



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

PAULO ROBERTO DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA TERMIZAÇÃO E DA ADIÇÃO DE CO₂
COMO MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU**

Londrina
2012

PAULO ROBERTO DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA TERMIZAÇÃO E DA ADIÇÃO DE CO₂
COMO MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Profa. Dra. Priscila C. B. Vianna

Londrina

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação**

Rocha, Paulo Roberto da

R575a Avaliação da termização e da adição de CO₂ como métodos de conservação do leite cru / Paulo Roberto Rocha. Londrina: [s.n], 2012.

vii; 36p.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite. Universidade Norte do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Priscila C.B. Vianna

1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR 2- Leite cru 3- Qualidade 4- Termização 5- Dióxido de carbono 6- Psicotróficos I- Vianna, Priscilla C. B., orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

PAULO ROBERTO DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA TERMIZAÇÃO E DA ADIÇÃO DE CO₂
COMO MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU**

Profa. Dra. Priscila Cristina Bizam Vianna
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis
Universidade Norte do Paraná

Dr. Bruno Garcia Botaro

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Curso de Mestrado em Ciências e Tecnologia do Leite da UNOPAR, que contribuíram para os resultados desta proposta de trabalho e conhecimento.

A Jorge Moraes Donato responsável pelo Laboratório de Ciências e Tecnologia do Leite, Alisson Santana da Silva do curso de Biomedicina da UNOPAR e aos estagiários Ligia Grecco Costa Dall'aqua e Renan Grecco Costa: pelo apoio na condução das atividades laboratoriais.

Aos colegas do mestrado, pela convivência e troca de informações em sala de aula, laboratórios e corredores.

À minha família e aos amigos, pelo apoio e incentivo para a realização de mais esta etapa da minha vida.

Em especial, à minha amada Silvana Coradi, pelo apoio, amizade, carinho e compreensão nos diferentes momentos deste período.

Muito obrigado a todos.

ROCHA, Paulo Roberto da. **Avaliação da termização e da adição de CO₂ como métodos de conservação do leite cru.** 2012. 36 páginas. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da termização e da adição de dióxido de carbono (CO₂) como métodos de conservação do leite cru antes do processamento. O leite cru foi dividido em três partes submetidas aos seguintes tratamentos: 1) leite cru controle; 2) leite termizado (65°C/20 s) e 3) leite adicionado de CO₂ (até pH 6,2). As amostras foram acondicionadas em garrafas PET, hermeticamente fechadas e armazenadas em BOD a 4±1°C. O leite cru foi analisado no dia da recepção (dia 0) quanto à composição centesimal e quanto à contagem padrão em placas e contagem de micro-organismos psicrotróficos. Amostras foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas após 3, 6, 10, 13 e 16 dias quanto ao pH, proteólise e quanto às mesmas contagens microbiológicas avaliadas na recepção. O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas em blocos com três repetições. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey, a 5% de significância. A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi avaliada pelo modelo matemático de Gompertz. O leite cru apresentou composição físico-química característica e baixas contagens microbiológicas, atendendo os padrões da legislação. A contagem padrão em placas e a contagem de psicrotróficos aumentaram durante o tempo de armazenamento refrigerado para todas as amostras, entretanto, este aumento foi maior para o leite cru controle. Nas amostras de leite cru adicionado de CO₂ e leite termizado as contagens microbiológicas mantiveram-se abaixo dos limites críticos durante os 16 dias de experimento. A adição de CO₂ e a termização prolongaram o tempo de fase lag dos micro-organismos psicrotróficos quando comparadas ao leite cru controle. Independente do tratamento, a proteólise aumentou significativamente durante o armazenamento refrigerado. Entretanto, o aumento da proteólise não pode ser relacionado à maior contagem de psicrotróficos do leite cru controle. Os resultados mostraram que tanto a adição de CO₂, quanto a termização são eficientes e podem ser utilizados como métodos de conservação da qualidade do leite cru antes do processamento.

Palavras-chave: leite cru, qualidade, termização, dióxido de carbono, psicrotróficos.

