

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DE GENES PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES E PROTEASES,  
EM CEPAS DE *Corynebacterium bovis*, ISOLADAS DE GLÂNDULAS  
MAMÁRIAS DE VACAS COM MASTITE, E VERIFICAÇÃO DO  
CRESCIMENTO DO AGENTE SOB TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO.**

**CASSIANO VICTÓRIA**

Botucatu – SP  
Maio -2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PESQUISA DE GENES PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES E PROTEASES,  
EM CEPAS DE *Corynebacterium bovis*, ISOLADAS DE GLÂNDULAS  
MAMÁRIAS DE VACAS COM MASTITE, E VERIFICAÇÃO DO  
CRESCIMENTO DO AGENTE SOB TEMPERATURA DE REFRIGERAÇÃO.**

**CASSIANO VICTÓRIA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar.

Orientador: Prof. Titular Hélio Langoni

Botucatu – SP  
Maio -2007

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

### **Aos meus Pais**

Carlos Roberto Victória e Roseli Ap. Victória

*Pela educação, amor, amizade e constante incentivo.*

### **À minha esposa**

Andréa

*Pelo amor, respeito, apoio e compreensão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente e eternamente a DEUS, pela graça da vida e a oportunidade de constante aprendizado e crescimento espiritual.

À minha esposa Andréa, pela compressão dos momentos em que estive ausente para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Titular Hélio Langoni, não somente pela orientação acadêmica e profissional como também pela amizade e orientação pessoal.

Ao Pós-graduando e amigo Rodrigo Costa da Silva, pelo apoio e esforço imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao aluno de iniciação científica Felipe Gazza Romão, pela ajuda durante a fase experimental.

Aos proprietários das fazendas que gentilmente permitiram a coleta de amostras de seus animais.

Aos demais funcionários e docentes do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ – UNESP – Botucatu.

À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela valiosa colaboração na elaboração da ficha catalográfica deste trabalho.

Aos colegas Tiago Neves Batista e Aripuanã Sakurada Aranha Watanabi, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, pelas orientações em relação às técnicas de biologia molecular.

Ao técnico de laboratório Benedito e aos residentes da disciplina de zoonoses, pelo apoio no recebimento e preparação dos materiais.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
5.1. Isolamento das cepas de <i>Corynebacterium bovis</i> . ....	31
5.2. Verificação do crescimento de <i>Corynebacterium bovis</i> sob temperatura de refrigeração.....	32
5.3. Pesquisa da presença dos genes <i>lipA</i> e <i>aprX</i> , no DNA do <i>Corynebacterium bovis</i> . ....	33
5.3.1. <i>Extração de DNA</i> .....	33
5.3.2. <i>Amplificação do DNA e eletroforese em gel de agarose</i> .....	34
5.3.3. <i>Seqüências de oligonucleotídeos e amplificação do material genético</i> . .....	34
5.4. Reação em cadeia pela polimerase.....	35
5.4.1. <i>Pesquisa do gene lipA em C. bovis</i> .....	35
5.4.2. <i>Pesquisa do gene aprX no C. bovis</i> . ....	35
5.5. Eletroforese em gel de agarose para identificação dos produtos amplificados.....	35
5.6. Análise estatística.....	36
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
6.1. Verificação do crescimento do <i>C. bovis</i> em temperatura de refrigeração. .....	38
6.2. Pesquisa dos genes <i>lipA</i> e <i>aprX</i> no DNA do <i>C. bovis</i> .....	52
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores de absorvância das três repetições e da média para os controles positivo, negativo e para a amostra 1 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ....	38
Tabela 2. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 2, 3 e 4 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ....	39
Tabela 3. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 5, 6 e 7 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ....	39
Tabela 4. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 8, 9 e 10 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ....	39
Tabela 5. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 11, 12 e 13 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .	40
Tabela 6. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 14,15 e 16 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	40
Tabela 7. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 17,18 e 19 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	40
Tabela 8. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 20,21 e 22 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	41
Tabela 9. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 23,24 e 25 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	41
Tabela 10. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 26,27 e 28 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	41
Tabela 11. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 29,30 e 31 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	42
Tabela 12. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 32,33 e 34 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	42
Tabela 13. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 35,36 e 37 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	42
Tabela 14. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 38,39 e 40 de <i>C. bovis</i> , nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. ..	43

Tabela 15. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 41,42 e 43 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 43

Tabela 16. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 44,45 e 46 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 43

Tabela 17. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 47,48 e 49 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 44

Tabela 18. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 50,51 e 52 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 44

Tabela 19. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 53,54 e 55 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 44

Tabela 20. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 56,57 e 58 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 45

Tabela 21. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 59,60 e 61 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 45

Tabela 22. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 62,63 e 64 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 45

Tabela 23. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 65,66 e 67 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 46

Tabela 24. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 68,69 e 70 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 46

Tabela 25. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 71,72 e 73 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 46

Tabela 26. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 74,75 e 76 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 47

Tabela 27. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 77,78 e 79 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 47

Tabela 28. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 80,81 e 82 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 47

Tabela 29. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 83,84 e 85 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 48

Tabela 30. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 86,87 e 88 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 48

Tabela 31. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 89,90 e 91 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 48



Tabela 32. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 92,93 e 94 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 49

Tabela 33. Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 95,96 e 97 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007. .. 49

Tabela 34. Análise estatística com média e desvio padrão das noventa e sete amostras analisadas, nos momentos M0 a M9. Botucatu – SP. 2007. .... 50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Médias dos valores de absorvância das noventa e sete amostras estudadas, nos momentos M0 a M9. Botucatu – SP. 2007.....	50
<b>Figura 2.</b> (+) <i>C. glutamicum</i> 397bp; 1 a 13 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	52
<b>Figura 3.</b> (+) <i>C. glutamicum</i> 397bp; 14 a 35 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	53
<b>Figura 4.</b> (+) <i>C. glutamicum</i> 397bp; 36 a 57 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	53
<b>Figura 5.</b> (+) <i>C. glutamicum</i> 397bp; 58 a 79 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	54
<b>Figura 6.</b> (+) <i>C. glutamicum</i> 397bp; 80 a 97 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	54
<b>Figura 7.</b> (+) <i>B. liqueniformis</i> 578 bp; 1 a 22 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	56
<b>Figura 8.</b> (+) <i>B. liqueniformis</i> 578bp; 23 a 44 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	56
<b>Figura 9.</b> (+) <i>B. liqueniformis</i> 578bp; 45 a 66 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	57
<b>Figura10.</b> (+) <i>B. liqueniformis</i> 578bp; 67 a 88 – cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	57
<b>Figura 11.</b> (+) <i>B. liqueniformis</i> 578bp; 89 a 97 - cepas de <i>C. bovis</i> ; (-) controle negativo.....	58

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Temperatura interna do refrigerador nos momentos M0 a M9 do experimento. Botucatu – SP. 2007.....	38
--	----

## RESUMO

A proposta do presente estudo foi determinar se o *Corynebacterium bovis* possui a capacidade de se multiplicar em temperatura de refrigeração e se este microrganismo possui os genes *aprX* e *lipA*, capazes de produzir enzimas termoestáveis que degradam proteínas e gorduras do leite armazenado por longos períodos de tempo. Para isto o agente foi submetido a incubação em temperatura de refrigeração que variou entre 0,7 e 4°C, por 10 dias consecutivos, com a aferição dos valores de absorvância (*A*) em espectrofotômetro a cada 24 horas, correspondendo aos momentos M0 à M9. Para a verificação da presença dos genes foi realizada a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os resultados obtidos revelaram que o *C. bovis* é capaz de se multiplicar em temperatura de refrigeração após 120 horas de incubação onde houve diferença estatisticamente significativa com  $p > 0,05$  entre os períodos M5 ( $A = 0,264$ ) e M6 ( $A = 0,297$ ) podendo ser considerado então como psicrotrófico. Por outro lado, não possui os genes *aprX* e *lipA*, não produzindo as enzimas codificadas por estes genes, o que não significa que o *C. bovis* não possua genes para a produção de outras enzimas degradantes, não pesquisadas no presente estudo. Isto sugere que novos estudos do genoma deste microrganismo são necessários, para se elucidar o verdadeiro papel deste agente na alteração da qualidade do leite e de seus subprodutos.

## SUMMARY

The purpose of the present study was to determine if *Corynebacterium bovis* has the capacity to multiply in low temperature and if this microorganism possesses the genes *aprX* and *lipA*, capable to produce term stable enzymes that degrade proteins and fats of the milk stored by long periods of time. At the first part of this study was accomplished with the agent's incubation by 10 consecutive days in temperature of cooling that varied between 0,7 and 4°C, and daily reading of absorbance (A) in spectrophotometer, corresponding from moments M0 to M9. The gene presence was accomplished with polimerase chain reaction (PCR). The results revealed that *C. bovis* is capable to multiply at low temperature after 120 hours of incubation as observed between the moments M5(A = 0,264) and M6(A = 0,297) where  $p > 0,05$  confirming that this microorganism could be considered as psychotropic. In the other hand the studied microorganism doesn't possess the *lipA* and *aprX* genes, therefore it is not capable to produce the enzymes codified by these genes, what doesn't mean that *C. bovis* doesn't possess genes for the production of other degrading enzymes, don't researched in the present study. This suggests that new studies of the genome of this microorganism are necessary, to elucidate this agent's true paper in the alteration of the quality of the milk and of their products.

# *Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

O leite desempenha um papel muito importante na nutrição e desenvolvimento não só dos seres humanos, como de todos os mamíferos em geral, devido à grande quantidade de nutrientes essenciais, tais como vitaminas, cálcio e aminoácidos presentes em sua composição.

Estas qualidades também conferem ao leite uma característica importante, pois ele é um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem e que acarretam prejuízos econômicos aos produtores e à indústria, bem como à saúde pública, com a veiculação de patógenos responsáveis por doenças graves como a tuberculose, a brucelose entre outras.

A carga bacteriana inicial do leite e as condições de armazenamento e transporte têm importância relevante para a manutenção de sua qualidade, até o momento do seu processamento pela indústria. Estes fatores contribuíram para que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentasse com a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002, em seu anexo VI, a coleta do leite cru refrigerado, bem como o seu transporte, nesta condição de temperatura, até a indústria. A este processo atribuiu-se o nome de granelização.

A granelização do leite, com o seu resfriamento na propriedade rural visa a manutenção da carga microbiana inicial, permitindo assim um maior período de armazenamento, bem como a inibição da acidificação do leite, provocada pela multiplicação da microbiota bacteriana mesofílica. Porém, com a adoção deste procedimento, surgiram novas preocupações quanto aos microrganismos capazes de se multiplicar sob temperaturas de refrigeração.

Estes agentes microbianos recebem a denominação de microrganismos psicotróficos, e muitos deles são capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termoestáveis, que têm a capacidade de degradar os produtos finais como, por exemplo, o próprio leite e alguns tipos de queijos, armazenados por longos períodos de tempo.

Alguns autores classificam os microrganismos do gênero *Corynebacterium* como psicotróficos, porém especificamente em relação ao *Corynebacterium bovis*, não há informações na literatura sobre a sua capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, nem se apresentam genes específicos que codificam proteínas com características lipolíticas e proteolíticas, o que motivou o presente estudo.



# *Revisão de Literatura*

---

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A mastite caracteriza-se como uma reação inflamatória da glândula mamária, responsável por alterações físicas e químicas do leite, pelo aumento na concentração de células somáticas, e por alterações patológicas na própria glândula mamária (DOMINGUES, 1996). Há que se considerar ainda os aspectos de saúde pública, pois o leite pode ser veículo de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem, seja pelo seu consumo direto “in natura”, seja pela ingestão de certos tipos de alimentos produzidos a partir do leite contaminado (DOMINGUES et al. 1998)

Vários agentes têm sido associados aos quadros de mastite, dentre eles podem ser citados *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (SEARS et al. 1993; COSTA et al. 1995; NADER FILHO et al. 1996). Estes agentes são exemplos de patógenos considerados de maior relevância, pois além de serem isolados com alta frequência, são responsáveis pelas perdas econômicas mais significativas tanto na propriedade rural como na indústria de laticínios. Entretanto os patógenos considerados de menor relevância, como por exemplo, *Corynebacterium bovis*, desempenham um papel pouco conhecido, porém não menos importante neste processo, conforme demonstraram YURUKOV & TODOROV (1977), que o isolaram em 73% das infecções subclínicas estudadas e COUNTER (1981), com 87% de isolamento nos casos clínicos pesquisados.

SORDILLO et al. (1989) encontraram aumento no número de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, mas não de neutrófilos, em amostras de leite positivas para *C. bovis* e NGATIA et al. (1991) afirmaram que é o microrganismo mais freqüentemente recuperado de amostras de leite

mastítico, o que está de acordo com LANGONI (1995), COSTA et al. (1995) e BRITO et al. (1998).

Os resultados obtidos por LANGONI et al. (1998), reforçam a importância deste agente, na medida em que obtiveram o seu isolamento em 16%, dos casos de mastites subclínicas, e em 12% das clínicas, entre as 7.902 amostras de leite de vacas com mastite subclínica e 850 com mastite clínica examinadas, procedentes de diferentes municípios do estado de São Paulo.

VICTORIA et al. (2005) isolaram *C. bovis* em cultura pura em 29,45% das 125 glândulas mamárias estudadas, superando inclusive, o percentual de isolamento dos gêneros *Staphylococcus* spp. (18,64%) e de *Streptococcus* spp. (15,44%), e encontraram ainda alterações físico-químicas no leite de vacas com mastite por este agente, reforçando sua importância nas infecções intramamárias.

O MAPA define como pasteurização, o emprego conveniente do calor, com a finalidade de destruir totalmente os microrganismos patogênicos sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais (BRASIL, 1997). Porém, alguns destes microrganismos possuem a capacidade de se manter viáveis após a pasteurização convencional e ao processo de esterilização comercial por ultra alta temperatura (UAT) (ROSSI JÚNIOR et al. 2006), sendo denominados de termodúricos.

DOMMETT (1992) cita que os microrganismos psicrótróficos mais isolados após a pasteurização à temperatura de 72°C ou 80°C por 15

segundos, são os corineformes, e que quanto maior a temperatura de pasteurização, maior a prevalência deste gênero.

