diferença de concentração de ácidos graxos em leite orgânico e convencional, mostrou que os orgânicos continham maiores quantidades de SFA assim como maior soma de PUFA e MUFA que o convencional. Há muita divergência nos resultados encontrados em diferentes estudos sobre a composição de ácidos graxos, pois estes teores são fortemente influenciados por vários fatores como a dieta por exemplo. Segundo Schwendel e colaboradores (2015), para determinar diferenças na composição nutricional entre lácteos orgânicos e convencionais estes devem ser obtidos nas mesmas condições de produção, controlando todas as variáveis. Pesquisas comparativas entre

as diferentes modalidades de manejo só poderão ter resultados conclusivos se ao menos a raça dos animais e a dieta oferecida forem observadas.

CONCLUSÃO

Das amostras analisadas de leite e derivados orgânicos 74,07% apresentaram crescimento de microrganismos psicrotróficos e em 25,92% do total das amostras avaliadas houve crescimento microbiano acima de 6 log UFC/, carga microbiana em que pesquisas apontam que as bactérias psicrotróficas conseguem produzir enzimas deterioradoras. Aproximadamente 47% dos isolados psicrotróficos obtidos eram de bactérias Gram-negativas, uma fração bem significativa, mostrando que estas bactérias conseguem se desenvolver bem em ambientes refrigerados. As bactérias Gram-negativas identificadas mais encontradas pertencem ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* seguidas das espécies *Burkholderia pseudomalle* e *Hafnia alvei*.

Com relação aos testes de enzimas, observamos que 100% das bactérias Gram-negativas produziram pelo menos umas das enzimas deterioradoras proteases, lipases ou lecitinases. 36,36% das bactérias produziram proteases, 41,41% produziram lecitinases e apenas 4,04% das produziram lipases comprovando que quando contaminados com bactérias psicrotróficas os produtos lácteos orgânicos podem se tornar alvos destas enzimas que degradam os constituintes dos alimentos, particularmente as proteínas e gorduras, alterando suas características sensoriais e tecnológicas. As alterações levam sua rejeição pelos consumidores, reduzem sua vida prateleira e impossibilitam sua utilização pela indústria de alimentos.

Os testes para detecção de bactérias produtoras de biofilmes apontaram que 68,68% dos isolados de Gram-negativas se mostraram não produtores ou fracamente produtores de biofilme, 28,28% moderadamente produtores e apenas 3,03% fortemente produtores. Resultados satisfatórios, uma vez que a matriz do biofilme abriga diversas bactérias que podem ser patogênicas ou simplesmente deterioradoras. Quando em biofilmes as bactérias se tornam mais resistentes a agentes químicos e protegidas de procedimentos de higienização. Outra questão importante sobre biofilmes é que eles são facilmente formados nas reentrâncias de equipamentos e utensílios e podem se desprender contaminando ou re-contaminando os alimentos.

A contaminação por psicrotróficas pode ocorrer em todas as etapas desde a ordenha até a distribuição dos produtos finais e mesmo que bactérias consigam ser eliminadas pelos tratamentos térmicos convencionais as enzimas podem permanecer nos alimentos continuando sua ação deterioradora. Para obter leite e derivados orgânicos de qualidade e com características microbiológicas adequadas deve-se utilizar matérias-primas de boa procedência, seguir rigorosamente as boas práticas de fabricação, adotar técnicas corretas de higienização e tratamentos térmicos apropriados reduzindo assim a presença destes microrganismos críticos que em condições ideais podem produzir as enzimas deterioradoras e formar biofilmes.

Além da adequação microbiológica é importante que os produtos sejam certificadamente orgânicos e tenham boa composição de nutrientes. Na pesquisa do perfil de ácidos graxos das amostras foram encontrados basicamente ácidos graxos saturados, não havendo presença significativa de ácidos graxos monoinsaturados e ausência de ácidos graxos poliinsaturados. É importante lembrar que os aspectos nutricionais do leite, inclusive o de gorduras, está intimamente relacionados à dieta do animal, a sua raça e a condições climáticas e geográficas, estas questões influenciam mais nestes atributos do que o tipo de manejo utilizado.