ROCHA, Paulo Roberto da. **Evaluation of thermization and CO₂ addition as methods of raw milk preservation.** 2012. 36 páginas. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of thermization and CO₂ addition as methods of raw milk preservation before processing. Raw milk was divided into three treatments: 1) raw milk control, 2) thermized milk (65°C/20 s) and 3) CO₂ added raw milk (until pH 6.2). The samples were stored in plastic bottles at 4±1°C. Raw milk was evaluated upon receipt (day 0) for physicochemical composition, standard plate count and psychrotrophic bacteria count. Samples were randomly selected and evaluated after 3, 6, 10, 13 and 16 days for pH, proteolysis, and the same microbiological counts evaluated at the reception. Split-plot design was used with three replications and the results were evaluated by ANOVA and Tukey's test, at 5% significance level. The psychrotrophic bacteria count was analyzed by Gompertz model. Raw milk presented normal physicochemical characteristics and low microbiological counts, respecting the standards of the current legislation. Standard plate count and psychrotrophic bacteria count increased during refrigerated storage for all the samples, however, this increase was higher for raw milk control. For thermized and CO₂ added milk, microbiological counts remained below critical limits during the 16 days. The CO₂ addition and thermization extended the lag phase of psychrotrophic bacteria when compared to raw milk control. Regardless of treatment, proteolysis significantly increased during refrigerated storage. However, the increased proteolysis could not be related to greater psychrotrophic count of raw milk control. The results showed that CO₂ addition and thermization are effective and can be used to preservation of the quality of raw milk before processing.

Key-words: raw milk, quality, thermization, carbon dioxide, psychrotrophic bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 QUALIDADE E MICROBIOTA DO LEITE CRU.....	12
3.2 UTILIZAÇÃO DA TERMIZAÇÃO E DA ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO PARA CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MATÉRIA-PRIMA	19
4.2 PROCESSAMENTO.....	19
4.3 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM E ANÁLISES.....	20
4.4 METODOLOGIAS PARA AS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	21
4.4.1 Análises físico-químicas	21
4.4.2 Análises microbiológicas	21
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS..	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE CRU	23
5.2 EFEITO DA ADIÇÃO DE CO ₂ E DA TERMIZAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO	24
5.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE CO ₂ E DA TERMIZAÇÃO SOBRE O pH E A PROTEÓLISE	28
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O leite é utilizado na dieta humana devido ao seu valor nutricional e biológico. É considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana como matérias orgânicas e nitrogenadas, necessárias à constituição dos tecidos e sangue, sais minerais para a formação do esqueleto e ainda, vitaminas e enzimas (MESQUITA et al., 2004). Sendo um produto de fácil deterioração, se faz necessária a utilização de métodos de conservação que reduzam parcial ou totalmente a microbiota patogênica e deteriorante e assim prolongue sua vida de prateleira antes do processamento. A contaminação com certos micro-organismos e/ou suas toxinas, constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários, além das perdas econômicas (PADILHA et al., 2001).

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o fator tempo/temperatura em que o leite permanece armazenado da ordenha até o processamento. Dentre todos os fatores marcantes que envolvem a cadeia produtiva do leite, até a chegada à indústria, a preocupação com a melhoria da qualidade do leite cru é um ponto que merece destaque (BRASIL, 2002; MONARDES, 1998). Em termos de qualidade do leite, duas medidas tiveram efeito direto sobre a estrutura de produção leiteira: o resfriamento do leite na propriedade leiteira e a sua coleta a granel. Essas estratégias, que foram estimuladas pelas indústrias e pelos postos de recebimento de leite, alteraram a realidade da produção leiteira na grande maioria das regiões, resultando no quase desaparecimento da coleta em latão e do recebimento de leite quente, cenário este sem o mínimo de higiene e condições de armazenamento. Esta medida trouxe benefícios para a indústria, bem como para o mercado consumidor (SANTOS; FONSECA, 2003).

As normas para armazenamento e transporte refrigerado do leite cru foram regulamentadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa nº 51 em 2002 (BRASIL, 2002). Estas normas estabelecem critérios para a produção com qualidade, gerando a implementação de melhorias para a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (MARTINS, 2004). O principal objetivo da adoção do resfriamento do leite cru é inibir o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos que podem causar a acidificação

do leite provocando perdas para produtores e indústria (JAYARAO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2000). Entretanto, sua eficiência é maximizada se associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica (NÖRNBERG, 2009). Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que não impede a proliferação de micro-organismos psicotróficos. Esses micro-organismos são facilmente destruídos pelos tratamentos térmicos usuais da indústria láctea, porém o armazenamento anterior por períodos prolongados pode resultar em queda de qualidade dos produtos lácteos, devido ao desenvolvimento desses psicotróficos que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes, reduzindo a vida de prateleira do produto e comprometendo a qualidade dos produtos processados (SANTOS; FONSECA, 2003).