Vários autores citam ainda como microrganismos termodúricos mais freqüentes, os gêneros *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Arthrobacter* spp, *Mycobacterium* spp, *Streptococcus* spp, e *Clostridium* spp (THOMAS, 1966; DOMMETT, 1992; SORHAUG & STEPANIAK, 1997; SANTANA et al. 2001), e que microrganismos do gênero *Corynebacterium* spp apresentam além desta, outra característica importante, que é a capacidade de multiplicação sob temperatura de refrigeração, sendo considerados então como psicrotróficos.

Segundo COLLINS (1981) e CROMIE (1992) microrganismos psicrotróficos são aqueles que possuem sua temperatura ótima de multiplicação entre 20 e 30 °C, porém têm a capacidade de se multiplicar em temperaturas inferiores a 7°C.

BRAMLEY & MCKINNON (1990) não consideram o grupo das corinebactérias como psicrotróficos, afirmando que a presença destes microrganismos está associada com uma carga microbiana inicial muito alta.

FARIA (1986) e SANTOS et al. (1999) não citam o gênero *Corynebacterium* spp como psicrotróficos, mas afirmam que a presença de agentes que se multiplicam em temperaturas de refrigeração são responsáveis pela produção de lipases e proteases termo-resistentes que hidrolisam lipídeos e proteínas, respectivamente, extremamente necessários na indústria láctea.

Estas afirmações são contrárias as de CHEN et al. (2003), que consideram o gênero *Corynebacterium* spp como microrganismos psicrotróficos, capazes de se reproduzir em temperaturas inferiores a 7°C.

Alguns autores citam que a carga inicial de psicotróficos é o parâmetro mais importante que influencia o tempo de prateleira do leite e que leite com boa qualidade microbiológica pode permanecer por até 48 horas a 4°C sem sofrer alterações físico-químicas (GUINOT-THOMAS et al. 1995, SANTOS et al. 1999).

Para BARBANO et al. (2006), a alta concentração de bactérias psicotróficas no leite cru é necessária para que haja uma quantidade suficiente de proteases e lipases que causem a quebra das proteínas e gorduras após a pasteurização.

MA et al. (2000) e CHEN et al. (2003) afirmam que o tempo de prateleira do leite e dos produtos lácteos é comprometido por alterações físico-químicas e organolépticas produzidas por lipases e proteases termoestáveis produzidas por microrganismos psicotróficos.

Segundo GUNDOGAN & ARIK (2004) os microrganismos termófilos e psicotróficos causam alterações químicas importantes nos constituintes do leite, sendo que as de maior interesse são as lipólises e as proteólises.

ADAMS et al. (1974 e 1975) afirmam que organismos psicotróficos são difíceis de se eliminar do leite cru, além de se multiplicarem e produzirem enzimas proteolíticas durante o armazenamento do leite sob refrigeração. Estes autores citam ainda que todos os microrganismos psicotróficos isolados produziram proteases resistentes ao calor e que 70 a 90 % das amostras de leite cru possuíam microrganismos capazes de produzirem tais enzimas.

GOMES (1996) relatou que as proteases produzidas pelos psicotróficos podem, mesmo em baixas concentrações, hidrolisar as proteínas do leite causando sabor amargo na armazenagem do leite UAT. DATTA & DEETH (2003) referiram ainda, que além de alterações destas características, há um aumento da viscosidade do leite com eventual formação de gel.

VIDAL-MARTINS et al. (2005) em um experimento para verificar a evolução do índice proteolítico durante a vida de prateleira do leite UHT afirmaram que dependendo da temperatura, condição e tempo de estocagem, vários grupos de microrganismos podem passar por um período de crescimento intensivo, produzindo altas concentrações de enzimas, particularmente lipases e proteinases resistentes ao calor. Os autores concluíram que houve realmente um aumento no índice proteolítico e na viscosidade aparente do leite durante a estocagem.

As lipases e proteases mesmo em baixas concentrações são capazes de degradar gordura e proteína causando respectivamente sabor de ranço e sabor amargo no leite e produtos lácteos estocados sob refrigeração (COLLINS, 1981).

HICKS et al. (1982) citam que a ação das enzimas bacterianas sobre os componentes lácteos causam várias alterações no leite e seus derivados. Estas alterações incluem sabores e aromas indesejáveis, diminuição da vida de prateleira, interferência nos processos tecnológicos e redução do rendimento, especialmente de queijos.

MUIR (1996) afirma que a característica mais notável dos microrganismos psicotróficos é a capacidade de produzir enzimas extracelulares degradantes, e que apesar da maioria destes microrganismos

ser destruída com os processos de pasteurização, este aquecimento tem pouco ou nenhum efeito sobre estas enzimas.

SILVEIRA et al. (1998) referem ainda, que de modo geral, os microrganismos psicotróficos produzem enzimas que não são completamente inativadas pelo processo UAT.

FAJARDO-LIRA & NIELSEN (1998) afirmam que microrganismos psicotróficos presentes no leite cru e que se multiplicam durante o período de estocagem, produzem proteases termoestáveis que interferem no mecanismo das plasminas, alterando a qualidade final dos produtos lácteos.

BURGER et al. (2000) relatam que há um aumento na produção de lipases em temperaturas abaixo da considerada ótima para o crescimento de psicotróficos.

BURDOVÁ et al. (2002) citam que o prolongamento do tempo de estocagem do leite cru em temperatura de refrigeração, resulta em um aumento de microrganismos psicotróficos produtores de lipases e proteases, que alteram a qualidade do leite e seus derivados.

TOPÇU et al. (2006) realizaram um experimento para avaliar a proteólise e a estabilidade no armazenamento do leite UHT e concluíram que este tipo de leite produzido a partir de leite cru com baixa qualidade microbiana, apresentou altos níveis de proteólises durante o armazenamento em temperatura ambiente. Isto causou alterações organolépticas, gelatinização e sedimentação, o que reduziu o tempo de prateleira do leite.

DEETH (1993), MUIR (1996), BALCÃO & MALCATA (1998) e SANTOS et al. (2003) relatam que lipases, também conhecidas como “ester glicerol hidrolases” são enzimas que catalisam a hidrólise dos triglicérides que

constituem as gorduras e óleos. Os produtos desta hidrólise são ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos. Afirmam ainda que a propriedade mais importante das lipases microbianas é sua estabilidade ao calor e que estas enzimas são responsáveis pelo desenvolvimento de odor rançoso em leite UAT.

SILVEIRA et al. (1998) ressaltam a importância dos microrganismos psicotróficos e de seus metabólitos, sobre a qualidade tanto do leite UAT, como de alguns tipos de queijos e que a hidrólise dos triglicérides pelas lipases bacterianas liberam ácidos graxos de cadeia curta como os ácidos butírico, capríco, caprílico e cáprico, responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite.

CARVALHO et al. (2003) afirmam que lipases catalizam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol (TAG), produzindo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres, e que lipases produzidas por alguns grupos de microrganismos, entre eles as corinebactérias, são lipases não específicas, o que significa que hidrolisam os TAG de maneira aleatória, produzindo ácidos graxos livres e glicerol dificultando a obtenção de produtos com as propriedades organolépticas e físico-químicas desejadas.

JOHNSON et al. (1992) em um estudo sobre a degradação dos triglicérides por *Pseudomonas* isoladas do leite, citam o gene lipA como codificador de uma enzima altamente lipolítica.

Em outro estudo sobre a secreção de proteases alcalinas em *Pseudomonas aeruginosa*, DUONG et al. (1992) concluem que este microrganismo tem uma característica própria, pois secreta uma variedade



grande de diferentes proteínas, como lipases, fosfolipases, protease alcalina, entre outras.

DIECKELMANN et al. (1998) estudando a diversidade de lipases em cepas de *Pseudomonas spp* citam a presença do gene lipA em *P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Burkholdeira spp*.

LIAO & McCALLUS (1998) relatam a presença do gene aprX como produtor de proteases extracelulares em microrganismos psicotróficos, mais especificamente em cepas de *Pseudomonas fluorescens*.

DUONG et al. (2001) também registraram a presença do gene aprX em microrganismos psicotróficos, especialmente em *Pseudomonas aeruginosa*.

MARTINEZ & SOBERON-CHAVEZ (2001) estudaram a caracterização do gene lipA codificando lipases em cepas de *P. aeruginosa*.

WOODS et al. (2001) relatam que os genes que codificam protease (aprX) e lípase (lipA) são encontrados em extremos opostos de um fragmento de DNA com características de operons.

Entretanto não há na literatura citações sobre o papel do *C. bovis* como microrganismo psicotrófico, bem como, se este agente apresenta os genes que codificam as proteínas com a capacidade de degradar lipídios e proteínas. Porém, existe uma possibilidade de que o agente em questão apresente estes genes em seu DNA, uma vez que o mesmo não está completamente seqüenciado.

## *Objetivos Gerais*

---

---

### 3. OBJETIVOS GERAIS

O processo de resfriamento do leite na propriedade rural controla a multiplicação bacteriana, aumentando assim o período de estocagem. Por outro lado, propicia condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos que podem produzir enzimas degradantes, prejudicando assim, a qualidade dos subprodutos da indústria de laticínios, armazenados por longo período de tempo.

O gênero *Corynebacterium* spp, segundo alguns autores, faz parte deste grupo de microrganismos, porém não se encontram na literatura, referências da multiplicação de *Corynebacterium bovis* em baixas temperaturas, bem como da produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas por este patógeno.

Em razão do exposto, foi proposto estudar este microrganismo, objetivando especialmente a compreensão da sua influência na qualidade dos produtos oferecidos ao consumo humano, levando-se em consideração a sua relevância como patógeno nas mastites.

## *Objetivos Específicos*

---

---

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se *Corynebacterium bovis* se desenvolve sob temperatura de refrigeração, e
2. Verificar a presença dos genes lipA e aprX no seu DNA.

## *Material e Métodos*

---

---

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento proposto foi realizado em duas etapas distintas. A primeira etapa consistiu no isolamento das cepas e na verificação do crescimento de *C. bovis* sob temperatura de refrigeração e foi realizada conforme descrito a seguir:

### **5.1. Isolamento das cepas de *Corynebacterium bovis*.**

Foram colhidas amostras de leite de vacas com mastite subclínica, de propriedades leiteiras do interior do estado de São Paulo, até a obtenção de 100 cepas de *C. bovis* em estado puro. As amostras foram obtidas após a realização do Califórnia Mastitis Test (CMT), segundo SCHALM & NOORLANDER (1957), para a detecção das glândulas mamárias com inflamação.

Após o descarte dos três jatos iniciais de leite, procedeu-se a desinfecção do óstio das tetas positivas ao CMT com reação três cruces (+++), com uma solução de álcool iodado a 5%. Em seguida colheu-se ao redor de 10 mL de leite em tubos de ensaio esterilizados, que foram identificados, mantidos em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, e encaminhados ao laboratório para o processamento.

No laboratório, semeou-se ao redor de 0,03 mL de leite de cada amostra, em placas de Petri contendo agar sangue ovino a 8%, e em placas com agar MacConkey. Em seguida incubou-se em estufa a 37°C, em condições de aerobiose, e a leitura foi realizada com 24, 48, 72 e 96 horas para a observação do crescimento do agente, ou de outros microrganismos causadores de mastites. No caso de suspeita de isolamento de *Corynebacterium spp* procedeu-se o estudo morfológico pela coloração de

Gram e repique do agente em meio de caldo cérebro coração enriquecido com 1% de Tween 80, com a incubação dos tubos por 24 a 48 horas para o isolamento do agente para sua caracterização bioquímica de acordo com QUINN et al. (2005), com a realização das seguintes provas: verificação da hemólise, hidrólise da esculina, redução de nitrato, digestão da caseína, uréase, glicose, maltose e sacarose.

Três amostras foram perdidas durante o processamento, totalizando 97 cepas estudadas.

### **5.2. Verificação do crescimento de *Corynebacterium bovis* sob temperatura de refrigeração.**

Nesta fase do experimento, colônias de cada cepa recém isolada foram ressuspendidas em tubos de ensaio contendo 5 mL meio de caldo cérebro coração (BHI) e 1% de Tween 80 (WATTS et al. 2000), até a obtenção da concentração bacteriana correspondente à escala 1 de McFarland ( $3 \times 10^8$  células bacterianas por mL).

Como controle negativo, utilizou-se uma solução pura de BHI com 1% de Tween 80, e como controle positivo, uma suspensão bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC – 10145 também na concentração 1 da escala de McFarland.

Foram preparadas 4 placas de ELISA estéreis com noventa e seis poços, fundo chato e tampa, identificadas como placas 1, 2, 3 e 4 para cada momento (M0 a M9) totalizando 40 placas. As placas de número 1 continham os controles negativo e positivo, bem como as amostras de 1 a 30, distribuídas da seguinte maneira: os orifícios A1, A2 e A3 receberam 100 µL da suspensão do controle positivo; os orifícios A4, A5 e A6, 100 µL da suspensão do controle



negativo, os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de cada amostra, sempre em triplicata a exemplo dos controles. As placas de número 2, 3 e 4, receberam as amostras de 31 a 62, 63 a 95 e 96 a 97 respectivamente, distribuídas como descrito acima.

Após a distribuição das amostras nas placas procedeu-se a leitura do primeiro conjunto de placas 1, 2, 3 e 4, em espectrofotômetro Multiskan EX – LabSystems® com filtro de 405 nm, correspondendo ao momento zero (M0). Os demais conjuntos de placas correspondentes os momentos M1 a M9 foram incubados em condições de aerobiose em temperaturas que variaram entre 0,7 e 4°C, em refrigerador comum destinado a essa finalidade.

A cada 24 horas e durante nove dias consecutivos foram realizadas leituras referentes a cada momento, após homogeneização cuidadosa das placas e remoção das gotículas de água formadas por condensação em virtude da diferença de temperatura entre as placas e o meio ambiente, remoção esta que foi feita com o auxílio de um bico de Bunsen.

A segunda fase do experimento consistiu na verificação da presença ou ausência dos genes *lipA* e *aprX* responsáveis pela produção de lipases e proteases bacterianas, respectivamente, por *C. bovis*, como segue:

### **5.3. Pesquisa da presença dos genes *lipA* e *aprX*, no DNA do *Corynebacterium bovis*.**

#### **5.3.1. Extração de DNA**

Para cada cepa isolada, bem como para os controles positivos e negativos, foi realizada a extração de DNA segundo NUNES et al. (1999), como segue:

---

® LabSystems

Foi transferido 1 mL da suspensão bacteriana na concentração 1 da escala de MacFarland, para tubos de Eppendorf de 1,5 mL. Em seguida, procedeu-se a centrifugação por quatro minutos a 2500 x g, e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL da solução tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8). A seguir, as células bacterianas foram ressuspensas em 100 µL de tampão TE, aquecidas a 100° C por 10 minutos em termobloco, resfriadas a 4°C e centrifugadas a 9000 x g por 30 segundos.