Produtos orgânicos em geral devem ser elaborados de acordo com as normas e preceitos orgânicos e ter boa qualidade nutricional e microbiológica para assim atender a demanda e as expectativas dos consumidores por estes produtos saudáveis e diferenciados.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Thinking about *Bacillus subtilis* a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology*, 10: p. 638–643, 2007.
- ALVES, A. A. Panorama atual da produção orgânica de leite no Brasil. *Revista Agroecologica*, v, 29, p. 24-5, 2005.
- ARCURII, E. F.; DA SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v.38, n.8, Santa Maria, 2008.
- ARASHIRO, E. K. N.; TEODORO, V. A. M.; MIGUEL, E. M. Mastite bovina: importância econômica e tecnológica. *Revista Ciência do Leite*, p. 12, 2008.
- BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, n. 89, p. 15-19, 2006.
- BARBOSA, S. C.; MATTEUCCI, M. B. A.; LEANDRO, W. M.; LEITE, A. F.; CAVALCANTE, E. L. S.; DE ALMEIDA, G. Q. E. Perfil do consumidor e oscilações de preços de produtos agroecológicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.41, n.4, p. 602-609, 2011.
- BAGLINIÈRE, F.; TANGUY, G.; JARDIN, J., *et al.* Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. *Food Chemistry* v. 135, n. 4, p. 2593-2603, 2012.
- BATES, J. L.; LIU, P. V. Complementation of lecithinase activities by closely related pseudomonads - its taxonomic implication. *Journal of Bacteriology*, v. 86, n. 3, p. 585-592, 1963.

BONFOH, B.; WASEMB, A.; TRAORÉET, A. N. *al.* Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, v. 14, n. 7, p. 495-500, 2003.

BORAN, R.; UGUR, A. Partial purification and characterization of the organic solvent-tolerant lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* RB02-3 isolated from milk. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 40, p. 229–241, 2010.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. v.2, 583p.

BERNBOM, N.; VOGEL, B. F; GRAM, L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *International Journal of Food Microbiology*. v. 147, n. 1,p. 69-73, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, v.37, p.911-917, 1959

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12 de 2 de janeiro de 2001. Define os Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao-por-categoria-de-produto>. Acesso em: 01 ago 2016.

BRASIL. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm>. Acesso em: 15 jan 2017.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm> Acesso em 27 abril 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 17, de 18 de junho de 2014. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção, bem como as listas de substâncias e práticas permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção, na forma desta Instrução Normativa e de seus Anexos I a VIII. Disponível em: <

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-17-de-18-de-junho-de-2014.pdf/view>>. Acesso em: 15 mar 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informações. Disponível em < <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2011/03/leite-organico-aumenta-renda-do-agricultor> > Acesso em: 17 de mai. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. n. 27, p. 1017–1032, 2011.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T. R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L; HOMOE, P.; Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. n. 59, p. 324-336, 2010.

CAMPOS, E.P.C. *Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico*. 2004. 58p. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, 2004.

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

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

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*. n. 109, p. 828– 855, 2007.

COUGHLAN, L. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.

COULON, J.B.; PRIOLO, A. La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. *INRA productions animales*, v.15, n.5, p.333-342, 2002.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw Milk. In: ROBINSON, R. K. *Dairy Microbiology. New York: Applied Science*, v.1, p.119-163, 1981.

CROMIE, S.J. Microbiological aspects of extended shelf life products. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 46, p. 101-104, 1991.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk - a review. *Food and Bioproducts Processing*, v. 79: p. 197-210, 2001.

DE ANDRADE, N. J. *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela, 2008.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

DECIMO, M.; MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Characterization of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria isolated from Italian Bulk Tank Milk. *Journal of Food Science*, v. 79, n. 10, p. M2081-M2090, 2014.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, n 16, p. 552-62, 2006.

