

## Testes de Redutase para a Avaliação da Qualidade de Leite Cru Refrigerado

### Reductase Tests for Quality Evaluation of Refrigerated Raw Milk

Juliano Gonçalves Pereira<sup>a</sup>; Maike Taís Maziero Montanhini<sup>b\*</sup>; Vinicius Cunha Barcellos<sup>c</sup>;

José Paes de Almeida Nogueira Pinto<sup>a</sup>; Luciano dos Santos Bersot<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil

<sup>b</sup>Centro Politécnico, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil

<sup>c</sup>Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, Paraná, Brasil

\*E-mail: maikemaziero@yahoo.com.br

Recebido: 19 de dezembro de 2011; Aceito: 26 de março de 2012.

#### Resumo

Os testes qualitativos de redutase são largamente utilizados pela indústria de laticínios para avaliar de forma indireta a qualidade microbiológica do leite. No entanto, para o leite refrigerado, apresentam a desvantagem de subestimar a contaminação, pois a refrigeração reduz a atividade redutora dos micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi correlacionar as contagens de micro-organismos mesófilos com os testes de redução do azul de metileno (TRAM) e o teste de redução da resazurina (TRR). Foram coletadas 284 amostras de leite cru estocadas em propriedades rurais por sistemas de tanques de expansão e imersão bem como amostras coletadas na plataforma de recepção do laticínio. De acordo com os resultados, pode-se concluir que os métodos qualitativos não devem ser substitutos definitivos para a contagem em placas, devendo ser usado apenas como forma de triagem. De qualquer maneira o TRR se mostrou mais confiável, por não ter apresentado resultados falso-negativos, além de ser um método mais rápido que o TRAM.

**Palavras-chave:** Laticínios. Análise Microbiológica. Azul de Metileno.

#### Abstract

*Qualitative reductase tests to evaluate the microbiological quality of milk are largely used by the dairy industry. However, these tests may underestimate contamination of, refrigerated milk, once refrigeration decreases the reducing activity of microorganisms. The objective of this study was to correlate the total count of mesophilic microorganisms with the methylene blue reduction test (MBRT) and the resazurin reduction test (RRT). A total of 284 raw milk samples were collected either from farms where milk was stored in cooling and immersion tanks, and in reception platforms in dairy factories. Results showed that qualitative methods should not replace plate counts, and should only be used as screening tools. RRT showed to be faster and more reliable than MBRT because it did not present false-negative results.*

**Keywords:** Dairy Products. Microbiological Analysis. Methylene Blue.

#### 1 Introdução

A má qualidade do leite produzido no Brasil se deve a fatores como deficiências no manejo e higiene da ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada, entre outros<sup>1-3</sup>.

O principal indicador da qualidade do leite é o perfil microbiológico. Grupos específicos de micro-organismos são pesquisados para esse fim, como os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotóxicos<sup>4</sup>.

A refrigeração do leite tem como principal objetivo controlar a multiplicação dos micro-organismos mesófilos, que fermentam a lactose produzindo ácido lático, o que causa a acidificação do leite e, conseqüentemente, compromete a utilização para fins industriais<sup>1</sup>. No entanto, a refrigeração do leite por períodos prolongados (acima de 48 horas) favorece o desenvolvimento da microbiota psicrotófica, capaz de se desenvolver em temperatura de refrigeração independentemente da temperatura ótima de multiplicação<sup>5</sup>.

A Instrução Normativa 51 (IN51)<sup>6</sup> prevê, como provas de qualidade do leite cru, tanto a contagem padrão em placas (mesófilos) como também a possibilidade do uso do teste de redutase por meio da prova da redução do azul de metileno, conhecida como TRAM.

Esta prova se baseia na redução do corante azul de metileno, que funciona como receptor de íons H<sup>+</sup> resultantes da ação da desidrogenase (redutase) do metabolismo microbiano. O tempo de redução é inversamente proporcional ao número de bactérias redutoras presente na amostra, ou seja, quanto maior a contaminação do leite mais rapidamente a solução irá descolorir<sup>7</sup>. Como opção ao TRAM, há o teste da redução da resazurina (TRR). A diferença entre os dois corantes é que a resazurina se reduz mais rapidamente que o azul de metileno, devido à alta sensibilidade às variações do potencial de oxirredução do leite promovidas pelas bactérias ácido-láticas presentes no leite<sup>7-8</sup>.