A contaminação do leite por micro-organismos psicotróficos pode originar-se principalmente do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene de equipamentos e tanques de resfriamento durante a ordenha, armazenamento e transporte (ENEROTH et al., 2000). Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade.

Uma das tecnologias propostas para controlar o desenvolvimento de psicotróficos durante o armazenamento refrigerado é a adição de dióxido de carbono (CO₂) ao leite cru e estudos têm demonstrado sua eficiência (ESPIE; MADDEN, 1997; KING; MABBITT, 1982; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003; ROBERTS; TORREY, 1988; RUAS-MADIEDO et al., 1998). A ação antimicrobiana do CO₂ é proporcional à sua concentração e seu efeito inibitório sobre os micro-organismos depende da temperatura, acidez, atividade de água, tipo e fase de desenvolvimento do micro-organismo (SARANTÓPOULOS et al., 1996).

A legislação brasileira não prevê o uso de aditivos químicos e coadjuvantes de tecnologia no leite cru (BRASIL, 2002), exigindo um melhor estudo para evitar o emprego indiscriminado ou sem parâmetros de processos devidamente definidos. Assim, a utilização do CO₂ para aumentar o tempo de conservação do leite pode se tornar uma alternativa viável para uso nas propriedades rurais e entrepostos de armazenamento.

Outro método utilizado para conservação do leite cru é a termização.

Este método consiste no aquecimento do leite a temperaturas entre 60°C e 69°C por 15 a 20 segundos, principalmente com o objetivo de eliminar micro-organismos psicotróficos, desde que não ocorra alteração das características físico-químicas do produto (BRASIL, 1996). O processo é efetivo na redução da carga microbiana, promovendo a manutenção da qualidade do leite cru, entretanto, outros métodos finais de conservação, como a pasteurização, devem ser empregados ao produto antes de seu consumo. A termização tem sido considerada de potencial uso na conservação do leite cru em indústrias que processam grandes quantidades de leite quando não é possível realizar a pasteurização imediatamente após a recepção, em postos de recebimento de leite cru e em indústrias de leite em pó (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Em resumo, as pesquisas têm mostrado que a termização reduz a contagem de micro-organismos psicotróficos em leite cru e que adição de CO₂ retarda o desenvolvimento microbiano. Ambos os processos promovem a manutenção da qualidade e prolongam a vida de prateleira do leite cru. Como consequência da diminuição do desenvolvimento microbiano, danos relacionados à produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas pelos psicotróficos podem ser evitados tanto na matéria-prima quanto nos produtos processados. Entretanto, existem poucos trabalhos publicados comparando a utilização da termização e a adição de CO₂ para conservação do leite cru antes do processamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso da termização e da adição de CO₂ como métodos de conservação do leite cru.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da termização e da adição de CO₂ sobre a composição físico-química, proteólise, contagem padrão em placas e contagem de micro-organismos psicrotróficos do leite cru durante o armazenamento refrigerado.

- Avaliar o efeito da termização e da adição de CO₂ sobre o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos utilizando o modelo matemático de Gompertz.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 QUALIDADE E MICROBIOTA DO LEITE CRU

O leite é uma emulsão estável de glóbulos de gordura e uma suspensão coloidal de micelas de caseína (MONARDES, 1998). A lactose, as proteínas do soro, a maior parte dos minerais e vitaminas hidrossolúveis encontram-se dissolvidos na fase soro, formando uma solução (BRITO; BRITO, 1998; MONARDES, 1998). O leite contém aproximadamente 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, destes, 3,9% correspondem à gordura, 3,2% à proteína, 4,6% à lactose e 0,90% aos minerais e vitaminas (HARDING, 1995; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Assim, o leite é um produto complexo e completo, sendo considerado como uma das melhores fontes de nutrientes para os seres humanos (SILVEIRA, 2002). No que se refere ao consumo de alimentos *per capita*/ano no Brasil, o leite aparece como o produto de origem animal mais consumido, segundo o IBGE (2002 e 2003), através do relatório de Pesquisa de Orçamento Familiar no Brasil, a quantidade consumida de carne é de 25,237 kg, aves e ovos é de 15,577 Kg e leite e derivados é de 49,906 Kg. Estes dados refletem a importância do leite na dieta dos brasileiros (EVANGELISTA, 2008).