DEETH, H. C. Lipolysis. *Encyclopedia of dairy sciences*, v. 1, p. 1595-601, 2002.

DEETH, H. C. Lipase activity and its effect on milk quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, n. 48, p. 96-98, 1993.

DEETH, H. C; FITZ-GERALD, C. H. The relevance of milk lipase activation to rancidity in cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, n. 30, p. 74-76, 1975.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

DONLAN R. M.; COSTERTON J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 167 -93, 2002.

ELHARIRY, H. M. Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, v. 3, n. 2, p.69-78, 2008.

EL-SUKHON, S. N. Identification and characterization of *Klebsiella* isolated from milk and milk products. *Food Microbiology*. v. 20, n. 2, p. 225-30, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.htm
> Acesso em: 01 maio 2017.

FANTI, M. G. N.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, R. C.; FLORENCE, A. C. R.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n. 28, p. 259-265, 2008.

FERNANDEZ, A. T. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17, n.111, p.58-63, 2003.

FERNANDEZ, V. N. V. *Avaliação da qualidade do leite e de queijos produzidos pela agricultura familiar, em sistemas de produção ecológico e convencional, no leste do Rio Grande do Sul*. 2010. 99p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. n. 8, p. 623–633, 2010.

FRANCO, B. G. M. F.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. *Standard methods for the examination of dairy products*. Washington: American Public Health Association, 2005. p. 271-286.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p.18.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. São Paulo: Artmed, 2002.

FOX, P. F. Fat globules in milk. *Encyclopedia of dairy sciences*, p 1564-8, 2002.

FURTADO, M. M. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. Edição Revisada e Ampliada. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005, p.200.

FURTADO, M. M. *A arte e ciência do queijo*. São Paulo: Editora Globo, 1991, p.297.

GARCIA, M. E. T. A.; COUTO, E. P.; FERREIRA, M. A. Leite orgânico produzido no distrito federal: avaliação da qualidade físico-química e microbiológica. *Atas de Saúde Ambiental – ASA*. v. 2, n.3, p. 16-24, 2014.

GAUCHER, I.; MOLLÉ, D.; GAGNAIRE, V.; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physicochemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 130-143, 2008.

GEHRINGER, G. Multiplication of bacteria during farm storage. In Factor influencing the bacteriological quality of raw milk. *Intl Dairy Federation Bulletin*, Document 120, 1998.

GLIGOR, S.; GLIGOR, R. The potential role of omega-3 fatty acids supplements in increasing athletic performance Timișoara. *Physical Education and Rehabilitation Journal*, v. 9, n. 16, 2016

GOFF, H. D.; GRIFFITHS, M. W. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 4, p. 1163-1176, 2006.

GRUMMER, R. R. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.3244-3257, 1991.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. n. 2, p. 95–108, 2004.

HANAMANT, P. S.; BANSILAL, G. M. Lipolytic psychrotrophic grampositive cocci in milk and fermented milk products. *Journal of Environmental Research and Development*, v. 8, n. 2, p. 273–279, 2013.

HANTIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Cultural psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 73, p. 7162-7168, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 39, p. 235–251, 2006.

HELLIO, F. C.; ORANGE, N.; GUESPINMICHEL, J. F. Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MFO, in the presence of various inducers. *Research in Microbiology*, v. 144, n. 8, p. 617-625, 1993.

HERRERA, A. G. Psychrotrophic microorganisms. *Food Microbiology Protocols*, p. 3-11, 2001.

HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica e queijos tipo “Minas frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

HU, F. B.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, n. 20, p.5-19, 2001.

ISLAM, M. T.; OISHI, A.; MACHIDA, C.; OGURA, A.; KIN, S.; HONJOH, K.; MIYAMOTO, T. Combined effects of selected food additives on adhesion of various foodborne pathogens onto microtiter plate and cabbage leaves. *Food Control*, n. 46, p. 233-241, 2014.