Estas provas são simples, rápidas e de baixo custo, muito utilizadas na indústria de produtos lácteos para avaliar

a qualidade microbiana geral do leite cru<sup>9</sup>. No entanto, basicamente a microbiota mesófila acidificante com alta atividade redutora é identificada, minimizando, portanto, o impacto da microbiota psicrotrófica sobre a qualidade do leite e derivados<sup>8-10</sup>.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a eficácia dos testes de redutase (TRAM – Teste da Redução do Azul de Metileno) e de resazurina (TRR – Teste da Redução da Resazurina) por meio da correlação com as contagens de mesófilos, a fim de avaliar a viabilidade destes testes na determinação da qualidade do leite cru refrigerado.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas 284 amostras de leite cru procedentes de propriedades leiteiras situadas na região Oeste do Estado do Paraná no período de junho de 2006 a junho de 2008.

Foram selecionadas 10 propriedades leiteiras, 5 com estocagem do leite em sistema de expansão direta e 5 com estocagem do leite em sistema de imersão, nas quais foram coletadas 30 e 29 amostras respectivamente.

Além dessas, também foram realizadas coletas mensais (18-19 amostras) diretamente do caminhão-tanque no momento do descarregamento do leite na plataforma do laticínio, totalizando 225 amostras.

Todas as amostras foram identificadas, acondicionadas sobre refrigeração, transportadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina e analisadas num intervalo máximo de quatro horas após a coleta.

### 2.2 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

Foram preparadas diluições decimais das amostras em solução salina a 0,85%. Posteriormente, 1 mL de cada diluição foi inoculado por semeadura em profundidade em ágar padrão (PCA) previamente fundido e mantido aquecido a 45-50 °C. As placas foram incubadas a 36 °C/48 horas. O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônia por mL de leite (UFC/mL)<sup>11</sup>. Baseado nos parâmetros estabelecidos pela IN 51 na época da realização do experimento, as amostras com contagens maiores que 10<sup>6</sup> UFC/mL foram consideradas em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira<sup>6</sup>.

### 2.3 Teste da redução do azul de metileno (TRAM)

Em tubos estéreis contendo 1 mL da solução de azul de metileno foram transferidos 10 mL da amostra de leite cru. Após a homogeneização, o tubo de teste foi incubado a 35-37 °C. A leitura foi realizada a cada 30 minutos até que 4/5 do tubo estivesse descolorado<sup>12</sup>. Amostras com tempo de redução menor que 1,5 horas foram consideradas em desacordo com o padrão.

### 2.4 Teste da redução da resazurina (TRR)

Em tubos estéreis contendo 1 mL da solução de resazurina foram transferidos 10 mL da amostra de leite cru. Após a homogeneização, o tubo de teste foi incubado em banho-maria a 42 °C. Os tubos foram agitados, por inversão, de 5 em 5 minutos. Após uma hora, o tubo foi retirado da estufa e a interpretação foi feita de acordo com os seguintes critérios: manutenção da cor azul: leite bom; alteração da cor azul para roxa: leite regular; alteração da cor azul para rosa: leite ruim; e alteração da cor azul para branca: leite péssimo<sup>8</sup>. Amostras com classificação “ruim” e “péssimo” foram consideradas em desacordo com o padrão.

Para análise e comparação dos métodos utilizados, foi aplicado o teste de percentual de concordância e os resultados das diversas condições foram expressos em percentuais.

## 3 Resultados e Discussão

Neste trabalho foram considerados os resultados obtidos para a contagem de mesófilos como o padrão para avaliação da qualidade do leite. Os métodos TRAM e TRR foram utilizados em comparação às contagens de mesófilos obtidas.

