Capítulo 36
DOI: 10.53934/IIICBPAV-36

ANÁLISE ENZIMÁTICA DE LEITE CRU, PASTEURIZADO E ESTERILIZADO: UM ESTUDO DE CASO

Anderson Henrique Venâncio*; Bruna Azevedo Balduino ;Roberta Hilsdorf Piccoli; Maria Emília de Sousa Gomes; Alcinéia de Lemos Souza Ramos; Sandra Maria Pinto; Luiz Ronaldo de Abreu

**Autor correspondente (Corresponding author) – Email: anderson123dfgh21@gmail.com*

Resumo: Desde a obtenção do leite até o processamento, ele está susceptível a contaminação por microrganismos. Dessa forma, as indústrias aplicam vários tratamentos térmicos para eliminá-los, como a pasteurização lenta e rápida, e o processamento do leite UHT. A fosfatase alcalina e a peroxidase são enzimas contidas no leite cru e que, após a pasteurização, são utilizadas para garantir que o processamento foi eficiente. Também são utilizados outros testes enzimáticos, como o teste de redutase. Neste teste, avalia-se o tempo de redução da enzima desidrogenase (redutase) proveniente do metabolismo microbiano, sendo esse tempo de redução inversamente proporcional a quantidade de bactérias redutoras presentes no leite. Diante deste contexto, este trabalho objetivou realizar uma análise enzimática de leite cru, pasteurizado e esterilizado comercializados na cidade de Lavras-MG. Foram coletadas duas amostras de Leite cru e duas de leite pasteurizado de diferentes marcas (A e B) e duas amostras de leite UHT de diferentes marcas (C e D) em um mercado local. As análises enzimáticas de fosfatase alcalina e peroxidase demonstraram que os tratamentos térmicos foram realizados adequadamente. Já, o leite pasteurizado da marca B, apresentou uma inativação da enzima peroxidase, indicando que o leite passou por um superaquecimento. Com relação a redutase, o leite cru do produtor 1 pode ser classificado como de excelente qualidade, enquanto o leite cru do produtor 2 apresentou uma qualidade microbiana ruim, sendo necessário melhorar a higiene durante a ordenha. Conclui-se que as análises enzimáticas são importantes por auxiliar na verificação da eficiência dos tratamentos térmicos.

Palavras–chave: Estudo enzimático; Processamento do leite; Indústria.

Abstract: From obtaining milk to processing, it is susceptible to contamination by microorganisms. Therefore, industries apply various heat treatments to eliminate them, such as slow and fast pasteurization, and UHT milk processing. Alkaline phosphatase and peroxidase are enzymes contained in raw milk and which, after pasteurization, are used to ensure that processing was efficient. Other enzymatic tests are also used, such as the reductase test. In this test, the reduction time of the dehydrogenase enzyme (reductase) from microbial metabolism is evaluated, with this reduction time being inversely proportional to the amount of reducing bacteria present in the milk. Given this context, this work aimed to carry out an enzymatic analysis of raw, pasteurized and sterilized milk

sold in the city of Lavras-MG. Two samples of raw milk and two samples of pasteurized milk from different brands (A and B) and two samples of UHT milk from different brands (C and D) were collected in a local market. Enzymatic analyzes of alkaline phosphatase and peroxidase demonstrated that the heat treatments were carried out properly. Already, pasteurized milk from brand B showed inactivation of the peroxidase enzyme, indicating that the milk had been overheated. Regarding reductase, raw milk from producer 1 can be classified as excellent quality, while raw milk from producer 2 showed poor microbial quality, making it necessary to improve hygiene during milking. It is concluded that enzymatic analyzes are important for helping to verify the efficiency of heat treatments.

Key Word: Enzymatic study; Milk processing; Industry.

INTRODUÇÃO

O leite é uma substância de alto valor nutritivo, constituído de nutrientes como carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais e a água (1). De acordo com o Serviço de Inspeção Federal e Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) no seu artigo 475, o leite, sem outra especificação, é um produto resultante da ordenha ininterrupta, completa, de vacas bem alimentadas, higienizadas, descansadas e sadias, tendo a finalidade de nutrir a cria (2). Possui uma coloração esbranquiçada e opaca, e, é considerado uma emulsão, de sabor adocicado, onde seus constituintes químicos ficam dispersos na água (3).