Após o término da extração, 60 µL de cada amostra foram analisados em espectrofotômetro GeneQuant Pro® para a quantificação do DNA extraído. Todas as amostras foram padronizadas para conter entre 85 e 95 µg/ml de DNA, incluindo os controles positivos.

O sobrenadante resultante do processo de extração foi transferido para microtubos e congelado a -20°C para posterior análise pela reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Como controles positivos para a presença dos genes lipA e aprX, foram utilizadas, respectivamente, cepas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC – 13032, e *Bacillus liqueniformis* ATCC – 14580 obtidas do Catálogo de Culturas Tropical, da Fundação André Tosello.

### **5.3.2. Amplificação do DNA e eletroforese em gel de agarose.**

### **5.3.3. Seqüências de oligonucleotídeos e amplificação do material genético.**

Para a pesquisa do gene lipA no DNA de *C. bovis* foram utilizadas as seguintes seqüências de oligonucleotídeos: lipA sense TGTCGCTGAGTCTGTTCGTGAG, lipA anti-sense

---

® Biochrom

GATGATGTCACAGCCAGCGTC e para a pesquisa do gene aprX, as seqüências: aprX sense GTGCACGAAGCGCTGACAATC e aprX anti-sense TTGCTCGGTGAAGGAGACGTTG, desenhados com o auxílio dos softwares Gene Runner 3.0, AnnHyb 4.920 e MEGA 3.1.

#### **5.4. Reação em cadeia pela polimerase.**

##### **5.4.1. Pesquisa do gene lipA em C. bovis.**

Cada microtubo de reação de 0,2 mL recebeu 5 µL de tampão de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 8,0 µL da solução de deoxinucleotídeos (1,25 mM), 1,5 U de taq-polimerase, 10 pM de cada primer descrito anteriormente, 10 µL de amostra e 15,2 µL de água ultrapura. A seguir os microtubos foram submetidos à desnaturação inicial a 92°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de reação consistindo de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, sendo a reação finalizada com extensão a 72°C por 3 minutos.

##### **5.4.2. Pesquisa do gene aprX no C. bovis.**

Foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o gene lipA, porém com a substituição pelos “primers” descritos acima.

#### **5.5. Eletroforese em gel de agarose para identificação dos produtos amplificados.**

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 5 µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA 0,5x. A corrida foi realizada a 100 voltz por 90 minutos. Após a corrida o gel foi corado em solução de brometo de etídeo por uma hora, e a visualização das

bandas realizada em transluminador ultravioleta, com filtro de 300 nm. Os géis foram fotografados utilizando-se sistema fotográfico Polaroid.

### ***5.6. Análise estatística.***

Para a análise estatística dos dados referentes à verificação da temperatura de crescimento do agente, foram utilizados os valores de média para cada amostra analisada. Primeiramente foi realizada uma análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas de tukey-kramer, com nível de significância de 0,05.

## *Resultados e Discussão*

---

---

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Verificação do crescimento do *C. bovis* em temperatura de refrigeração.

O quadro 1 expressa os valores de temperaturas aferidos no interior do refrigerador, no momento de cada leitura.

**Quadro 1.** Temperatura interna do refrigerador nos momentos M0 a M9 do experimento. Botucatu – SP. 2007.

Momentos	Temperatura em graus Celsius
M0	Temperatura ambiente
M1	2,0° C
M2	1,8° C
M3	3,1° C
M4	0,7° C
M5	4,0° C
M6	2,2° C
M7	2,8° C
M8	3,2° C
M9	2,5° C

Nas tabelas 1 a 33 estão expressos os resultados em valores de absorvância das amostras, das três repetições bem como da média para cada amostra de *Corynebacterium bovis* analisada.

**Tabela 1.** Valores de absorvância das três repetições e da média para os controles positivo, negativo e para a amostra 1 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	Pos.	Pos.	Pos.	Méd.	Neg.	Neg.	Neg.	Méd.	1	1	1	Méd.
M0	0,326	0,378	0,381	0,362	0,155	0,153	0,163	0,157	0,376	0,376	0,434	0,395
M1	0,311	0,370	0,396	0,359	0,161	0,166	0,169	0,165	0,381	0,350	0,374	0,368
M2	0,374	0,408	0,401	0,394	0,174	0,168	0,171	0,171	0,399	0,395	0,407	0,400
M3	0,402	0,418	0,418	0,413	0,159	0,161	0,157	0,159	0,406	0,412	0,427	0,415
M4	0,355	0,395	0,425	0,392	0,167	0,163	0,169	0,166	0,381	0,389	0,417	0,396
M5	0,397	0,458	0,453	0,436	0,167	0,162	0,163	0,164	0,376	0,372	0,385	0,378
M6	0,428	0,452	0,452	0,444	0,167	0,173	0,179	0,173	0,383	0,377	0,374	0,378
M7	0,445	0,435	0,467	0,449	0,158	0,163	0,167	0,163	0,354	0,356	0,361	0,357
M8	0,481	0,522	0,477	0,493	0,163	0,162	0,165	0,163	0,326	0,364	0,343	0,344
M9	0,407	0,481	0,466	0,451	0,158	0,153	0,160	0,157	0,261	0,308	0,291	0,287

Pos – controle positivo; Neg – controle negativo; Méd. – média; 1 – amostra 1 de *C. bovis*

**Tabela 2.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 2, 3 e 4 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	2	2	2	Méd.	3	3	3	Méd.	4	4	4	Méd.
M0	0,640	0,642	0,643	0,642	0,197	0,181	0,199	0,192	0,201	0,206	0,225	0,211
M1	0,622	0,621	0,622	0,622	0,181	0,190	0,200	0,190	0,195	0,232	0,220	0,216
M2	0,631	0,632	0,625	0,629	0,208	0,218	0,224	0,217	0,226	0,208	0,211	0,215
M3	0,631	0,640	0,641	0,637	0,197	0,223	0,226	0,215	0,215	0,203	0,188	0,202
M4	0,573	0,625	0,615	0,604	0,207	0,204	0,194	0,202	0,179	0,200	0,201	0,193
M5	0,579	0,614	0,583	0,592	0,174	0,198	0,196	0,189	0,180	0,182	0,184	0,182
M6	0,565	0,561	0,547	0,558	0,186	0,191	0,195	0,191	0,199	0,412	0,491	0,367
M7	0,574	0,521	0,553	0,549	0,198	0,195	0,211	0,201	0,470	0,511	0,450	0,477
M8	0,574	0,599	0,562	0,578	0,185	0,190	0,192	0,189	0,510	0,528	0,343	0,460
M9	0,526	0,462	0,464	0,484	0,292	0,292	0,320	0,301	0,198	0,405	0,426	0,343

**Tabela 3.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 5, 6 e 7 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	5	5	5	Méd.	6	6	6	Méd.	7	7	7	Méd.
M0	0,219	0,222	0,220	0,220	0,237	0,213	0,205	0,218	0,213	0,209	0,209	0,210
M1	0,217	0,222	0,224	0,221	0,235	0,245	0,238	0,239	0,215	0,225	0,227	0,222
M2	0,232	0,232	0,239	0,234	0,237	0,260	0,271	0,256	0,228	0,225	0,234	0,229
M3	0,247	0,253	0,248	0,249	0,257	0,241	0,240	0,246	0,234	0,237	0,245	0,239
M4	0,252	0,259	0,273	0,261	0,252	0,251	0,218	0,240	0,224	0,229	0,230	0,228
M5	0,224	0,230	0,234	0,229	0,237	0,234	0,230	0,234	0,223	0,241	0,242	0,235
M6	0,239	0,263	0,247	0,250	0,258	0,247	0,254	0,253	0,222	0,240	0,243	0,235
M7	0,247	0,257	0,260	0,255	0,265	0,273	0,270	0,269	0,228	0,253	0,251	0,244
M8	0,227	0,256	0,237	0,240	0,235	0,278	0,269	0,261	0,237	0,258	0,266	0,254
M9	0,295	0,325	0,323	0,314	0,362	0,330	0,343	0,345	0,286	0,278	0,276	0,280

**Tabela 4.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 8, 9 e 10 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	8	8	8	Méd.	9	9	9	Méd.	10	10	10	Méd.
M0	0,214	0,205	0,205	0,208	0,413	0,522	0,588	0,508	0,271	0,272	0,278	0,274
M1	0,222	0,236	0,228	0,229	0,431	0,422	0,422	0,425	0,262	0,328	0,333	0,308
M2	0,236	0,242	0,239	0,239	0,459	0,449	0,452	0,453	0,214	0,245	0,400	0,286
M3	0,252	0,253	0,262	0,256	0,475	0,475	0,481	0,477	0,223	0,208	0,311	0,247
M4	0,251	0,254	0,265	0,257	0,441	0,459	0,468	0,456	0,225	0,223	0,477	0,308
M5	0,277	0,266	0,257	0,267	0,466	0,459	0,473	0,466	0,280	0,273	0,356	0,303
M6	0,258	0,259	0,266	0,261	0,481	0,493	0,487	0,487	0,564	0,523	0,468	0,518
M7	0,271	0,268	0,264	0,268	0,471	0,478	0,471	0,473	0,557	0,633	0,624	0,605
M8	0,281	0,272	0,252	0,268	0,414	0,440	0,452	0,435	0,524	0,663	0,530	0,572
M9	0,308	0,318	0,335	0,320	0,426	0,428	0,432	0,429	0,204	0,252	0,312	0,256

**Tabela 5.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 11, 12 e 13 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	11	11	11	Méd.	12	12	12	Méd.	13	13	13	Méd.
M0	0,583	0,592	0,578	0,584	0,216	0,210	0,219	0,215	0,266	0,262	0,284	0,271
M1	0,620	0,637	0,626	0,628	0,204	0,214	0,210	0,209	0,191	0,250	0,244	0,228
M2	0,616	0,645	0,646	0,636	0,222	0,208	0,284	0,238	0,209	0,224	0,203	0,212
M3	0,627	0,665	0,646	0,646	0,312	0,232	0,227	0,257	0,213	0,238	0,246	0,232
M4	0,538	0,571	0,648	0,586	0,351	0,215	0,208	0,258	0,418	0,441	0,439	0,433
M5	0,618	0,680	0,650	0,649	0,352	0,255	0,436	0,348	0,210	0,212	0,216	0,213
M6	0,627	0,642	0,662	0,644	0,463	0,500	0,262	0,408	0,394	0,346	0,389	0,376
M7	0,598	0,643	0,636	0,626	0,423	0,481	0,501	0,468	0,564	0,464	0,580	0,536
M8	0,604	0,606	0,612	0,607	0,543	0,539	0,600	0,561	0,326	0,640	0,678	0,548
M9	0,583	0,549	0,599	0,577	0,542	0,588	0,533	0,554	0,190	0,182	0,178	0,183

**Tabela 6.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 14, 15 e 16 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	14	14	14	Méd.	15	15	15	Méd.	16	16	16	Méd.
M0	0,272	0,279	0,275	0,275	0,278	0,259	0,255	0,264	0,258	0,266	0,272	0,265
M1	0,234	0,233	0,257	0,241	0,313	0,306	0,300	0,306	0,297	0,289	0,288	0,291
M2	0,220	0,226	0,377	0,274	0,362	0,357	0,374	0,364	0,334	0,329	0,333	0,332
M3	0,229	0,225	0,228	0,227	0,352	0,371	0,389	0,371	0,341	0,338	0,327	0,335
M4	0,220	0,233	0,252	0,235	0,378	0,400	0,396	0,391	0,349	0,353	0,372	0,358
M5	0,211	0,253	0,217	0,227	0,415	0,414	0,415	0,415	0,368	0,360	0,364	0,364
M6	0,375	0,315	0,349	0,346	0,421	0,401	0,417	0,413	0,390	0,396	0,394	0,393
M7	0,317	0,622	0,381	0,440	0,452	0,481	0,470	0,468	0,397	0,400	0,427	0,408
M8	0,234	0,696	0,283	0,404	0,489	0,531	0,548	0,523	0,451	0,448	0,448	0,449
M9	0,260	0,238	0,232	0,243	0,278	0,402	0,431	0,370	0,491	0,504	0,515	0,503

**Tabela 7.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 17, 18 e 19 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	17	17	17	Méd.	18	18	18	Méd.	19	19	19	Méd.
M0	0,213	0,194	0,204	0,204	0,217	0,216	0,223	0,219	0,198	0,203	0,195	0,199
M1	0,201	0,207	0,264	0,224	0,191	0,205	0,213	0,203	0,200	0,205	0,194	0,200
M2	0,290	0,300	0,294	0,295	0,239	0,340	0,337	0,305	0,210	0,256	0,194	0,220
M3	0,281	0,286	0,300	0,289	0,180	0,200	0,201	0,194	0,288	0,284	0,294	0,289
M4	0,294	0,296	0,304	0,298	0,302	0,355	0,208	0,288	0,297	0,304	0,284	0,295
M5	0,307	0,292	0,293	0,297	0,189	0,190	0,191	0,190	0,264	0,308	0,313	0,295
M6	0,349	0,369	0,372	0,363	0,363	0,503	0,449	0,438	0,332	0,324	0,323	0,326
M7	0,294	0,301	0,310	0,302	0,228	0,387	0,451	0,355	0,168	0,333	0,336	0,279
M8	0,306	0,322	0,333	0,320	0,388	0,420	0,192	0,333	0,308	0,342	0,339	0,330
M9	0,306	0,272	0,293	0,290	0,262	0,271	0,186	0,240	0,221	0,195	0,209	0,208