Analisando os resultados das contagens de mesófilos obtidas nas amostras de tanque de imersão e expansão (Tabela 1), observa-se que o tipo de estocagem teve influência sobre a qualidade microbiológica do leite cru na propriedade rural, conforme já foi observado por Bersot *et al.*<sup>13</sup> e Vallin *et al.*<sup>2</sup>. O tanque de imersão é menos eficiente no resfriamento do leite, o que justifica o maior número de amostras em desacordo com o padrão.

**Tabela 1:** Amostras de leite cru refrigerado em desacordo com o padrão para a contagem de mesófilos, TRAM e TRR do total de 284 amostras coletadas na região oeste do PR

| Ponto de coleta da amostra                  | Amostras em desacordo com o padrão* |          |           |
|---|-------------------------------------|----------|-----------|
|   | Mesófilos                           | TRAM     | TRR       |
| Tanque de imersão (n=29)                    | 13 (45%)                            | 0 (0%)   | 13 (45%)  |
| Tanque de expansão (n=30)                   | 2 (7%)                              | 0 (0%)   | 3 (10%)   |
| Plataforma de recepção do laticínio (n=225) | 53 (23%)                            | 6 (2,7%) | 101 (45%) |

\*Mesófilos: > 10<sup>6</sup> UFC/mL, TRAM: tempo de redução < 1,5 horas; TRR: ruim ou péssimo. TRAM = teste da redução do azul de metileno; TRR = teste da redução da resazurina.

De acordo com a Tabela 1, das 29 amostras de tanques de imersão, 13 (45%) foram consideradas em desacordo com o padrão tanto na contagem de mesófilos quanto no TRR. No entanto, no TRAM, todas as amostras foram consideradas aceitáveis, indicando resultados falso-negativos para este teste.

Das 30 amostras coletadas em tanque de expansão, apenas 2 (7%) foram consideradas em desacordo com o padrão na contagem de mesófilos, três (10%) no TRR e

nenhuma no TRAM.

Para as amostras coletadas na plataforma de recepção do laticínio, 23% foram consideradas em desacordo com o padrão na contagem de mesófilos, porém somente 2,7% pelo TRAM, indicando novamente um número muito elevado de resultados falso-negativos. Pelo TRR, 45% das amostras foram consideradas em desacordo com o padrão, demonstrando um grande número de resultados falso-positivos.

O elevado índice de resultados falso-positivos no TRR das amostras coletadas na plataforma do laticínio pode ser devido a interferência de leucócitos presentes nestas amostras, uma vez que estes apresentam forte caráter redutor e não são detectados na contagem padrão em placas<sup>7</sup>.

Aplicando-se o teste de concordância entre métodos, comparação da contagem de mesófilos com o TRAM, o resultado obtido foi de 55,2% e 96,5% para as amostras do tanque de imersão e de expansão, respectivamente. Entre a contagem de mesófilos e o TRR, a concordância obtida foi de 100% e 93,1% para tanques de imersão e de expansão, respectivamente. Na comparação dos resultados das provas de redutase com a contagem de mesófilos, o TRAM apresentou 11,3% de concordância, enquanto que o TRR apresentou 52,4% para amostras coletadas na plataforma de recepção (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores de concordância na comparação entre a contagem de mesófilos e testes de redutase TRAM e TRR

| Ponto de coleta da amostra          | Mesófilos x TRAM | Mesófilos x TRR |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|
| Tanque de imersão                   | 55,2%            | 100%            |
| Tanque de expansão                  | 96,5%            | 93,1%           |
| Plataforma de recepção do laticínio | 11,3%            | 52,4%           |

TRAM = teste da redução do azul de metileno; TRR = teste da redução da resazurina.

Nascimento e Souza<sup>14</sup> mostraram em seu estudo que não houve correlação significativa entre a contagem de mesófilos e a prova da redutase. Segundo os autores, isso indica que a prova de redutase não estima corretamente o número de micro-organismos presentes em determinada amostra, uma vez que alguns micro-organismos mesófilos acidificantes não possuem a enzima redutase.