KLAUSEN, M.; HEYDORN, A.; RAGAS, P.; LAMBERTSEN, L.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, v. 48, n. 6, p. 1511-24, 2003.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Influence of growth conditions on heat-stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p.109-116, 2001.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, 1998.

LAFARGE, V.; OGIER, J. C.; GIRARD, V.; MALADEN, V.; LEVEAU, J. Y.; GRUSS, A. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 70, p. 5644-5650, 2004.

LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 93-100, 2009.

LIAN, S. B.; SAFARI, M.; MANSORI, S. The Marketing Stimuli Factors Influencing Consumer's Attitudes to Purchase Organic Food. *International Journal of Business and Management*, v. 11, n.10, 2016.

LIMA, E. L.; MENEZES, T. N.; TAVARES, M. P.; SZARFARC, S. C.; FISBERG, R. M. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Revista de Nutrição*. n. 13, v. 2, p. 73-80, 2000.

LIMA, S. E. R.; MARTINS, W. F.; MELO, F. S. N.; SILVA, E. V.; ARAÚJO, A. S. Estudo do Crescimento de Bactérias Psicrótróficas e Mesófilas em Iogurte Enriquecido com Grãos. *Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 4, n. 1, 2014.

LOBATO, V. *Fabricação de derivados do leite na propriedade rural*. Lavras – MG. Editora UFLA, 2000. (Boletim Técnico)

LOPES, L. L.; PELUZIO, M. C. G.; HERMSDORFF, H. H. M. Ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e metabolismo lipídico. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 15, n. 1, p. 52-60, 2016.

LÓPEZ, D., VLAMAKIS, H.; KOLTER, R.: Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. 1-11, 2010.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.

MACHADO, S. G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S.; COILLIE, E. V.; VANETTI, M. C. D.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-16, 2017.

MAKHZOUM, A.; KNAPP, J. S.; OWUSU, R. K. Factors affecting growth and extracellular lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food Microbiology*, v. 12, p. 277-290, 1995.

MALLET, A.; GUÉGUEN, M.; KAUFFMANN, F.; CHESNEAU, C.; SESBOUÉ, A.; DESMASURES, N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal*, n. 27, p. 13–21, 2012.

MARCHAND, S.; VANDRIESCHE, G.; COOREVITS, A.; COUDIJSER, K.; DE JONGHE, V.; DEWETTINCK, K.; DE VOS, P.; DEVREESE, B.; HEYNDRICKX, M.; DE BLOCK, J. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, v. 133, n. 1-2, p. 68-77, 2009.

MARTINS, M. L.; ARAÚJO, E. F.; MANTOVANI, H. C.; MORAES, C. A. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, p. 203-211, 2005.

MCKELLAR, R. C. Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food. *Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food*, n. 2, p. 3-245, 1989.

MCNEILL, K.; HAMILTON, I. R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 221, n. 1, p. 25-30, 2003.

MELE, M. Designing milk fat to improve healthfulness and functional properties of dairy products: From feeding strategies to a genetic approach. *Italian Journal of Animal Science*, n. 8, p. 365-373, 2009.

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e Conservação do Leite. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET*, v. 18, p. 76-89, 2014.

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K. N. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. *Journal of Dairy Research*, v. 53, p. 97–115, 1986.

MONTANHINI M. T. M.; PARADES, F. Avaliação da temperatura de armazenamento e da qualidade do leite pasteurizado comercializado por supermercados em Curitiba, Paraná. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 3, n. 2, p. 94-98, 2015

MONTEIRO, M. N. C.; SALGUERO, M.; COSTA, R. T. *et al.* Os alimentos orgânicos e a percepção de seus atributos por parte dos consumidores. Em: SEMINÁRIOS EM

ADMINISTRAÇÃO FEA-USP, 7, 2004, São Paulo. Disponível em:
<http://sistema.semead.com.br/7semead/paginas/artigos%20recebidos/marketing/MKT08_-_Os_alimentos_organicos_consumidores.PDF>. Acesso em: 10/07/2015.