**Tabela 8.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 20,21 e 22 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	20	20	20	Méd.	21	21	21	Méd.	22	22	22	Méd.
M0	0,220	0,226	0,230	0,225	0,233	0,250	0,237	0,240	0,204	0,196	0,212	0,204
M1	0,201	0,217	0,215	0,211	0,175	0,197	0,191	0,188	0,188	0,209	0,216	0,204
M2	0,216	0,241	0,228	0,228	0,294	0,288	0,296	0,293	0,206	0,221	0,230	0,219
M3	0,216	0,201	0,243	0,220	0,327	0,294	0,285	0,302	0,233	0,277	0,341	0,284
M4	0,364	0,231	0,373	0,323	0,304	0,296	0,304	0,301	0,290	0,326	0,349	0,322
M5	0,191	0,192	0,382	0,255	0,307	0,314	0,301	0,307	0,238	0,285	0,190	0,238
M6	0,382	0,371	0,213	0,322	0,378	0,387	0,430	0,398	0,416	0,433	0,244	0,364
M7	0,423	0,183	0,406	0,337	0,306	0,316	0,364	0,329	0,449	0,393	0,192	0,345
M8	0,401	0,290	0,180	0,290	0,352	0,337	0,335	0,341	0,367	0,401	0,357	0,375
M9	0,327	0,372	0,180	0,293	0,298	0,323	0,331	0,317	0,235	0,207	0,161	0,201

**Tabela 9.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 23,24 e 25 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	23	23	23	Méd.	24	24	24	Méd.	25	25	25	Méd.
M0	0,220	0,212	0,202	0,211	0,194	0,186	0,199	0,193	0,229	0,221	0,225	0,225
M1	0,215	0,212	0,225	0,217	0,173	0,237	0,186	0,199	0,205	0,206	0,196	0,202
M2	0,200	0,224	0,223	0,216	0,175	0,270	0,232	0,226	0,187	0,287	0,241	0,238
M3	0,208	0,204	0,230	0,214	0,277	0,258	0,269	0,268	0,287	0,304	0,287	0,293
M4	0,197	0,188	0,199	0,195	0,279	0,285	0,280	0,281	0,298	0,243	0,297	0,279
M5	0,188	0,239	0,194	0,207	0,185	0,278	0,278	0,247	0,295	0,300	0,289	0,295
M6	0,186	0,198	0,192	0,192	0,307	0,289	0,287	0,294	0,300	0,317	0,310	0,309
M7	0,193	0,184	0,181	0,186	0,301	0,309	0,306	0,305	0,307	0,339	0,344	0,330
M8	0,184	0,210	0,187	0,194	0,315	0,315	0,312	0,314	0,262	0,185	0,347	0,265
M9	0,205	0,240	0,203	0,216	0,215	0,204	0,152	0,190	0,182	0,171	0,176	0,176

**Tabela 10.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 26,27 e 28 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	26	26	26	Méd.	27	27	27	Méd.	28	28	28	Méd.
M0	0,230	0,222	0,220	0,224	0,215	0,201	0,204	0,207	0,197	0,201	0,211	0,203
M1	0,231	0,231	0,235	0,232	0,211	0,221	0,193	0,208	0,207	0,207	0,207	0,207
M2	0,246	0,243	0,256	0,248	0,218	0,241	0,204	0,221	0,206	0,208	0,201	0,205
M3	0,246	0,218	0,243	0,236	0,203	0,202	0,197	0,201	0,188	0,189	0,196	0,191
M4	0,252	0,250	0,280	0,261	0,185	0,193	0,185	0,188	0,212	0,191	0,184	0,196
M5	0,250	0,250	0,261	0,254	0,184	0,194	0,195	0,191	0,186	0,183	0,176	0,182
M6	0,299	0,309	0,253	0,287	0,185	0,197	0,190	0,191	0,180	0,189	0,188	0,186
M7	0,289	0,240	0,248	0,259	0,177	0,199	0,180	0,185	0,180	0,178	0,177	0,178
M8	0,228	0,227	0,208	0,221	0,233	0,330	0,203	0,255	0,177	0,174	0,175	0,175
M9	0,270	0,209	0,286	0,255	0,182	0,266	0,261	0,236	0,170	0,173	0,170	0,171

**Tabela 11.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 29,30 e 31 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	29	29	29	Méd.	30	30	30	Méd.	31	31	31	Méd.
M0	0,191	0,176	0,181	0,183	0,218	0,206	0,230	0,218	0,221	0,211	0,210	0,214
M1	0,161	0,172	0,166	0,166	0,192	0,217	0,214	0,208	0,201	0,185	0,177	0,188
M2	0,200	0,190	0,208	0,199	0,211	0,231	0,233	0,225	0,211	0,190	0,177	0,193
M3	0,240	0,291	0,196	0,242	0,185	0,232	0,192	0,203	0,196	0,201	0,200	0,199
M4	0,268	0,264	0,286	0,273	0,224	0,205	0,218	0,216	0,174	0,168	0,165	0,169
M5	0,181	0,281	0,264	0,242	0,209	0,196	0,213	0,206	0,184	0,239	0,191	0,205
M6	0,281	0,316	0,303	0,300	0,208	0,197	0,223	0,209	0,241	0,209	0,223	0,224
M7	0,298	0,300	0,320	0,306	0,219	0,176	0,170	0,188	0,172	0,203	0,191	0,189
M8	0,302	0,320	0,343	0,322	0,208	0,188	0,186	0,194	0,160	0,166	0,221	0,182
M9	0,369	0,307	0,308	0,328	0,181	0,225	0,235	0,214	0,149	0,225	0,146	0,173

**Tabela 12.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 32,33 e 34 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	32	32	32	Méd.	33	33	33	Méd.	34	34	34	Méd.
M0	0,376	0,404	0,397	0,392	0,225	0,221	0,227	0,224	0,257	0,266	0,270	0,264
M1	0,395	0,398	0,404	0,399	0,192	0,197	0,193	0,194	0,283	0,282	0,280	0,282
M2	0,428	0,426	0,405	0,420	0,183	0,187	0,185	0,185	0,318	0,307	0,294	0,306
M3	0,449	0,428	0,439	0,439	0,179	0,203	0,195	0,192	0,308	0,304	0,313	0,308
M4	0,378	0,491	0,458	0,442	0,178	0,198	0,182	0,186	0,315	0,296	0,299	0,303
M5	0,405	0,423	0,444	0,424	0,177	0,178	0,187	0,181	0,329	0,306	0,319	0,318
M6	0,420	0,400	0,395	0,405	0,170	0,190	0,186	0,182	0,336	0,304	0,297	0,312
M7	0,440	0,433	0,431	0,435	0,181	0,189	0,182	0,184	0,342	0,347	0,349	0,346
M8	0,490	0,456	0,550	0,499	0,177	0,174	0,171	0,174	0,345	0,426	0,402	0,391
M9	0,350	0,286	0,403	0,346	0,164	0,180	0,182	0,175	0,323	0,305	0,207	0,278

**Tabela 13.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 35,36 e 37 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	35	35	35	Méd.	36	36	36	Méd.	37	37	37	Méd.
M0	0,239	0,229	0,239	0,236	0,411	0,421	0,415	0,416	0,257	0,253	0,257	0,256
M1	0,222	0,292	0,229	0,248	0,397	0,421	0,422	0,413	0,264	0,280	0,286	0,277
M2	0,172	0,327	0,202	0,234	0,427	0,437	0,418	0,427	0,323	0,324	0,307	0,318
M3	0,185	0,213	0,210	0,203	0,632	0,463	0,446	0,514	0,341	0,347	0,331	0,340
M4	0,166	0,193	0,201	0,187	0,409	0,403	0,523	0,445	0,356	0,249	0,340	0,315
M5	0,211	0,205	0,203	0,206	0,343	0,412	0,449	0,401	0,359	0,374	0,327	0,353
M6	0,295	0,404	0,243	0,314	0,416	0,417	0,404	0,412	0,372	0,380	0,367	0,373
M7	0,207	0,292	0,399	0,299	0,342	0,401	0,385	0,376	0,452	0,445	0,428	0,442
M8	0,198	0,417	0,397	0,337	0,664	0,383	0,355	0,467	0,540	0,382	0,452	0,458
M9	0,185	0,184	0,200	0,190	0,405	0,322	0,425	0,384	0,225	0,177	0,582	0,328

**Tabela 14.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 38,39 e 40 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	38	38	38	Méd.	39	39	39	Méd.	40	40	40	Méd.
M0	0,238	0,206	0,228	0,224	0,241	0,248	0,250	0,246	0,238	0,246	0,232	0,239
M1	0,282	0,286	0,289	0,286	0,173	0,270	0,268	0,237	0,252	0,255	0,250	0,252
M2	0,259	0,231	0,313	0,268	0,263	0,302	0,298	0,288	0,271	0,280	0,285	0,279
M3	0,307	0,280	0,206	0,264	0,327	0,320	0,324	0,324	0,292	0,301	0,298	0,297
M4	0,346	0,321	0,301	0,323	0,353	0,349	0,243	0,315	0,325	0,313	0,312	0,317
M5	0,144	0,331	0,338	0,271	0,284	0,374	0,236	0,298	0,317	0,332	0,327	0,325
M6	0,309	0,344	0,311	0,321	0,396	0,403	0,369	0,389	0,382	0,398	0,398	0,393
M7	0,358	0,358	0,183	0,300	0,421	0,447	0,427	0,432	0,406	0,374	0,375	0,385
M8	0,415	0,273	0,256	0,315	0,472	0,342	0,390	0,401	0,248	0,437	0,428	0,371
M9	0,323	0,215	0,302	0,280	0,172	0,336	0,247	0,252	0,450	0,252	0,203	0,302

**Tabela 15.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 41,42 e 43 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	41	41	41	Méd.	42	42	42	Méd.	43	43	43	Méd.
M0	0,221	0,216	0,227	0,221	0,234	0,231	0,242	0,236	0,213	0,205	0,220	0,213
M1	0,182	0,183	0,194	0,186	0,252	0,269	0,261	0,261	0,232	0,234	0,231	0,232
M2	0,175	0,166	0,172	0,171	0,283	0,279	0,276	0,279	0,366	0,265	0,258	0,296
M3	0,177	0,168	0,178	0,174	0,280	0,273	0,272	0,275	0,280	0,299	0,284	0,288
M4	0,316	0,172	0,171	0,220	0,287	0,283	0,280	0,283	0,348	0,375	0,356	0,360
M5	0,182	0,185	0,194	0,187	0,300	0,272	0,275	0,282	0,454	0,341	0,338	0,378
M6	0,391	0,230	0,224	0,282	0,387	0,412	0,291	0,363	0,383	0,410	0,409	0,401
M7	0,324	0,342	0,343	0,336	0,376	0,382	0,321	0,360	0,418	0,412	0,396	0,409
M8	0,400	0,374	0,309	0,361	0,410	0,371	0,354	0,378	0,497	0,508	0,506	0,504
M9	0,377	0,379	0,294	0,350	0,328	0,412	0,413	0,384	0,301	0,510	0,537	0,449

**Tabela 16.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 44,45 e 46 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	44	44	44	Méd.	45	45	45	Méd.	46	46	46	Méd.
M0	0,506	0,528	0,508	0,514	0,391	0,371	0,366	0,376	0,248	0,251	0,261	0,253
M1	0,494	0,529	0,508	0,510	0,401	0,397	0,403	0,400	0,289	0,288	0,283	0,287
M2	0,522	0,493	0,518	0,511	0,471	0,413	0,43	0,438	0,296	0,302	0,302	0,300
M3	0,531	0,533	0,507	0,524	0,411	0,425	0,423	0,420	0,295	0,297	0,294	0,295
M4	0,505	0,499	0,518	0,507	0,414	0,423	0,428	0,422	0,316	0,304	0,312	0,311
M5	0,492	0,519	0,508	0,506	0,449	0,432	0,434	0,438	0,334	0,319	0,317	0,323
M6	0,525	0,547	0,540	0,537	0,480	0,474	0,471	0,475	0,436	0,455	0,323	0,405
M7	0,464	0,490	0,482	0,479	0,404	0,409	0,397	0,403	0,411	0,417	0,338	0,389
M8	0,460	0,491	0,475	0,475	0,365	0,345	0,376	0,362	0,403	0,381	0,354	0,379
M9	0,415	0,512	0,455	0,461	0,356	0,366	0,352	0,358	0,240	0,249	0,363	0,284

**Tabela 17.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 47,48 e 49 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	47	47	47	Méd.	48	48	48	Méd.	49	49	49	Méd.
M0	0,376	0,397	0,391	0,388	0,366	0,366	0,387	0,373	0,244	0,241	0,239	0,241
M1	0,467	0,437	0,430	0,445	0,355	0,362	0,341	0,353	0,231	0,245	0,220	0,232
M2	0,442	0,427	0,420	0,430	0,335	0,355	0,358	0,349	0,275	0,276	0,257	0,269
M3	0,434	0,472	0,459	0,455	0,383	0,377	0,362	0,374	0,278	0,279	0,291	0,283
M4	0,434	0,454	0,463	0,450	0,326	0,379	0,350	0,352	0,174	0,273	0,272	0,240
M5	0,421	0,444	0,443	0,436	0,345	0,345	0,349	0,346	0,180	0,277	0,251	0,236
M6	0,458	0,521	0,451	0,477	0,387	0,353	0,376	0,372	0,353	0,359	0,342	0,351
M7	0,528	0,470	0,456	0,485	0,357	0,349	0,347	0,351	0,197	0,277	0,249	0,241
M8	0,475	0,503	0,470	0,483	0,293	0,327	0,324	0,315	0,189	0,202	0,191	0,194
M9	0,563	0,532	0,541	0,545	0,324	0,316	0,340	0,327	0,189	0,205	0,262	0,219

**Tabela 18.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 50,51 e 52 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	50	50	50	Méd.	51	51	51	Méd.	52	52	52	Méd.
M0	0,223	0,219	0,221	0,221	0,201	0,190	0,184	0,192	0,305	0,300	0,294	0,300
M1	0,178	0,188	0,198	0,188	0,173	0,178	0,176	0,176	0,292	0,288	0,277	0,286
M2	0,172	0,187	0,181	0,180	0,173	0,183	0,179	0,178	0,304	0,296	0,303	0,301
M3	0,189	0,217	0,234	0,213	0,188	0,199	0,198	0,195	0,318	0,333	0,317	0,323
M4	0,186	0,182	0,179	0,182	0,184	0,178	0,179	0,180	0,299	0,314	0,296	0,303
M5	0,204	0,194	0,205	0,201	0,184	0,182	0,178	0,181	0,283	0,308	0,298	0,296
M6	0,318	0,276	0,185	0,260	0,173	0,284	0,271	0,243	0,274	0,290	0,308	0,291
M7	0,301	0,298	0,259	0,286	0,188	0,197	0,185	0,190	0,260	0,281	0,269	0,270
M8	0,289	0,317	0,250	0,285	0,174	0,254	0,267	0,232	0,304	0,279	0,256	0,280
M9	0,242	0,245	0,210	0,232	0,168	0,179	0,191	0,179	0,256	0,212	0,265	0,244