Devido a sua composição em nutrientes químicos, o leite torna-se susceptível a contaminação por microrganismos, desde a sua retirada na ordenha, podendo estes causarem prejuízos econômicos para os laticínios (4). A microbiota do leite também é importante no que diz respeito à saúde pública, já que pode ocorrer a transmissão de diversas zoonoses importantes ao homem por meio de agentes etiológicos presentes no leite cru ou mal pasteurizado. Desse modo, uma forma de eliminar ou reduzir a níveis aceitáveis os microrganismos patogênicos e deterioradores presentes no leite, se dá pela realização de um processamento térmico (5).

O leite pode passar por três tipos de processamento térmico, a pasteurização lenta, pasteurização rápida e o processamento UHT. A pasteurização lenta corresponde ao aquecimento indireto do leite de 62°C a 65°C por 30 minutos, enquanto a pasteurização rápida corresponde ao aquecimento do leite de 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos em aparelhagem própria, provida de dispositivos de controle automático de temperatura, termorregistradores, termômetros e válvulas para o desvio do fluxo do leite (6). Já no processo UHT (Ultra High Temperature), o leite homogeneizado é submetido a um processamento térmico, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130°C mediante um processo térmico de fluxo contínuo, seguido de um resfriamento imediato a uma temperatura inferior a 32°C e envase sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (7). Esses tratamentos térmicos tem como objetivo eliminar ou reduzir a níveis seguros ao consumidor os microrganismos patogênicos e prolongar a vida útil do leite (8).

A fosfatase alcalina e a peroxidase são enzimas naturalmente encontradas no leite cru e que, após a pasteurização, são utilizadas como indicadores para garantir que o processo foi realizado de forma adequada (9). A peroxidase é uma enzima termorresistente, portanto, a ocorrência de sua desnaturação indica um possível tratamento térmico excessivo. No entanto, a fosfatase alcalina é uma enzima termossensível que deve ser inativada após a pasteurização, pois caso seja observada sua atividade enzimática no leite pasteurizado, há indícios de que a pasteurização não foi realizada corretamente. Por fim, em leites UHT, não deve haver atividade enzimática de ambas enzimas, devido à elevada temperatura utilizada nesse tratamento térmico (10).

A qualidade do leite depende de seus parâmetros químicos e microbiológicos. Desse modo, a compreensão de sua microbiota é importante para controlar características qualitativas, sensoriais e de biossegurança dos produtos lácteos (11, 12).

Nos laticínios também são utilizados outros testes enzimáticos para avaliar a qualidade microbiana geral do leite cru, como o teste de redutase. Neste teste, avalia-se o tempo de redução da enzima desidrogenase (redutase) proveniente do metabolismo microbiano, sendo esse tempo de redução inversamente proporcional a quantidade de bactérias redutoras presentes na amostra de leite (13, 14). Este é um teste simples, rápido, de baixo custo e importante por demonstrar uma relação com o crescimento microbiano (SILVA et al., 2013).

Diante deste contexto, o trabalho objetivou detectar a presença de enzimas como a peroxidase e fosfatase alcalina em leite cru, pasteurizado e UHT, comercializados na região de Lavras-MG, além de avaliar a qualidade microbiológica do leite cru pelo teste da redutase.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de condução experimento

O estudo enzimático foi conduzido na Planta Piloto de Processamento de Leite e Derivados, localizada no Departamento de Ciência dos Alimentos, pertencente à Escola Superior de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL), da Universidade Federal de Lavras.

Obtenção das amostras

Coletou-se duas amostras de Leite cru provenientes de produtores rurais, que foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo (4ºC). Posteriormente, duas amostras de leite pasteurizado de diferentes marcas (A e B) e duas amostras de leite UHT de diferentes marcas (C e D) foram adquirias em um supermercado no município de Lavras-MG. Todas as amostras de leite foram transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Leites e Derivados para realização dos testes enzimáticos de fosfatase alcalina e peroxidase com intuito de verificar a eficiência dos tratamentos térmicos de pasteurização e esterilização e para realização do teste de redutase para verificar a qualidade do leite cru.