O setor leiteiro busca cada vez mais a matéria prima de qualidade e um produto processado seguro e saudável para um consumidor cada vez mais exigente (FONSECA, 2005; GIGANTE, 2004; GUERREIRO et al., 2005). Os principais fatores que determinam a qualidade do leite são a composição físico-química, a contagem de células somáticas, a contagem bacteriana, a ausência de adulterantes (água, resíduos de antimicrobianos, substâncias químicas e outros) e a temperatura de armazenamento (BRASIL, 2002; MONARDES, 1998;). Desses os fatores físico-químicos e microbiológicos se destacam, sendo o primeiro influenciado pela alimentação, genética, estágio de lactação, sanidade e manejo dos animais e o segundo influenciado pela carga microbiana inicial, pelas condições de higiene na ordenha, que neste caso inclui também os equipamentos, e pela velocidade de multiplicação dos micro-organismos (FOX; MCSWEENEY, 1998).

Visando a melhoria da qualidade gradativa do leite cru produzido e processado no Brasil, o Ministério da Agricultura publicou em 2002 a Instrução

Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), que estabeleceu normas para a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, além dos padrões físico-químicos e microbiológicos do produto. Em 2011, esses padrões foram revistos e a IN 51 foi substituída pela Instrução Normativa nº 62/2011 (BRASIL, 2011), que no momento encontra-se em vigor. Segundo a IN 62, os padrões microbiológicos exigidos para o leite cru refrigerado das regiões sul, sudeste e centro-oeste, são contagem padrão em placas máxima de $6,0 \times 10^5$ ufc/mL e contagem de células somáticas abaixo de 600.000 cél/mL. Estes requisitos já estão em vigor desde 01 de janeiro de 2012 (BRASIL, 2011). Porém esse padrão microbiológico nem sempre é alcançado. Nero et al. (2005), observaram que 48,6 % de amostras de leite apresentaram contagem de aeróbios mesófilos maior que 10^6 ufc/mL, nas regiões de Viçosa (MG), Botucatu (SP), Pelotas (RS) e Londrina (PR). Segundo os autores, a melhoria dessa condição deve estar relacionada à refrigeração durante o armazenamento e transporte do leite cru, aliada a implantação de programas de boas práticas de ordenha e assistência técnica nas propriedades rurais.

O principal conceito de qualidade é que não há como melhorá-la depois que o leite deixa a fazenda. Assim, é de suma importância a adoção de condições higiênicas adequadas nos sistemas de produção, ordenha, armazenamento e transporte para a manutenção da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru que chega à indústria para processamento (FONSECA; SANTOS, 2000; MARTINS et al., 2007).

O leite, pela sua riqueza em nutrientes, constitui-se uma importante fonte alimentar para o homem e excelente meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos. A qualidade e a conservação dos alimentos estão diretamente relacionadas com a sua carga microbiana (ZOCHE, 2002). Altas contagens microbianas em leite indicam matéria prima contaminada, condições sanitárias deficientes ou temperaturas impróprias de processamento e armazenamento (CARVALHO; FREITAS; CAMPOS, 2007).

A baixa qualidade do leite cru é notoriamente conhecida em todo o território nacional, e como consequência resulta em produtos beneficiados de qualidade insatisfatória (ARCURI et al., 2006; GUIMARÃES, 2002; NERO et al., 2005). O principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade desse produto é o seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte. Grupos específicos de micro-organismos são

pesquisados para esse fim, como os aeróbios mesófilos, coliformes e psicotróficos (CHAMBERS, 2002; GUIMARÃES, 2002). A presença de altos níveis de contaminação microbiana em leite e em seus derivados compromete a durabilidade desses produtos, já que promovem a deterioração de seus componentes, como proteínas, gordura e lactose (CHAMBERS, 2002; GRUETZMACHER; BRADLEY Jr., 1999).