**Tabela 19.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 53,54 e 55 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	53	53	53	Méd.	54	54	54	Méd.	55	55	55	Méd.
M0	0,196	0,180	0,181	0,186	0,198	0,203	0,207	0,203	0,202	0,200	0,204	0,202
M1	0,176	0,179	0,177	0,177	0,182	0,194	0,185	0,187	0,184	0,207	0,203	0,198
M2	0,165	0,178	0,177	0,173	0,180	0,187	0,186	0,184	0,172	0,193	0,187	0,184
M3	0,182	0,194	0,191	0,189	0,193	0,202	0,212	0,202	0,202	0,193	0,193	0,196
M4	0,183	0,170	0,177	0,177	0,178	0,212	0,198	0,196	0,165	0,193	0,181	0,180
M5	0,166	0,174	0,176	0,172	0,179	0,190	0,201	0,190	0,178	0,180	0,185	0,181
M6	0,242	0,227	0,301	0,257	0,333	0,367	0,197	0,299	0,164	0,215	0,214	0,198
M7	0,168	0,179	0,195	0,181	0,198	0,233	0,209	0,213	0,241	0,238	0,280	0,253
M8	0,167	0,168	0,180	0,172	0,248	0,237	0,186	0,224	0,191	0,187	0,174	0,184
M9	0,166	0,173	0,181	0,173	0,194	0,178	0,193	0,188	0,235	0,254	0,226	0,238

**Tabela 20.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 56,57 e 58 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	56	56	56	Méd.	57	57	57	Méd.	58	58	58	Méd.
M0	0,252	0,243	0,251	0,249	0,287	0,327	0,407	0,340	0,219	0,215	0,222	0,219
M1	0,241	0,241	0,237	0,240	0,912	0,431	0,387	0,577	0,197	0,210	0,212	0,206
M2	0,240	0,244	0,239	0,241	0,398	0,344	0,309	0,350	0,192	0,231	0,227	0,217
M3	0,262	0,262	0,255	0,260	0,422	0,321	0,531	0,425	0,215	0,224	0,227	0,222
M4	0,250	0,247	0,244	0,247	0,331	0,359	0,339	0,343	0,207	0,237	0,219	0,221
M5	0,247	0,240	0,260	0,249	0,337	0,378	0,371	0,362	0,237	0,217	0,210	0,221
M6	0,246	0,237	0,240	0,241	0,332	0,482	0,529	0,448	0,477	0,443	0,334	0,418
M7	0,249	0,251	0,253	0,251	0,307	0,349	0,344	0,333	0,225	0,238	0,230	0,231
M8	0,249	0,270	0,225	0,248	0,294	0,304	0,304	0,301	0,212	0,213	0,202	0,209
M9	0,222	0,208	0,474	0,301	0,324	0,258	0,295	0,292	0,197	0,192	0,217	0,202

**Tabela 21.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 59,60 e 61 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	59	59	59	Méd.	60	60	60	Méd.	61	61	61	Méd.
M0	0,200	0,199	0,197	0,199	0,271	0,266	0,257	0,265	0,217	0,194	0,194	0,202
M1	0,206	0,213	0,239	0,219	0,257	0,260	0,251	0,256	0,254	0,207	0,209	0,223
M2	0,206	0,208	0,197	0,204	0,264	0,268	0,270	0,267	0,194	0,195	0,201	0,197
M3	0,218	0,210	0,215	0,214	0,272	0,257	0,275	0,268	0,198	0,203	0,195	0,199
M4	0,166	0,187	0,191	0,181	0,257	0,279	0,282	0,273	0,209	0,217	0,221	0,216
M5	0,213	0,196	0,196	0,202	0,250	0,280	0,270	0,267	0,211	0,207	0,199	0,206
M6	0,198	0,191	0,189	0,193	0,277	0,279	0,264	0,273	0,192	0,188	0,339	0,240
M7	0,186	0,207	0,191	0,195	0,259	0,260	0,263	0,261	0,180	0,194	0,195	0,190
M8	0,161	0,177	0,183	0,174	0,253	0,253	0,236	0,247	0,226	0,189	0,190	0,202
M9	0,151	0,155	0,167	0,158	0,246	0,248	0,240	0,245	0,135	0,162	0,175	0,157

**Tabela 22.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 62,63 e 64 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	62	62	62	Méd.	63	63	63	Méd.	64	64	64	Méd.
M0	0,189	0,189	0,183	0,187	0,193	0,190	0,200	0,194	0,229	0,224	0,237	0,230
M1	0,176	0,182	0,178	0,179	0,264	0,265	0,245	0,258	0,224	0,214	0,205	0,214
M2	0,201	0,190	0,177	0,189	0,262	0,263	0,197	0,241	0,219	0,219	0,225	0,221
M3	0,175	0,187	0,190	0,184	0,259	0,241	0,263	0,254	0,178	0,175	0,198	0,184
M4	0,220	0,203	0,198	0,207	0,226	0,254	0,254	0,245	0,216	0,199	0,170	0,195
M5	0,170	0,183	0,185	0,179	0,197	0,248	0,240	0,228	0,189	0,180	0,169	0,179
M6	0,345	0,184	0,172	0,234	0,199	0,267	0,207	0,224	0,184	0,180	0,199	0,188
M7	0,159	0,179	0,183	0,174	0,191	0,261	0,265	0,239	0,184	0,177	0,169	0,177
M8	0,173	0,172	0,175	0,173	0,164	0,224	0,257	0,215	0,172	0,173	0,173	0,173
M9	0,167	0,165	0,178	0,170	0,210	0,284	0,263	0,252	0,190	0,182	0,234	0,202

**Tabela 23.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 65,66 e 67 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	65	65	65	Méd.	66	66	66	Méd.	67	67	67	Méd.
M0	0,395	0,393	0,379	0,389	0,376	0,385	0,405	0,389	0,193	0,191	0,192	0,192
M1	0,379	0,391	0,382	0,384	0,359	0,365	0,366	0,363	0,219	0,184	0,184	0,196
M2	0,384	0,386	0,388	0,386	0,370	0,383	0,378	0,377	0,183	0,244	0,174	0,200
M3	0,368	0,376	0,377	0,374	0,361	0,371	0,367	0,366	0,172	0,254	0,221	0,216
M4	0,391	0,383	0,378	0,384	0,344	0,382	0,371	0,366	0,164	0,248	0,228	0,213
M5	0,354	0,371	0,368	0,364	0,341	0,479	0,223	0,348	0,152	0,238	0,240	0,210
M6	0,351	0,368	0,349	0,356	0,351	0,382	0,362	0,365	0,158	0,230	0,238	0,209
M7	0,340	0,329	0,336	0,335	0,288	0,296	0,345	0,310	0,177	0,245	0,245	0,222
M8	0,308	0,305	0,287	0,300	0,295	0,384	0,297	0,325	0,166	0,191	0,179	0,179
M9	0,267	0,284	0,237	0,263	0,317	0,299	0,330	0,315	0,211	0,269	0,181	0,220

**Tabela 24.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 68,69 e 70 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	68	68	68	Méd.	69	69	69	Méd.	70	70	70	Méd.
M0	0,226	0,223	0,236	0,228	0,331	0,312	0,315	0,319	0,231	0,228	0,243	0,234
M1	0,214	0,217	0,205	0,212	0,352	0,311	0,305	0,323	0,217	0,212	0,235	0,221
M2	0,211	0,222	0,229	0,221	0,331	0,318	0,272	0,307	0,230	0,240	0,247	0,239
M3	0,193	0,201	0,198	0,197	0,304	0,317	0,313	0,311	0,232	0,255	0,247	0,245
M4	0,198	0,210	0,236	0,215	0,300	0,317	0,316	0,311	0,258	0,258	0,231	0,249
M5	0,193	0,192	0,197	0,194	0,308	0,307	0,310	0,308	0,259	0,256	0,239	0,251
M6	0,218	0,245	0,236	0,233	0,312	0,319	0,313	0,315	0,234	0,235	0,233	0,234
M7	0,174	0,177	0,176	0,176	0,266	0,262	0,266	0,265	0,250	0,244	0,233	0,242
M8	0,172	0,185	0,170	0,176	0,264	0,224	0,278	0,255	0,253	0,259	0,261	0,258
M9	0,170	0,171	0,166	0,169	0,257	0,279	0,264	0,267	0,231	0,207	0,246	0,228

**Tabela 25.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 71,72 e 73 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	71	71	71	Méd.	72	72	72	Méd.	73	73	73	Méd.
M0	0,221	0,221	0,240	0,227	0,195	0,187	0,175	0,186	0,233	0,228	0,244	0,235
M1	0,241	0,253	0,238	0,244	0,173	0,192	0,191	0,185	0,247	0,259	0,264	0,257
M2	0,217	0,252	0,241	0,237	0,183	0,183	0,175	0,180	0,263	0,255	0,258	0,259
M3	0,205	0,262	0,255	0,241	0,182	0,183	0,168	0,178	0,261	0,263	0,260	0,261
M4	0,238	0,267	0,263	0,256	0,175	0,168	0,166	0,170	0,265	0,271	0,263	0,266
M5	0,228	0,269	0,256	0,251	0,212	0,203	0,188	0,201	0,274	0,279	0,277	0,277
M6	0,233	0,252	0,259	0,248	0,175	0,189	0,191	0,185	0,286	0,292	0,270	0,283
M7	0,241	0,253	0,244	0,246	0,164	0,157	0,156	0,159	0,298	0,304	0,308	0,303
M8	0,223	0,264	0,230	0,239	0,172	0,158	0,168	0,166	0,304	0,325	0,300	0,310
M9	0,209	0,211	0,210	0,210	0,178	0,157	0,153	0,163	0,320	0,352	0,336	0,336

**Tabela 26.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 74,75 e 76 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	74	74	74	Méd.	75	75	75	Méd.	76	76	76	Méd.
M0	0,207	0,210	0,206	0,208	0,364	0,364	0,361	0,363	0,205	0,207	0,202	0,205
M1	0,215	0,213	0,214	0,214	0,357	0,332	0,329	0,339	0,214	0,216	0,209	0,213
M2	0,220	0,223	0,218	0,220	0,311	0,343	0,340	0,331	0,216	0,214	0,213	0,214
M3	0,220	0,227	0,225	0,224	0,343	0,365	0,340	0,349	0,214	0,223	0,220	0,219
M4	0,225	0,232	0,233	0,230	0,288	0,341	0,344	0,324	0,216	0,222	0,221	0,220
M5	0,233	0,239	0,230	0,234	0,312	0,356	0,356	0,341	0,207	0,217	0,208	0,211
M6	0,202	0,218	0,207	0,209	0,319	0,334	0,315	0,323	0,186	0,209	0,203	0,199
M7	0,219	0,227	0,207	0,218	0,274	0,336	0,311	0,307	0,190	0,181	0,178	0,183
M8	0,208	0,243	0,229	0,227	0,264	0,363	0,310	0,312	0,177	0,170	0,164	0,170
M9	0,185	0,189	0,184	0,186	0,231	0,255	0,241	0,242	0,160	0,156	0,172	0,163

**Tabela 27.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 77,78 e 79 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	77	77	77	Méd.	78	78	78	Méd.	79	79	79	Méd.
M0	0,212	0,207	0,209	0,209	0,204	0,204	0,213	0,207	0,221	0,206	0,213	0,213
M1	0,233	0,235	0,225	0,231	0,218	0,217	0,222	0,219	0,188	0,194	0,202	0,195
M2	0,234	0,244	0,235	0,238	0,229	0,228	0,226	0,228	0,211	0,219	0,222	0,217
M3	0,247	0,254	0,252	0,251	0,242	0,240	0,234	0,239	0,195	0,212	0,211	0,206
M4	0,233	0,247	0,240	0,240	0,241	0,238	0,242	0,240	0,208	0,238	0,225	0,224
M5	0,259	0,266	0,266	0,264	0,258	0,224	0,246	0,243	0,182	0,215	0,207	0,201
M6	0,260	0,267	0,256	0,261	0,257	0,250	0,247	0,251	0,182	0,214	0,220	0,205
M7	0,282	0,266	0,259	0,269	0,281	0,279	0,271	0,277	0,175	0,195	0,191	0,187
M8	0,261	0,289	0,275	0,275	0,313	0,309	0,288	0,303	0,188	0,208	0,194	0,197
M9	0,296	0,262	0,269	0,276	0,264	0,280	0,206	0,250	0,197	0,181	0,284	0,221

**Tabela 28.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 80,81 e 82 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	80	80	80	Méd.	81	81	81	Méd.	82	82	82	Méd.
M0	0,315	0,316	0,308	0,313	0,170	0,160	0,164	0,165	0,217	0,229	0,220	0,222
M1	0,301	0,306	0,298	0,302	0,141	0,151	0,153	0,148	0,195	0,214	0,197	0,202
M2	0,313	0,334	0,338	0,328	0,158	0,166	0,162	0,162	0,207	0,226	0,225	0,219
M3	0,310	0,328	0,319	0,319	0,150	0,152	0,152	0,151	0,203	0,195	0,200	0,199
M4	0,335	0,334	0,334	0,334	0,170	0,164	0,154	0,163	0,186	0,228	0,205	0,206
M5	0,297	0,330	0,312	0,313	0,148	0,147	0,150	0,148	0,189	0,168	0,188	0,182
M6	0,316	0,334	0,328	0,326	0,149	0,148	0,145	0,147	0,206	0,199	0,189	0,198
M7	0,295	0,334	0,322	0,317	0,129	0,136	0,135	0,133	0,183	0,167	0,159	0,170
M8	0,307	0,317	0,316	0,313	0,144	0,144	0,125	0,138	0,214	0,219	0,181	0,205
M9	0,292	0,301	0,294	0,296	0,162	0,150	0,154	0,155	0,187	0,153	0,152	0,164