Análises bioquímicas do leite

Peroxidase

Para verificar a atividade da peroxidase coletou-se um volume de 10 mL de leite de cada amostra com o auxílio de uma pipeta, sendo em seguida transferido para um tubo de ensaio e colocado em banho-maria (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, São Paulo) a 45ºC por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se aos tubos 2 mL de uma solução de gauaiacol 1% (Macalé - Produtos para Laticínios, Juiz de Fora, Minas Gerais) e 3 gotas de peróxido de hidrogênio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, São Paulo). O desenvolvimento de cor salmão indica teste positivo para as amostras e o não desenvolvimento da cor, teste negativo.

Fosfatase Alcalina

Para avaliar a atividade da fosfatase alcalina no leite utilizou-se o kit de reagentes para fosfatase alcalina FS® (DiaSys). Com auxílio de uma pipeta, 0,25 mL de cada amostra de leite foram transferidas para um tubo de ensaio, seguido da adição de 2 mL do reagente 1 e 0,5 mL do reagente 2. Os tubos foram colocados por 3 min em banho-maria a 37°C. Após esse período, verificou-se o desenvolvimento de coloração amarela nos tubos, indicativa de teste positivo.

Redutase

Para análise de redutase coletou-se, com auxílio de uma pipeta, um volume de 10 mL de cada amostra de leite cru e transferiu-se o volume para um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução aquosa de azul de metileno 2,5% (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, São Paulo) aos tubos, que foram vedados, homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C. Posteriormente, observou-se o tempo decorrido, desde a mistura do leite com o corante até o descoramento completo. A qualidade do leite cru foi então avaliada de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da qualidade do leite cru de acordo com o tempo de redução.

Classificação	Tempo (h) de conservação
Excelente	Conserva a cor por mais de 7 h
Bom	Conserva a cor por mais de 5 h
Aceitável	Conserva a cor por mais de 4 h
Médio	Conserva a cor por mais de 2h
Ruim	Conserva a cor por menos de 2h
Péssimo	Perde a cor em, aproximadamente 30 min

Fonte: Dos autores (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Peroxidase e Fosfatase alcalina

Os resultados para os testes de peroxidase e fosfatase alcalina dos leites estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises de peroxidase e fosfatase alcalina em diferentes tipos de leite.

Amostras de leite	Peroxidase	Fosfatase alcalina
Leite Cru 1	Positivo (Salmão)	Positivo (Amarelo)
Leite Cru 2	Positivo (Salmão)	Positivo (Amarelo)
Leite Pasteurizado A	Positivo (Salmão)	Negativo (Branco)
Leite Pasteurizado B	Negativo (Branco)	Negativo (Branco)
Leite UHT C	Negativo (Branco)	Negativo (Branco)
Leite UHT D	Negativo (Branco)	Negativo (Branco)

Fonte: Dos autores (2023).

A enzima fosfatase alcalina é termossensível, desse modo, ela não deve estar presente em leites que passaram por algum tratamento térmico como a pasteurização ou esterilização. Caso contrário, indica que o processamento térmico não foi realizado de maneira adequada ou que pode ter ocorrido contaminação ou mistura intencional com leite cru durante o processo. Esse fato pode ser percebido no trabalho de Oliveira e Santos (15), que avaliaram a atividade enzimática de 30 leites pasteurizados e demonstraram que 11 amostras indicaram presença de fosfatase alcalina. Essa enzima age hidrolisando o p-nitrofenilfosfato (incolor) e formando o p-nitrofenol, que é um composto de cor amarelada. Portanto, caso ela esteja presente no leite, este apresentará uma coloração amarela (10).

Neste estudo, apenas o leite cru apresentou presença da enzima fosfatase alcalina, indicando que os tratamentos térmicos realizados nas amostras analisadas foram eficientes.

A peroxidase é uma enzima oxidante que é destruída a temperaturas de 80°C por alguns segundos. Portanto, ela se encontra presente em leites crus e pasteurizados, estando ausente em leites UHT, já que esse procedimento utiliza altas temperaturas (16). Essa enzima age hidrolisando o peróxido de hidrogênio e liberando o oxigênio que é responsável por transformar o guaiacol de sua leucobase para a forma corada, que resulta em uma coloração salmão do leite. Caso a enzima seja desnaturada o leite permanece com sua coloração branca (10, 9).