MORAES, A. P. R; BADINI, P. V; SOUZA, M. M. S; BITTENCOUR, A. J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, n. 4, p.143-9, 2004.

MORALES, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; NUÑEZ, M. Volatile compounds produced in cheese by *Pseudomonas* strains of dairy origin belonging to six different species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 17, p. 6835-6843, 2005.

MOSELEY, W. K. Pinpointing post-pasteurization contamination. *J. FoodProt*, v. 43, n. 5, p. 414, 1980.

MOURA, C. J. *Efeito do resfriamento do leite sobre o rendimento e lipólise do queijo tipo parmesão*. 77 p. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1997.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NICODEME, M. J. P.; GRILL, G.; HUMBERT; GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: Dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*. v. 99, p. 641–648, 2005.

NÖERNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 63, 41-46, 2010.

NÖERNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Psychrotrophic bacteria and proteolytic activity in refrigerated raw milk. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, F. M. DE; LYRA, I. N; ESTEVES, G. S. G. Avaliação Microbiológica e Físico Química de Iogurtes de Morango Industrializados e Comercializados no Município de Linhares – ES. Campina Grande. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.15, n.2, p.147-155, 2013.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 49-79, 2000.

PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 6, p. 2531-9, 2007.

PEREIRA, B. C. S. F. *Comparação da resistência microbiana de bactérias isoladas e identificadas de leite orgânico e não orgânico comercializado na zona Sul do Rio de Janeiro*. 30p. Especialização em Gestão da Segurança de Alimentos e Qualidade Nutricional. Microbiologia, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PICOLI, S. U. BESSA, M. C.; CASTAGNA, S. M. F. *et al.* Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 1, n. 26, p. 64-69, 2006.

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

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico sanitárias dos queijos minas fresco e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos– GO. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 8, n.3, p. 205-211, 2007.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *Fems Microbiology Reviews*, v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.

RAATS, D.; OFFEK, M.; MINZ, D.; HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 465-471, 2011.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.

RALYEA, R. D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 10, p. 1336-1340, 1998.

RAY, B. *Fundamental food microbiology*. 3. ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2004.

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B. *et al.* Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*. v. 63, n. 1-2, p. 91-8, 2001.

RYU, J. H.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, n. 67, p. 2123-2131, 2004.

RYU, J. H.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R. Spore formation by *Bacillus cereus* in broth as affected by temperature, nutrient availability, and manganese. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 8, p. 1734-1738, 2005.

SAKOWSKI, T.; KUCZYNSKA, B.; PUPPEL, K.; METERA, E.; SŁONIEWSKI, K. Relationships between physiological indicators in blood and yields as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 92, p. 2905-2912, 2012.

SALISBURY, J. G.; NICHOLLS, T. J.; LAMMERDING, A. M.; TURNIDGE, J.; NUNN, M. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 20, n. 3, p. 153-64, 2002.

SALVADOR, F. C.; BURIN, A. S.; FRIAS, A. A. T.; OLIVEIRA, F. S.; FAILA, N. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. *Revista F@ciência*, v.9, n. 5, p. 30-41, 2012.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SANGALETTI, N. *Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado*. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijo Minas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – CE. *Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 13, n. 1, p. 31-36, 1995.

SANTOS, M. V.; FONSECA L. F. L. *Estratégias para o controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007, 314p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANZ SAMPELAYO, M. R.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.H.; BOZA, J. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v.68, p.42-63, 2007.

SCHINIK, B. Habitats of Prokaryotes. U knizi: *Biology of Prokaryotes* Ed by Joseph W. Lengeler. Gerhard Drews i Hans G.Schlegel, *Blackwell Science*, p. 763-801, 1999.

SCHWENDEL, B. H.; WESTER, T. J.; MOREL, P. C. H.; TAVENDALE, M. H.; DEADMAN, C.; SHADBOLT, N. M. *et. al.* Invited review: comparison of organic and conventionally produced milk. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 2, 2015

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, v. 49, p 432–7, 1994.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; D’OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Ciências Agrárias*, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SILVA, L. C.; MACHADO, T. B.; SILVEIRA, M. L. R. *et al.* Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria – RS. *Disciplinarium Scientia*, v.13, n.1, p. 111-120, 2012.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 81, p. 241-248, 2003.