**Tabela 29.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 83,84 e 85 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	83	83	83	Méd.	84	84	84	Méd.	85	85	85	Méd.
M0	0,181	0,167	0,168	0,172	0,145	0,151	0,152	0,149	0,298	0,298	0,309	0,302
M1	0,169	0,166	0,170	0,168	0,170	0,145	0,152	0,156	0,266	0,271	0,274	0,270
M2	0,156	0,175	0,179	0,170	0,152	0,163	0,143	0,153	0,234	0,295	0,293	0,274
M3	0,151	0,171	0,167	0,163	0,152	0,141	0,134	0,142	0,252	0,285	0,268	0,268
M4	0,173	0,183	0,166	0,174	0,157	0,161	0,139	0,152	0,216	0,296	0,284	0,265
M5	0,148	0,168	0,172	0,163	0,153	0,151	0,138	0,147	0,235	0,283	0,273	0,264
M6	0,163	0,180	0,167	0,170	0,164	0,161	0,158	0,161	0,242	0,271	0,256	0,256
M7	0,138	0,167	0,163	0,156	0,149	0,137	0,135	0,140	0,186	0,247	0,249	0,227
M8	0,154	0,165	0,159	0,159	0,147	0,145	0,149	0,147	0,208	0,217	0,209	0,211
M9	0,159	0,171	0,150	0,160	0,201	0,136	0,147	0,161	0,215	0,216	0,212	0,214

**Tabela 30.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 86,87 e 88 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	86	86	86	Méd.	87	87	87	Méd.	88	88	88	Méd.
M0	0,497	0,483	0,471	0,484	0,198	0,19	0,188	0,192	0,211	0,204	0,208	0,208
M1	0,433	0,454	0,446	0,444	0,179	0,197	0,197	0,191	0,177	0,204	0,205	0,195
M2	0,424	0,464	0,475	0,454	0,181	0,202	0,201	0,195	0,188	0,221	0,206	0,205
M3	0,416	0,464	0,459	0,446	0,178	0,202	0,195	0,192	0,213	0,206	0,200	0,206
M4	0,452	0,479	0,457	0,463	0,185	0,202	0,213	0,200	0,194	0,213	0,196	0,201
M5	0,385	0,467	0,454	0,435	0,164	0,186	0,187	0,179	0,186	0,211	0,212	0,203
M6	0,386	0,486	0,477	0,450	0,161	0,190	0,182	0,178	0,174	0,193	0,196	0,188
M7	0,441	0,450	0,455	0,449	0,148	0,164	0,161	0,158	0,169	0,183	0,178	0,177
M8	0,400	0,495	0,437	0,444	0,159	0,158	0,154	0,157	0,169	0,187	0,183	0,180
M9	0,398	0,385	0,379	0,387	0,161	0,158	0,163	0,161	0,169	0,171	0,176	0,172

**Tabela 31.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 89,90 e 91 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	89	89	89	Méd.	90	90	90	Méd.	91	91	91	Méd.
M0	0,170	0,172	0,179	0,174	0,373	0,327	0,319	0,340	0,144	0,133	0,139	0,139
M1	0,164	0,161	0,155	0,160	0,336	0,311	0,309	0,319	0,138	0,137	0,131	0,135
M2	0,158	0,167	0,166	0,164	0,331	0,319	0,334	0,328	0,155	0,142	0,147	0,148
M3	0,149	0,165	0,166	0,160	0,326	0,317	0,301	0,315	0,128	0,142	0,140	0,137
M4	0,159	0,157	0,162	0,159	0,326	0,315	0,314	0,318	0,139	0,148	0,141	0,143
M5	0,154	0,152	0,159	0,155	0,327	0,317	0,307	0,317	0,133	0,129	0,139	0,134
M6	0,161	0,157	0,149	0,156	0,333	0,320	0,325	0,326	0,120	0,135	0,137	0,131
M7	0,146	0,148	0,147	0,147	0,318	0,305	0,300	0,308	0,127	0,134	0,134	0,132
M8	0,146	0,151	0,150	0,149	0,291	0,295	0,298	0,295	0,127	0,125	0,121	0,124
M9	0,147	0,164	0,143	0,151	0,255	0,261	0,279	0,265	0,127	0,130	0,130	0,129



**Tabela 32.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 92,93 e 94 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

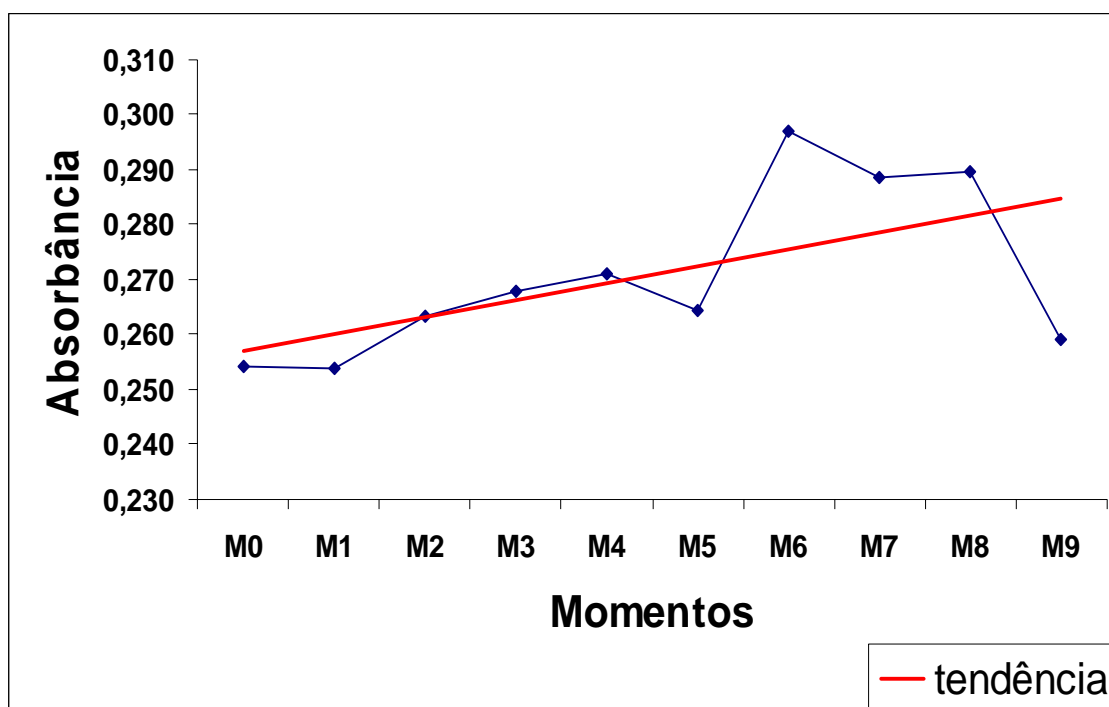
Momentos	Amostras											
	92	92	92	Méd.	93	93	93	Méd.	94	94	94	Méd.
M0	0,29	0,294	0,276	0,287	0,151	0,153	0,155	0,153	0,166	0,168	0,178	0,171
M1	0,274	0,283	0,281	0,279	0,150	0,145	0,151	0,149	0,163	0,166	0,169	0,166
M2	0,283	0,299	0,291	0,291	0,147	0,147	0,147	0,147	0,153	0,172	0,169	0,165
M3	0,250	0,262	0,270	0,261	0,143	0,136	0,151	0,143	0,163	0,168	0,166	0,166
M4	0,173	0,280	0,297	0,250	0,133	0,152	0,146	0,144	0,163	0,173	0,165	0,167
M5	0,255	0,274	0,285	0,271	0,125	0,157	0,148	0,143	0,165	0,148	0,157	0,157
M6	0,288	0,267	0,279	0,278	0,136	0,144	0,139	0,140	0,143	0,155	0,148	0,149
M7	0,250	0,253	0,263	0,255	0,120	0,145	0,142	0,136	0,157	0,146	0,145	0,149
M8	0,243	0,267	0,275	0,262	0,118	0,140	0,143	0,134	0,149	0,144	0,144	0,146
M9	0,237	0,215	0,227	0,226	0,110	0,135	0,133	0,126	0,131	0,144	0,144	0,140

**Tabela 33.** Valores de absorvância, das três repetições e da média para as amostras 95,96 e 97 de *C. bovis*, nos momentos M0 a M9. Botucatu, 2007.

Momentos	Amostras											
	95	95	95	Méd.	96	96	96	Méd.	97	97	97	Méd.
M0	0,158	0,171	0,166	0,165	0,177	0,297	0,167	0,214	0,179	0,184	0,178	0,180
M1	0,162	0,161	0,148	0,157	0,132	0,144	0,134	0,137	0,170	0,166	0,168	0,168
M2	0,140	0,145	0,139	0,141	0,143	0,147	0,137	0,142	0,162	0,161	0,156	0,160
M3	0,141	0,160	0,158	0,153	0,143	0,161	0,163	0,156	0,176	0,169	0,159	0,168
M4	0,148	0,142	0,151	0,147	0,143	0,122	0,139	0,135	0,152	0,150	0,149	0,150
M5	0,132	0,142	0,140	0,138	0,128	0,143	0,123	0,131	0,149	0,145	0,131	0,142
M6	0,134	0,144	0,143	0,140	0,150	0,139	0,132	0,140	0,149	0,141	0,137	0,142
M7	0,159	0,145	0,142	0,149	0,135	0,147	0,140	0,141	0,149	0,145	0,121	0,138
M8	0,100	0,117	0,097	0,105	0,110	0,126	0,120	0,119	0,125	0,143	0,101	0,123
M9	0,058	0,099	0,085	0,081	0,095	0,097	0,093	0,095	0,106	0,106	0,116	0,109

Segundo as leis da física propostas por Lambert-Beer, existe uma relação direta entre a absorvância e a concentração do soluto em uma solução, quando se realizam leituras em espectrofotômetro, portanto pode-se inferir que quanto maiores aqueles valores, maior será a concentração bacteriana na amostra.

A figura 1 e a tabela 3 expressam os resultados relativos aos valores de absorvância onde se pode observar uma tendência para a concentração bacteriana nos diferentes momentos analisados.



**Figura 1.** Médias dos valores de absorbância das noventa e sete amostras estudadas, nos momentos M0 a M9. Botucatu – SP. 2007.

**Tabela 34.** Análise estatística com média e desvio padrão das noventa e sete amostras analisadas, nos momentos M0 a M9. Botucatu – SP. 2007.

Momentos	Média	Desvio padrão
M0	0,254 <sup>a</sup>	+/-0,092
M1	0,254 <sup>a</sup>	+/-0,098
M2	0,263 <sup>a</sup>	+/-0,096
M3	0,268 <sup>a</sup>	+/-0,101
M4	0,271 <sup>a</sup>	+/-0,097
M5	0,264 <sup>a</sup>	+/-0,098
M6	0,297 <sup>b</sup>	+/-0,107
M7	0,289 <sup>b</sup>	+/-0,115
M8	0,290 <sup>b</sup>	+/-0,122
M9	0,259 <sup>a</sup>	+/-0,101

<sup>ab</sup> Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa para um nível de significância de 0,05.

Estes resultados mostram que até o momento 5 (M5), houve uma pequena tendência de desenvolvimento de *C. bovis*, porém sem significado estatístico, com  $p < 0,05$ . Já a partir do momento M5 até M8, houve um crescimento estatisticamente significativo, com  $p > 0,05$ .

O crescimento pouco significativo das amostras nos primeiros momentos do experimento pode estar relacionado com a adaptação do agente à temperatura de incubação utilizada, ou ainda pelo “stress” promovido às células bacterianas devido à brusca alteração de temperatura a que foram submetidas entre os momentos M0 e M1.

No entanto, após a fase de adaptação, houve uma multiplicação significativa do agente o que pode confirmar a hipótese de que o *Corynebacterium bovis* se multiplica em temperatura de refrigeração, e que longos períodos de armazenagem a baixas temperaturas antes de seu processamento na indústria, pode favorecer a multiplicação deste microrganismo (CHEN et al. 2003).

Ao final desta fase do experimento, ou seja, entre os momentos M8 e M9 houve uma redução estatisticamente significativa nos valores médios de absorvância nas amostras. Este fato pode estar relacionado com a ruptura das células bacterianas após intensa multiplicação dos microrganismos em que os produtos do metabolismo bacteriano atingiram um nível de toxicidade capaz de promover a morte destas bactérias.

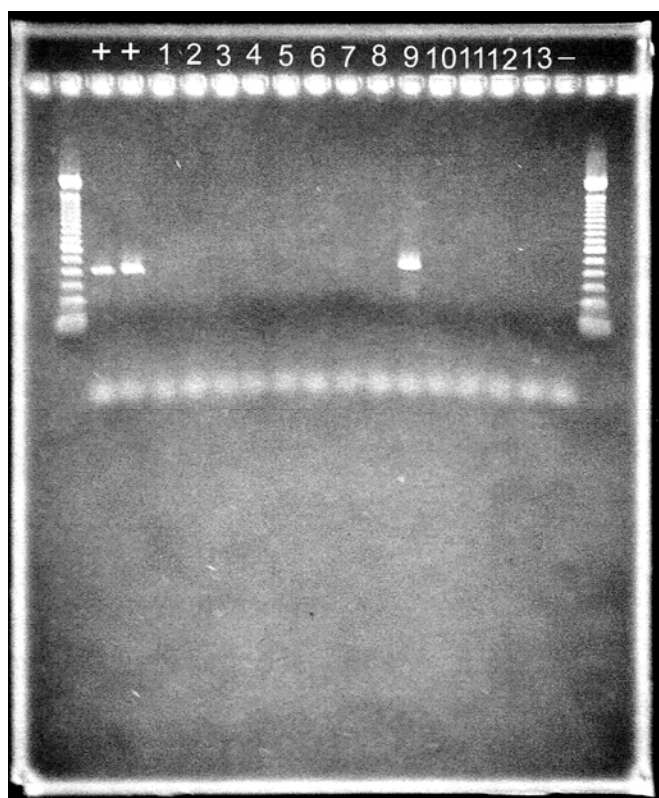
Os dados obtidos no presente experimento são contrários aos de BRAMLEY & MCKINNON (1990) que afirmaram não haver evidências de que o *C. bovis* seja um microrganismo psicrófilo, mas sim que a presença deste agente está relacionada a uma contaminação ambiental inicial muito alta, como aquelas encontradas em sistemas de ordenha com problemas de higiene. São contrários ainda aos de FARIA (1986) e SANTOS et al. (1999) que não consideram sua capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração.