Com relação ao TRAM, resultados semelhantes foram obtidos por Rosa e Queiroz<sup>15</sup> que, ao analisarem amostras de leite cru de propriedades leiteiras do Rio Grande do Sul, observaram que, apesar de 80% estarem em desacordo com a legislação para a contagem de mesófilos<sup>6</sup>, quando realizado o TRAM, todas as amostras encontravam-se dentro dos padrões estipulados.

Pelos resultados obtidos tanto neste trabalho como no estudo de Nascimento e Souza<sup>14</sup> é possível dizer que a prova do TRAM não deve ser usada como única análise para estimar

a qualidade microbiológica do leite cru. Para Souza *et al.*<sup>10</sup> o TRAM não é capaz de estimar a carga microbiana do leite *in natura*, principalmente quando o produto estiver mantido em refrigeração. A refrigeração altera o metabolismo microbiano, portanto os resultados obtidos das amostras refrigeradas podem não corresponder à carga microbiana real da amostra<sup>8</sup>.

Considerando que o metabolismo das bactérias psicrotróficas possui baixa capacidade redutora, os testes de redutase se mostram defasados para a avaliação da qualidade do leite cru refrigerado<sup>7</sup>.

Comparando-se as provas de redutase TRAM e TRR, pode-se afirmar que o TRR mostrou ser mais eficiente que o TRAM em dois aspectos: 1) o TRR é mais rápido, pois fornece o resultado em uma hora, enquanto que o TRAM pode levar mais do que cinco horas; 2) o TRR apresentou menor percentual de resultados falso-negativos, aproximando-se mais dos resultados obtidos para o método padrão, ou seja, a contagem de mesófilos.

#### 4 Conclusão

Com base nos resultados, pode-se concluir que os testes de redutase, TRAM e TRR podem apresentar resultados falso-negativos ou falso-positivos, mascarando a qualidade real do produto, portanto devem ser usados com muita cautela para o leite refrigerado, independentemente da estocagem na propriedade (tanque de expansão ou imersão) ou do local de coleta (propriedade ou plataforma do laticínio). Porém, como método de triagem, o teste de redução da resazurina (TRR) se mostrou mais eficiente, pois apresentou maior concordância com os resultados de contagem de mesófilos, além de ser um teste mais rápido, fornecendo o resultado em uma hora.

#### Referências

- Santana EHW, Beloti V, Barros MAF. Micro-organismos psicrotróficos em leite. *Hig Aliment* 2001;15(88):27-33.
- Vallin VM, Beloti V, Battaglini APP, Tamanini R, Fagnani R, Angela HL, *et al.* Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Semina Ciênc Agrar* 2009;30(1):181-8.
- Yamazi AK, Moraes PM, Viçosa GN, Ortolani MBT, Nero LA. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Biosci J* 2010;26(4):610-8.
- Nero LA, Viçosa GN, Pereira FEV. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciênc Tecnol Aliment* 2009;29(2):386-90.
- Cousin MA. Presence and activity psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J Food Prot* 1982;45:172-207.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 51. Regulamentos Técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2002.*
- Nero LA, Beloti V, Barros MAF. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - utilização no Brasil. *Semina Ciênc Agrar* 2000;21(1):115-26.

8. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria: UFSM; 2003.
9. Fonseca LFL, Santos MV. Estratégias para controle de mastite e melhoria na qualidade do leite. São Paulo: Manole; 2007.
10. Souza MR, Cerqueira MMOP, Sena MJ, Leite MO, Penna CFAM. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínio. Rev Inst Laticínios Cândido Tostes 1999;54(309):238-41.
11. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 de agosto de 2003.
12. Behmer MLA. Tecnologia do leite: produção - industrialização e análise. São Paulo: Nobel; 1999.
13. Bersot LS, Barcellos VC, Fujisawa FM, Pereira JG, Maziero MT. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite in natura. Rev Inst Laticínios Cândido Tostes 2009;371(64):34-8.
14. Nascimento MS, Souza PA. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e a prova da redutase em leite cru resfriado. Hig Alim 2002;16(97):81-6.
15. Rosa L, Queiroz MI. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. Cienc Tecnol Alim 2007;7(2):422-30.