SINDE, E., CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, v. 17, p. 439–447, 2000.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, A. A. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 65, p. 161-177, 2012.

SINGHAL, D.; FOREMAN, A.; BARDY, J. J.; WORMALD, P. J. *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Laryngoscope*, v. 121, p. 1578–1583, 2011.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SPREER, E. *Lactologia industrial*. 2^a ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

ŚREDNICKA-TOBER, D.; BARAŃSKI, M.; SEAL, C. J.; SANDERSON, R.; BENBROOK, C. *et al.* Higher PUFA and n-3 PUFA, conjugated linoleic acid, α -tocopherol and iron, but lower iodine and selenium concentrations in organic milk: a systematic literature review and meta- and redundancy analyses. *British Journal of Nutrition*, v. 115, n. 6, p. 1043-1060, 2016.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, v. 31, p. 572-585, 2013.

STEPANOVIC, S; VUKOVIC, D; DAKIC, I; SAVIC, B; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 40, p.175-179, 2000.

SUN, Q.; MA, J.; CAMPOS, H *et al.* Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, n. 4, p. 929–937, 2007.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using peptidases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 90, p. 1–11, 2013.

TEALE, C. J. Antimicrobial resistance and the food chain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 1, p. 85-9, 2002.

TEH, K. H.; FLINT, S., PALMER, J., *et al.* Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 157, n. 1, p. 28-34, 2012.

THE, H. C.; THANH, D. P.; HOLT, K. E.; THOMSON, N. R.; BAKER, S. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, p. 335 -337, 2016.

VAN TASSEL, J. A.; MARTIN, N. H.; MURPHY, S. C.; WIEDMANN, M.; BOOR K. J.; IVY R. A. Evaluation of Various Selective Media for the Detection of *Pseudomonas* Species in Pasteurized Milk. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 3, p. 1568-1574, 2012.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; SCHEIBLER, R. B., SCHAFHAUSER JUNIOR, J., RIZZO, F. A.; WAGNER, R. Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 12, p. 1208-1219, 2015.

VISSERS, M. M. M.; DRIEHUIS, F. On-farm hygienic milk production. In: Tamime, A.Y. (Ed.), *Milk Processing and Quality Management*, Wiley–Blackwell Publishers, United Kingdom, p. 1–22, 2009.

VITHANAGE, N. R; YEAGER, T. R; JADHAV, S. R; PALOMBOC, E. A.; DATTA, N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.189, p.26–38, 2014.

VLKOVA, H.; BABAK, V.; SEYDLOVA, R.; PAVLIK, I.; SCHLEGELOVA, J. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WIEDMANN, M., D.; WEILMEIER, S. S.; DINEEN, R.; RALYEA, e K. J. BOOR. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p.2085-2095, 2000.

WILLER. H.; KILCHER, L. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2011, *FiBL-IFOAM Report*, 2011.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do Leite e seus Derivados*, v. 56, n. 61, p. 1-8, nov. 1983.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do Leite e seus Derivados*, v. 56, n. 61, p. 1-8, 1983.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

WU, S.; LIU, G.; JIN, W.; XIU, P.; SUN, C.; Antibiofilm and Anti-Infection of a Marine Bacterial Exopolysaccharide Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. v. 7, p. 1-2, 2016,

ZHUKOVA Y. F.; PETROV P. I.; PETRYSHCHENKO S. S. Application of the fatty acid analysis for the organic cow's milk authentication. *Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine*, 2016.

ANEXO

ANEXO - Identificação dos isolados, e produção de enzimas (protease, lecitinase e lipase), e produção de biofilme dos isolados bacterianos psicrotróficos Gram-negativos obtidos de leite orgânicos e derivados de amostras de conveniência comercializados em feiras orgânicas e supermercados da Cidade do Rio de Janeiro.