Por outro lado DOMMETT (1992) afirma que os microrganismos psicotróficos mais encontrados após os processos de pasteurização, são os corineformes.

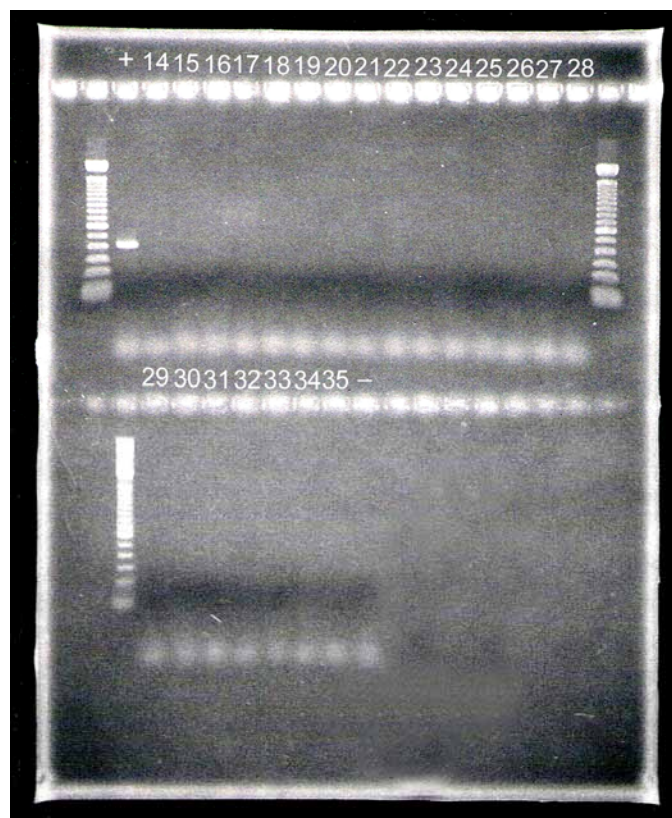
Da mesma forma THOMAS (1966); SORHAUG & STEPANIAK (1997); SANTANA et al. (2001) e CHEN et al. (2003) referiram que microrganismos do gênero *Corynebacterium* spp se multiplicam sob temperatura de refrigeração e corroboram com o presente estudo, permitindo-se nestas condições, afirmar que *Corynebacterium bovis* é um microrganismo psicotrófico.

### **6.2. Pesquisa dos genes *lipA* e *aprX* no DNA do *C. bovis*.**

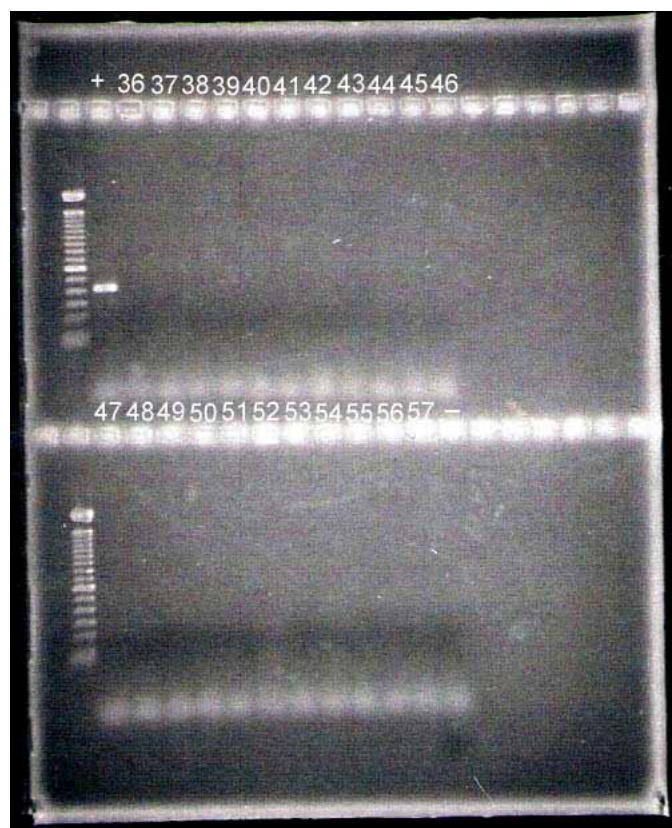
Os resultados da pesquisa dos genes *lipA* estão expressos nas figuras 2 a 6, que mostram ainda o resultado das amostras utilizadas como controle positivo e negativo.



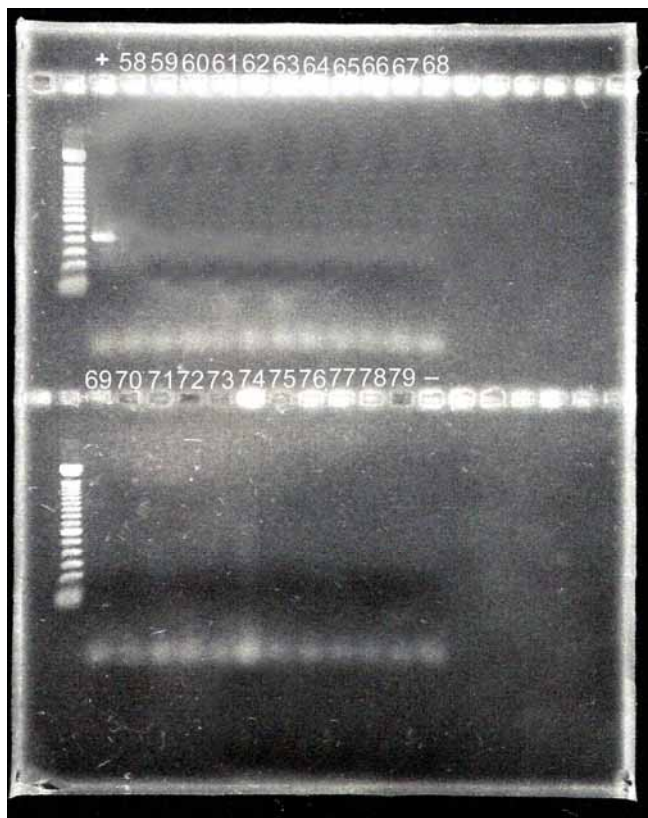
**Figura 2.** (+) *C. glutamicum* 397bp; 1 a 13 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



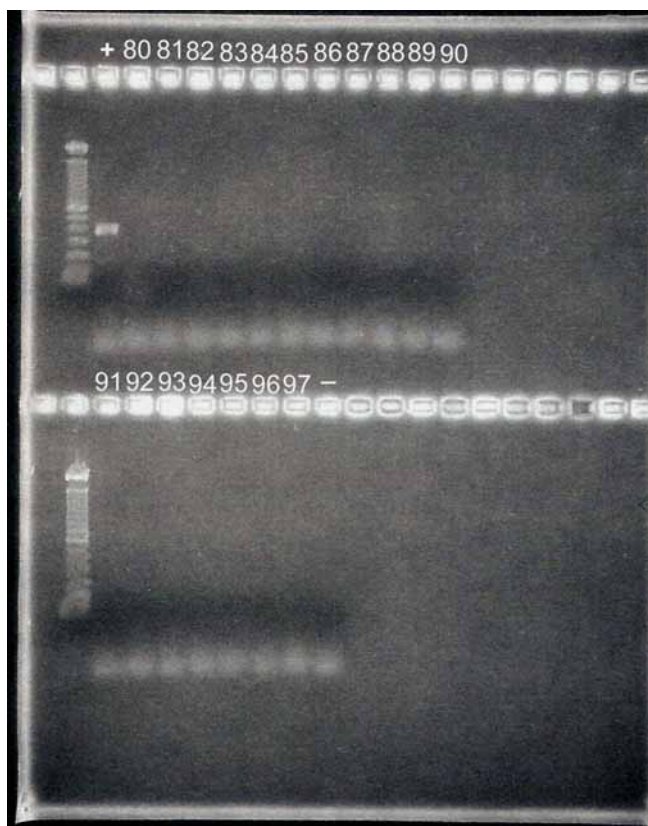
**Figura 3.** (+) *C. glutamicum* 397bp; 14 a 35 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



**Figura 4.** (+) *C. glutamicum* 397bp; 36 a 57 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



**Figura 5.** (+) *C. glutamicum* 397bp; 58 a 79 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



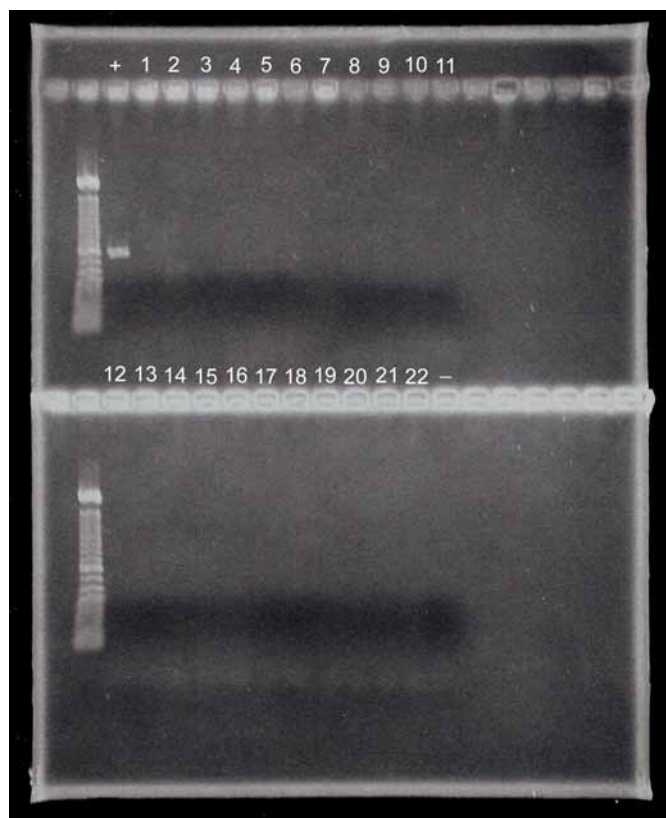
**Figura 6.** (+) *C. glutamicum* 397bp; 80 a 97 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.

O resultados revelam que *Corynebacterium glutamicum* utilizado como controle positivo, apresenta a seqüência alvo pesquisada, com a formação da banda de 397 bp, indicando a presença do gene lipA em seu DNA. O mesmo não ocorreu com as amostras de *Corynebacterium bovis*, exceto para a amostra 9. Em relação a esta amostra, podemos afirmar ainda que o resultado positivo pode significar uma possível contaminação em alguma fase do processamento.

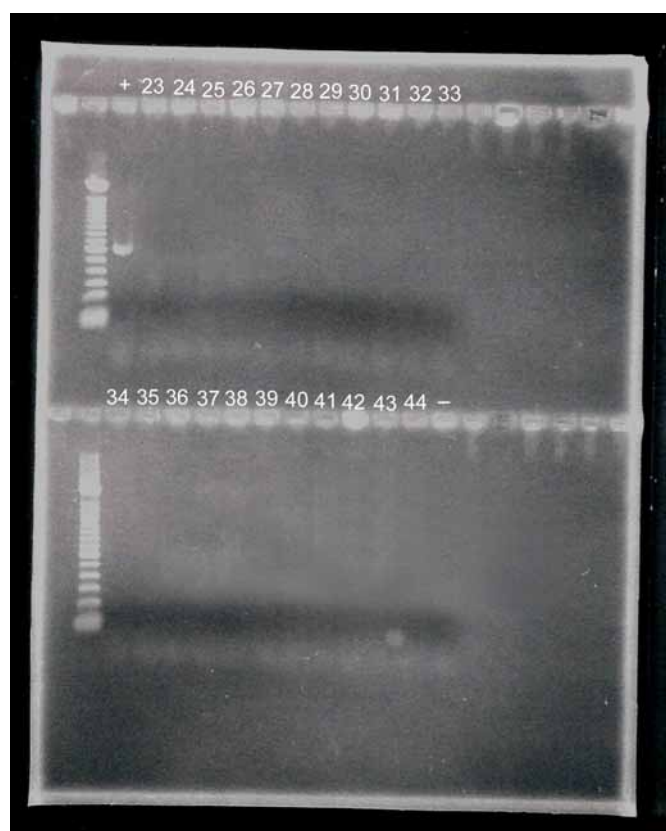
A ausência de informações na literatura sobre pesquisa de genes produtores de lipases e proteases no DNA do *Corynebacterium bovis*, não permite uma discussão mais profunda, porém analisando os resultados obtidos e baseados nas condições do presente experimento, pode-se afirmar que o *C. bovis* não apresenta o gene lipA. Portanto quando FARIA (1986) e SANTOS et al. (1999) afirmam que microrganismos do gênero *Corynebacterium* spp produzem lipases e proteases termo-resistentes, provavelmente esta produção se relacione a outros genes não pesquisados no presente estudo.

Deve-se enfatizar ainda que apesar da existência do gene lipA em determinadas espécies de corinebactérias, não significa necessariamente que outras espécies devem apresentá-lo. Tal fato evidencia a necessidade de novos estudos com outras espécies deste microrganismo.

Os resultados obtidos para o gene aprX, estão expressos nas figuras de 07 a 11 que revelam os resultados obtidos.