Observa-se na Tabela 2 que o leite pasteurizado da marca B apresentou um resultado negativo para a análise da enzima peroxidase, o que indica que este leite provavelmente sofreu um superaquecimento durante o processo de pasteurização, que pode causar perdas de alguns de seus constituintes. Esse resultado também foi demonstrado em outros trabalhos que avaliaram a atividade das enzimas fosfatase e peroxidase em leites pasteurizados, sendo que os autores descreveram que muitas vezes

esse superaquecimento durante a pasteurização ocorre de forma intencional, com o intuito de reduzir a alta carga microbiana de um leite cru com baixa qualidade (17, 18, 16).

Com exceção do leite pasteurizado B, os demais leites testados mostraram-se de acordo com a legislação, com relação a presença das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina (19).

É muito importante ter-se um controle do tratamento térmico na indústria para garantir a qualidade do produto final. Já que, falhas durante o processamento ou até mesmo a mistura proposital de leite cru ao leite pasteurizado podem causar danos à saúde do consumidor, uma vez que o leite cru, mesmo que em pequena quantidade pode ser veículo de patógenos que podem causar diversas enfermidades (20). Desse modo, os testes enzimáticos são testes de fácil aplicação e de grande importância para a indústria por auxiliar na verificação da eficácia e garantia de que os tratamentos térmicos foram realizados corretamente.

Redutase

Os resultados para o teste de redutase realizados nas duas amostras de leite cru pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise de redutase em amostras de leite cru de diferentes produtores.

Amostra de leite	Tempo (h) de conservação da cor
Leite cru 1	Conservou a cor por mais de 7h
Leite cru 2	Conservou a cor por 1h e 45 min.

Fonte: Dos autores (2023).

A análise de redutase baseia-se na redução do corante azul de metileno que funciona como um receptor de H^+ resultantes da ação da enzima desidrogenase (redutase) proveniente do metabolismo microbiano. Sendo que, quanto maior é a contaminação do leite menor é o tempo gasto para a solução descolorir (13).

A primeira amostra de leite cru analisada conservou a cor azul por mais de 7 h, o que caracteriza o leite como de excelente qualidade e indica que o mesmo não apresentava uma alta carga microbiana. No entanto, a segunda amostra analisada conservou a cor azul por apenas 1 h e 45 min, o que caracteriza o leite como ruim e, consequentemente, com uma alta carga microbiana.

Essa alta contaminação microbiológica pode estar relacionada a más condições de higiene durante o processo de ordenha, que pode ser proveniente do ambiente da fazenda, excreções do úbere de animais infectados ou de falhas de higiene durante o processo de ordenha (21). Algumas práticas como a higienização dos tetos da vaca, higienização vigorosa dos baldes, latas; e dos demais equipamentos como os utensílios utilizados

durante a ordenha e o controle da temperatura do tanque de expansão contribuem para a redução da carga microbiana e melhora da qualidade microbiológica do leite cru (22, 4).

CONCLUSÕES

As análises enzimáticas de fosfatase alcalina e peroxidase demonstraram que os tratamentos térmicos de pasteurização e UHT pelos quais as amostras analisadas foram submetidas, foram realizados de forma adequada. Com exceção do leite pasteurizado da marca B que apresentou uma inativação da enzima peroxidase, indicando que o leite passou por um superaquecimento.

Com relação a análise enzimática de redutase, o leite cru do produtor 1 pode ser classificado como de excelente qualidade, enquanto o leite cru do produtor 2 apresentou uma qualidade microbiana ruim, sendo necessário melhorar as condições higiênicas durante a ordenha.

Portanto, conclui-se que as análises enzimáticas são ferramentas importantes para a indústria por auxiliar na verificação da eficiência do tratamento térmico, bem como na determinação da qualidade do leite cru.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Universidade Federal de Lavras, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas-Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

1. Dos Santos DB, De Oliveira IV, Da Cruz WP, Da Silva Bernardino PDL, Da Silva JN, Carvalho FIM, et al. Processamento e caracterização de doces de leite saborizados obtidos de vacas oriundas do Sudeste do Estado do Pará. Braz App Sci Rev. 2020;4(3):2094-2114.