Amostra	Código	Identificação	Protease	Lecitinase	Lipase	Biofilme
Leite	A103	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	MP
Leite	A104	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	FrP
Leite	A106	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-	MP
Leite	A107	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	NP
Leite	A111	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	+	-	FoP
Leite	A112	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	NP
Leite	A113	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	+	-	FoP
Leite	A114	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	NP
Leite	A115	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	FrP
Leite	A117	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	+	-	NP
Leite	A1110	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	FrP
Leite	A1114	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	NP
Leite	A1116	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A1117	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	NP
Leite	A1119	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Leite	A124	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Leite	A126	<i>Shigella dysenteriae</i> sorogrupo a	-	-	-	FrP
Leite	A127	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	NP
Leite	A128	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	FrP
Leite	A129	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	FrP
Leite	A1211	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	+	FrP
Leite	A191	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	-	-	MP
Leite	A192	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A193	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A195	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-	FrP
Leite	A196	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A197	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A198	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	MP

Leite	A199	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	MP
Amostra	Código	Identificação	Protease	Lecitinase	Lipase	Biofilme
Leite	A1910	<i>Hafnia alvei</i>	+	+	-	MP
Leite	A1911	<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	-	MP
Leite	A1912	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	MP
Leite	A1913	<i>Enterobacter sakazakii</i>	+	-	-	MP
Leite	A1914	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	+	-	FrP
Leite	A1915	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	MP
Leite	A1916	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A1918	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Leite	A211	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	NP
Leite	A212	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	+	NP
Leite	A213	<i>Shigella dysenteriae</i> sorogrupo a	-	-	-	FrP
Leite	A214	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	NP
Leite	A216	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-	-	-	NP
Leite	A217	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	MP
Leite	A218	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	MP
Leite	A2110	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	MP
Leite	A2111	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	MP
Leite	A2113	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	-	-	NP
Leite	A2114	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Leite	A2115	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	NP
Leite	A2119	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FoP
Leite	A2120	<i>Hafnia alvei</i>	-	+	-	FrP
Leite	A2121	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Leite	A2122	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	MP
Leite	A2123	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	MP
Leite	A2126	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	FrP
Leite	A2127	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	+	-	FrP
Leite	A2128	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	NP
Leite	A2131	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	FrP
Iogurte	A282	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	FrP

Iogurte	A283	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	MP
Amostra	Código	Identificação	Protease	Lecitinase	Lipase	Biofilme
Queijo	A314	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	MP
Queijo	A317	<i>Escherichia coli 2</i>	-	-	-	MP
Queijo	A341	<i>Escherichia coli 1</i>	-	-	-	MP
Queijo	A343	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	+	FrP
Queijo	A346	<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A348	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A349	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	MP
Queijo	A3412	<i>Pasteurella aerogenes</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A352	<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	NP
Queijo	A353	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A357	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A358	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	NP
Queijo	A363	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	NP
Queijo	A364	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	+	-	NP
Queijo	A365	<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	NP
Queijo	A366	<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A373	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	FrP
Queijo	A375	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A376	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A377	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A378	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A379	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A3710	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A3711	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A3712	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A3714	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A3715	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	NP
Queijo	A382	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A384	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	FrP
Queijo	A385	<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	FrP

Queijo	A391	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	NP
Amostra	Código	Identificação	Protease	Lecitinase	Lipase	Biofilme
Queijo	A392	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	-	FrP
Queijo	A393	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	NP
Queijo	A395	<i>Pasteurella aerogenes</i>	-	-	-	NP
Queijo	A396	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	-	-	NP
Queijo	A397	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A398	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A3911	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	-	-	-	FrP
Queijo	A3912	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	-	-	FrP

Classificação dos testes de enzimas: isolados produtores (+), não produtores (-). Classificação quanto à produção de biofilmes: não produtores = NP, fracamente produtores = FrP, moderadamente produtores = MP e fortemente produtores = FoP.