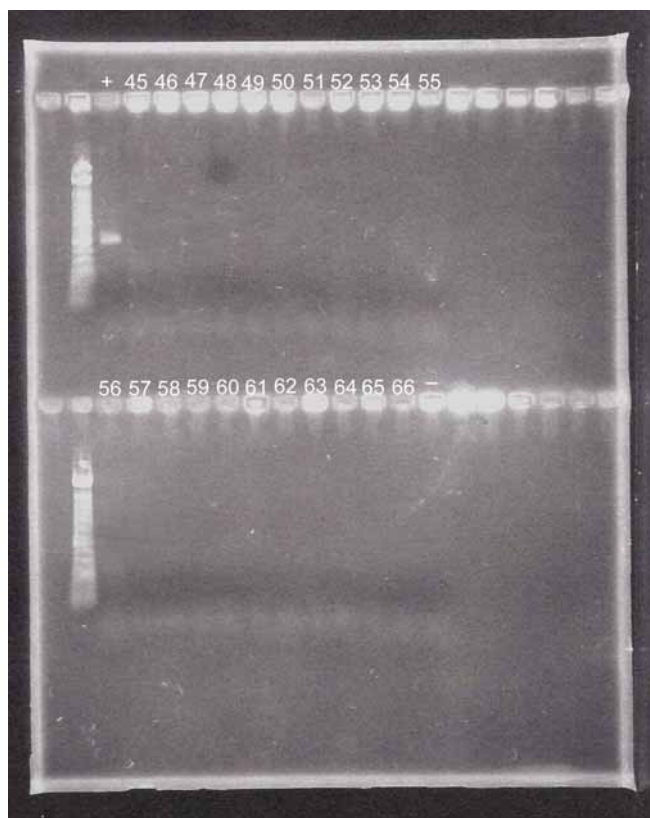


**Figura 7.** (+) *B. liqueniformis* 578 bp; 1 a 22 –  
cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo

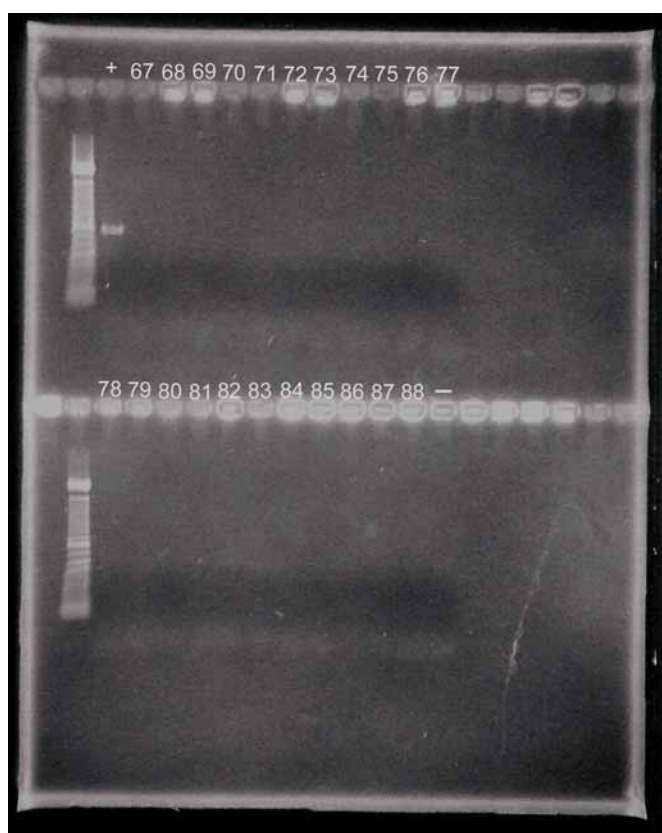


**Figura 8.** (+) *B. liqueniformis* 578bp; 23 a 44 –  
cepas de *C. bovis*; (-) coontrolre negativo.

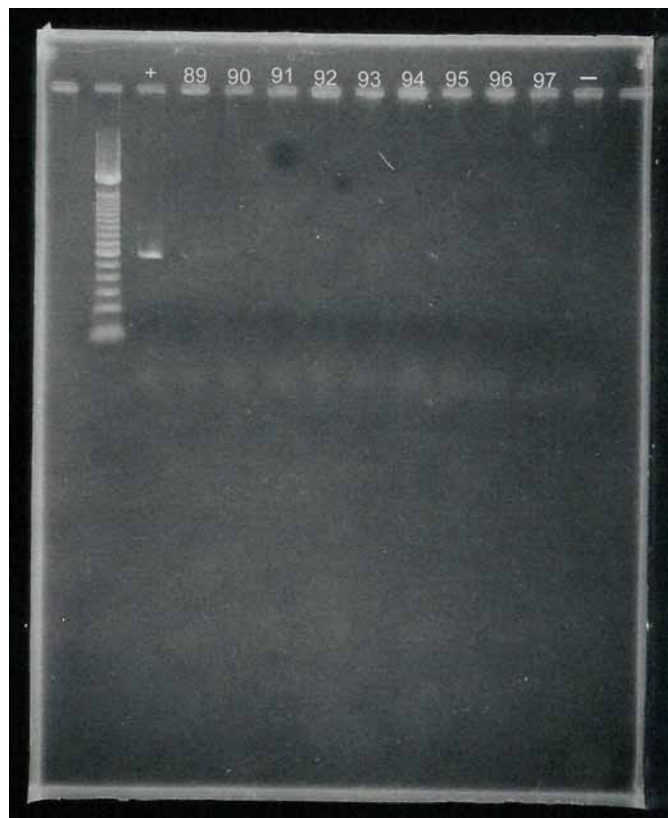




**Figura 9.** (+) *B. liqueniformis* 578bp; 45 a 66 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



**Figura10.** (+) *B. liqueniformis* 578bp; 67 a 88 – cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.



**Figura 11.** (+) *B. liqueniformis* 578bp; 89 a 97 - cepas de *C. bovis*; (-) controle negativo.

Os resultados revelam que *Bacillus liqueniformis*, utilizado como controle positivo, possui a seqüência alvo pesquisada para o gene aprX, o que não aconteceu em nenhuma cepa de *C. bovis* pesquisada. Portanto pode-se afirmar que o microrganismo pesquisado, nas condições do presente experimento, não possui o gene aprX. Estes resultados são contrários aos encontrados por FARIA (1986), DUONG et al. (1992), LIAO & McCALLUS (1998) e SANTOS et al. (1999), que afirmam que microrganismos psicrotróficos produzem lipases e proteases termo-resistentes, embora não se possa afirmar que tais microrganismos não produzam outras enzimas proteolíticas codificadas por outros genes não pesquisados no presente estudo.

Tais fatos revelam a necessidade de um estudo mais aprofundado, com o seqüenciamento completo do DNA de *C. bovis*, para esclarecimento do seu papel na manutenção da qualidade do leite UAT.

## *Conclusões*

---

---

## 7. CONCLUSÕES

1. *C. bovis* possui a capacidade de se multiplicar sob temperatura de refrigeração, o que pode comprometer a qualidade do leite armazenado por longos períodos de tempo.
2. Não se detectou a presença dos genes *aprX* e *lipA* no DNA do microrganismo o que indica que *C. bovis* não produz proteases e lipases codificadas por estes genes.
3. A refrigeração do leite cru nas propriedades leiteiras pode favorecer a multiplicação de microrganismos psicrotóxicos, como os corineformes, que podem promover alterações na composição do leite cru e de seus derivados.

## *Referências Bibliográficas*

---

---

## 8.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. M., BARACH, J. T., SPECH, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **J. Dairy Sci.**, v. 58, n. 6, p. 828 – 34. 1974.
- ADAMS, D. M., BARACH, J. T., SPECH, M. L. Effect of Psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **J. Dairy Sci.**, v. 59, n.5, p. 823 – 27. 1975.
- BALCÃO, V. M., MALCATA, F. X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotech. Adv.**, v. 16, n. 2, p. 309 – 41. 1998.
- BARBANO, D. M., MA, Y., SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. **J. Dairy Sci.**, v. 89, E.Suppl., p. E15 – E19. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1997. 241p.
- BRAMLEY, A. J., MCKINNON, C. H. Dairy Microbiology: The microbiology of milk. 2 ed. **Elsevier Sci.**, 1990. cap. 5. The microbiology of raw milk, p. 163 – 207.

---

\* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. Grupo de Trabalho Normalização Documentária da UNESP. Normalização documentária para a produção científica da UNESP: normas para apresentação de referências segundo a NBR 6023:2002 da ABNT. São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.biblioteca.unesp.br/pages/normalizacao.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2003.

- BRITO, M., A., V., P. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesq. Vet. Brás.**, v. 18, n. 1, p. 39 – 44, 1998.
- BURGER, M. et al. Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 an ECF sigma factor and a transmembrane activator. **Microbiol.**, v. 146, p. 3149 – 55. 2000.
- BURDOVÁ, O. et al. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 46, p. 325 -9. 2002.
- CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 75 – 80. 2003.
- CHEN, L., DANIEL, R. M., COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **Inter. Dairy Journal.**, v. 13, p. 255 – 75, 2003.
- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotropic microorganisms. **J. Dairy Sci.**, v. 64, n. 1, p. 157-60, 1981.
- COSTA, E. O. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 17, p.156 – 8, 1995.
- COUNTER, D. E. Outbreak of bovine mastitis associated with *Corynebacterium bovis*. **Vet. Rec.**, v.108, p.560 – 1, 1981.
- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Austr. J. Dairy Tech.**, v. 33, n. 2, p. 129 – 38. 1992.

- DATTA, N., DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensm-Wiss U. Tech.**, v. 36, p. 173 – 82. 2003.
- DEETH, H. C. Lipase activity and its effect on milk quality. **Aust. J. Dairy Tech.**, v. 48, p. 96 – 8. 1993.
- DIECKELMANN, M., JOHNSON, L. A., BEACHAM, I. R. The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. **J. Appl. Micro.**, v. 85, p. 527 – 36. 1998.
- DOMINGUES, P. F. Novas tendências no tratamento da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE BOVINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2, 1996, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa, 1996, p. 33 –43.
- DOMINGUES, P. F., LANGONI, H., PADOVANI, C. R. Influence of subclinical bovine mastitis on milk production. **Vet. Zootec.**, v. 10, p. 99 – 106, 1998.
- DOMMETT, T. W. Spoilage of aseptically packaged pasteurized liquid dairy products by thermotolerant psychrotrophs. **Food Australia**, v. 44, n. 10, p. 459 – 461, 1992.
- DUONG, F. et al. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to other secretory pathways. **Gene**, v. 121, p. 47 – 54. 1992.
- DUONG, F. et al. The aprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. **Gene**, v. 262, p. 147 – 53. 2001.



- FAJARDO-LIRA, C. E., NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **J. Dairy Sci.**, v. 81, n. 4, p. 901 – 8. 1998.
- FARIA, J. A. F. Vida de prateleira do leite de consumo. **Inf. Agropec.**, v. 12, n. 137, p. 38 – 45. 1986.
- GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterelizado “Longa – vida”**. Campinas: UNICAMP, 1996. 180p.
- GUINOT-THOMAS, P., AMMOURY, M. A., LAURENT, F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **Int. Dairy J.**, v. 5, p. 211 – 23. 1995.
- GUNDOGAN, N., ARIK, M. T. Comparision of the protease activity of psychrotrophic and thermophilic Bacillus spp. isolated from raw milk samples. **Indian Vet. J.**, v. 81, p. 1013 – 15. 2004.
- HICKS, C. L. et al. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. **J. Food Protec.**, v. 45, p. 331 – 4. 1982.
- JOHNSON, L. A. et al. Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in Escherichia coli. **Appl. Env. Microb.**, v. 58, n. 5, p. 1776 – 9. 1992.
- LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.20, n. 5, p. 204 – 9, 1998.
- LANGONI, H. Etiologia da Mastite Bovina Subclínica e Clínica: Perfil de Sensibilidade Microbiana, Controle e Repercussão na Produção

Leiteira e a Saúde Pública. Botucatu, 1995. 200p. **Tese** (Livre Docência em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu.

LIAO, C., McCALLUS, D. E. Biochemical and Genetic Characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. **Appl. Environ. Micro.**, v. 64, n. 3. 1998.

MA, Y. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 264 – 74. 2000.

MARTINEZ, A., SOBERON-CHAVES, G. Characterization of the lipA gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. **Appl. Micro. Biotech.**, v. 56, p. 731 – 5. 2001.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life products. **J. Society Dairy Tech.**, v. 49, n. 3, p. 67 – 72. 1996.

NADER FILHO, A. et al. Sensibilidade dos Staphylococcus coagulase positiva, isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Ars. Veterinaria**, v.12, n.1, p.57 - 63, 1996.

NGATIA, T. A., JENSEN, N. E., BERG, B. B. Changes in the Bovine Udder Quarts Naturally Infected by *Corynebacterium bovis*. **Br. Vet. J.**, v. 147, p. 463 – 8. 1991.

NUNES, E. L. C. et al. Detection of *ileS-2* Gene Encoding Mupirocin Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 77-81. 1999.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Editora Artmed. Porto Alegre. 2005. 512p.

- ROSSI JÚNIOR, O. D. et al. Estudo das características microbiológicas do leite uat ao longo de seu processamento. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n.1, p.27 – 32, 2006.
- SANTANA, E. H. W., BELOTI, V., BARROS, M. A. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Hig. Alim.**, v. 15, n. 88, p. 27 – 33, 2001.
- SANTOS, E. S., CARVALHO, E. P., ABREU, L. R. Psicrotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. **Bol. SBCTA**, v. 33, n. 2, p. 129 – 38. 1999.
- SANTOS, M. V., MA, Y., CAPLAN, Z., BARBANO, D. M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis in milk. **J. Dairy Sci.**, v. 86, n. 5, p. 1601 – 7. 2003.
- SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of Califórnia Mastitis Test. **J. Am. Vet. Assoc.**, v. 130, p. 199 – 204, 1957.
- SEARS, P. M., GONZALES, R. N., WILSON, D. J. Procedures for Mastitis Diagnostics and Control. In: Anderson, K. L. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders Company., 1993. p. 445 – 68.
- SILVEIRA, I. A., CARVALHO, E. P., TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão, **Hig. Alim.**, v. 12, n. 55, p. 21 – 27, 1998.
- SORDILLO, L. M. et al. Leucocytic Infiltration of Bovine Mammary Parenchymal Tissue In Response to *Corynebacterium bovis* Colonization. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 1045 – 51. 1989.

- SORHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Sci. Tech.**, v. 8, p. 35 – 40, 1997.
- THOMAS, S. B. Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in milk. **Milchwissenschaft**, v. 27, p. 270 – 75. 1966.
- TOPÇU, A., NUMANOGLU, E., SALDAMH, I. Proteolysis and storage stability of milk produced in Turkey. **Inter. Dairy J.**, v. 16, p. 633 – 8. 2006.
- VICTORIA, C. et al. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. da UNIPAR.**, v.8, n.2, p.161 – 4. 2005.
- VIDAL-MARTINS, A. M. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 698 – 704. 2005.
- WATTS, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from Bovine Mammary Glands. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 2373 – 9. 2000.
- WOODS, R. G. et al. The aprX–lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. **Microbiol.**, v.147, p. 345 – 54. 2001.
- YURUKOV, M., TODOROV, D. Aetiology of sub clinical mastitis in cows of various breeds in Bulgaria. **Vet. Med. Nauki.**, v.14, p.263-6, 1977.