2. Brasil. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A. Aprovado pelo decreto n° 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto n° 1255 de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto n° 2244 de 04/06/1997. Brasília (DF): Ministério da Agricultura; 1997.

3. Brito MA, Brito JR, Arcuri EF, Lange CC, Silva MR, De Souza GN. Agronegócio do Leite. Composição do leite [Internet]. Brasília: Embrapa; 2017. [acesso em 23 Set 2023]. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/composicao-do-leite

4. Matsubara MT, Beloti V, Tamanini R, Fagnani R, Da Silva LCC, Monteiro AA, et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. Semin: Cienc Agrar. 2011;32(1):277-85.
5. Menezes MFC, Simeoni CP, Etchepare M de A, Huerta K, Bortoluzzi DP, De Menezes CR et al. Microbiota e conservação do leite. Rev Eletrônica Gest, Educ e Tecnol Ambient. 2014;18(5):76-89.

6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n° 5, de 14 de fevereiro de 2017. Requisitos para avaliação de equivalência do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária relativos à estrutura física, dependências e equipamentos de estabelecimento agroindustrial de pequeno porte de produtos de origem animal. Brasília (DF): Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento; 2017.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UAT (UHT). Brasília (DF): Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária; 1996.

8. Reis KTMG, De Souza CHB de S, De Santana EHW, Roig SM. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: revisão. J Health Sci. 2013;15:411-21.

9. Seixas FN, Fagnani R, Rios EA, Pereira JR, Tamanini R, Beloti V. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. Rev Inst Laticínios Cândido Tostes 2014;69(1):17-24.

10. Franco BS, Manfio SR, De Andrade CJ, Leão MF. Análise das enzimas peroxidase e fosfatase em amostras de leite cru, pasteurizado e longa vida. Rev Citino 2011;1(1):52-6.

11. Fusco V, Chieffi D, Fanelli F, Logrieco AF, Cho G-S, Kabisch J, et al. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19(4):2013-49.

12. Tilocca B, Costanzo N, Morittu VM, Spina AA, Soggiu A, Britti D, et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. J Proteomics 2020;210.

13. Pereira JG, Montanhini MTM, Barcellos VC, Pinto JP de NA, Bersot L dos S. Testes de redutase para a avaliação da qualidade de leite cru refrigerado. J Health Sci. 2012;14(2):77-80.

14. Silva PA, Calixto JMR, Gorski IR de C, Rabelo VM, De Souza VA, Oliveira EMM. Caracterização da qualidade do Leite in natura de um laticínio de Campos Gerais, Minas Gerais. Rev Univ Vale do Rio Verde 2013;11(2):293-99.

15. Oliveira ENA de, Santos D da C. Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados. Rev Inst Adolfo Lutz 2012;71(1):193-7.

16. Tamanini R, Da Silva LCC, Monteiro AA, Magnani DF, Barros M de AF, Beloti V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo "C" produzido na região norte do Paraná. Semin Cienc Agrar. 2007;28(3):449-54.

17. Giombelli CJ, Tamanini R, Bataglini APP, Magnani DF, De Ângela HL, Beloti V. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Paraná. Semin Cienc Agrar. 2011;32(4):1539-46.

18. Rosa-Campos AA, Rocha JES, Borgo LA, Mendonça MA. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo 'C' produzido na região de Brasília, Distrito Federal. Rev Inst Laticínios Cândido Tostes 2011;66(379):30-4.

19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n° 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Brasília (DF): Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento; 2018.

20. Lima JS, Sampaio APPO, Silva PS, Dufossé MC da S, Da Rosa AMBP, De Moraes CM, et al. Avaliação de métodos de detecção da fosfatase alcalina em leite bovino, bubalino e caprino. Braz J Food Technol. 2021;24:1-6.

21. Kousta M, Mataragas M, Skandomis P, Drosinos EH. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. Food Control 2010;21(6):805-15.

22. Alves BG, Da Silva TH, Igarasi MS. Manejo de ordenha. PUBVET 2013;7(6):420-548.