Os aeróbios mesófilos incluem um grupo de micro-organismos capazes de se multiplicar em uma faixa de temperatura entre 20 a 40°C na presença de oxigênio, tendo uma temperatura ótima de crescimento a 32°C e, portanto, encontrando nas temperaturas ambientes de países tropicais, condições ótimas para seu metabolismo (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Por outro lado, a baixa temperatura favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas que não são inativadas nos tratamentos térmicos usuais da indústria láctea (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Segundo Collins (1981), os psicotróficos foram definidos como sendo os micro-organismos que podem se desenvolver a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Muitos destes micro-organismos apresentam temperatura ótima de desenvolvimento entre 20 e 30°C, mas também podem se desenvolver a temperatura de refrigeração (MUIR, 1996). Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados sob refrigeração por períodos relativamente longos (GERMANO; GERMANO, 2008).

A importância do controle da presença de micro-organismos psicotróficos no leite cru, bem como sua relação com a qualidade dos produtos lácteos processados, especialmente quando as contagens são acima de 10^6 ufc/mL não é um assunto novo e é amplamente discutido na literatura (MUIR, 1996; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Apesar da importância dos psicotróficos, a legislação brasileira não estipula um padrão de qualidade do leite cru baseado na contagem destes micro-organismos. Porém, de acordo com Pinto, Martins e Vanetti (2006) devem-se ter maiores cuidados na fabricação de produtos a partir do leite cru com contagem de psicotróficos superior a $5,0 \times 10^6$ ufc/mL, pois neste caso é grande a possibilidade da

presença de enzimas deteriorantes. Champagne et al. (1994) relataram que normalmente é necessário uma contagem acima de 10^6 ufc/mL de psicrotróficos no leite para que as mudanças de aroma e sabor do leite se tornem perceptíveis.

Os micro-organismos psicrotróficos presentes no leite cru são bactérias Gram negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, e *Flavobacterium*, e gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Destes gêneros, o mais comumente encontrado em leite é o *Pseudomonas*, com destaque para a espécie *P. fluorescens* (COUSIN; BRAMLEY, 1981; COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Em condições de refrigeração, os psicrotróficos mantêm sua capacidade de multiplicação e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru após dois a três dias (SANTOS; FONSECA, 2003). Law et al. (1977), concluíram que a estocagem de leite cru por períodos prolongados antes do processamento aumenta a probabilidade do desenvolvimento de psicrotróficos com a consequente produção de enzimas termorresistentes capazes de causar deterioração de produtos lácteos.

Arcuri et al. (2008) encontraram altas contagens de psicrotróficos (até 10^7 ufc/mL) em amostras de leite coletadas de tanques coletivos e individuais. Além disso, Pinto, Martins e Vanetti (2006), que avaliaram a qualidade microbiológica de leite cru refrigerado destinado à produção de leite UHT, observaram que 100% das amostras dos silos apresentaram contagem de psicrotróficos $>10^5$ ufc/mL, sendo que 50% apresentaram contagem $>10^6$ ufc/mL. Os autores concluíram que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não foram adequados para minimizar a contaminação microbiana e o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos.

Em outro estudo, Celestino, Iyer e Roginski (1996), avaliaram o efeito do armazenamento refrigerado (4°C/48 horas) sobre a qualidade do leite cru. O armazenamento resultou em aumento de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. O número de psicrotróficos como proporção da contagem de mesófilos aumentou de 47 para 80% após 2 dias. Os autores ainda observaram uma maior concentração de ácidos graxos livres e menor pH no leite armazenado, resultado de sua maior ação enzimática e bacteriana quando comparado ao leite fresco. Já

Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) não encontraram correlação entre atividade proteolítica e a contagem de psicotróficos no leite cru refrigerado de dois laticínios do estado do Rio Grande do Sul. Os autores sugerem que a proteólise está principalmente associada a linhagens específicas de micro-organismos psicotróficos com elevada capacidade proteolítica.

Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) isolaram outras espécies de psicotróficos com alta atividade proteolítica de leite cru de tanques e silos de armazenamento, tais como *Burkholderiacepacia*, *Klebsiellaoxytoca* e *Aeromona ssp.* As proteases destes micro-organismos mostraram-se bastante resistentes aos tratamentos térmicos de pasteurização e UHT e causaram a coagulação de leite UHT após 5 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Estes resultados mostram o potencial dos micro-organismos psicotróficos para deterioração da qualidade dos produtos lácteos fabricados a partir de leite cru de baixa qualidade.

3.2 UTILIZAÇÃO DA TERMIZAÇÃO E DA ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO PARA CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU

Atualmente existem vários métodos que podem ser utilizados para prevenir a deterioração do leite e produtos lácteos por micro-organismos psicotróficos, porém a higiene e temperaturas de estocagem adequadas em toda a cadeia produtiva são fatores importantes que devem ser considerados (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

A utilização de métodos para controlar o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos é de interesse da indústria láctea, pois viabiliza o armazenamento do leite cru por maior tempo, sem perda de qualidade para os produtos processados. Uma forma de controle utilizada é a termização, que consiste de um tratamento térmico de menor intensidade do que a pasteurização, usualmente empregando temperaturas entre 60 e 69°C por 15-20 segundos. O objetivo da termização é a eliminação de micro-organismos, especialmente psicotróficos, evitando sua proliferação e a conseqüente produção de enzimas termorresistentes que eventualmente causam a deterioração dos produtos lácteos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A legislação brasileira define a termização ou pré-aquecimento como a aplicação do calor ao leite, em aparelhagem própria, com a finalidade de reduzir

sua carga microbiana, sem alteração das características enzimáticas próprias do leite cru. O mesmo não deve ser usado como método de conservação, mas como meio de preparar a matéria prima para posterior processamento, com maior qualidade (BRASIL, 1996).

Outro método que pode ser utilizado para a conservação da qualidade do leite cru refrigerado é o uso do dióxido de carbono (CO₂). O controle do desenvolvimento microbiano através da adição de CO₂ ao leite pode promover a manutenção da qualidade do leite cru e produtos lácteos (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

Pesquisas têm mostrado que o CO₂ age prolongando a fase lag e diminuindo a taxa de crescimento de micro-organismos, sendo que o efeito inibitório é mais pronunciado em bactérias Gram negativas (MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003). Os mecanismos de inibição pelo qual o CO₂ afeta o desenvolvimento e o metabolismo microbiano ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto, estudos indicam que pelo menos três mecanismos gerais estão envolvidos: 1) Substituição do O₂ pelo CO₂ diminuindo o desenvolvimento de micro-organismos aeróbicos; 2) A diminuição do pH pela dissolução do CO₂ com a formação de ácido carbônico na fase aquosa do leite e; 3) Efeito direto sobre o metabolismo dos micro-organismos. O CO₂ entra em contato com a membrana celular, se dissolve na bicamada lipídica e chega até o citoplasma, diminuindo o pH intracelular e causando stress da célula bacteriana (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006, LOSS; HOTCHKISS, 2000).

King e Mabbit (1982) observaram que a adição de 30 mM/L de CO₂ ao leite cru refrigerado (10°C) com contagem de mesófilos inicial de 10³ ufc/mL aumentou em 3 dias a vida de prateleira do produto. Resultados semelhantes foram observados por Roberts e Torrey (1988) em leite cru armazenado a 7°C por 6 dias. Espie e Madden (1997) mostraram que a contagem de *Pseudomonas* foi 3 ciclos logarítmicos menor no leite cru adicionado de CO₂ e armazenado a 4°C após 4 dias quando comparado com o controle. Em outro estudo, Martin, Werner e Hotchkiss (2003) observaram que o CO₂ reduziu o desenvolvimento de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus lincheniformis* em leite cru. No entanto, a magnitude do efeito sobre as diferentes fases de crescimento variou de micro-organismo para micro-organismo.

A inibição do desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos resulta na menor produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e, conseqüentemente, em menor lipólise e proteólise, conforme demonstrado por Ma, Barbano e Santos (2003). Estes autores observaram que a adição de 1500 ppm de CO₂ retardou o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos e diminuiu a proteólise e lipólise do leite cru armazenado por 21 dias a 4°C. Rowe (1988) estudou o efeito do CO₂ sobre enzimas extracelulares produzidas por *Pseudomonas fluorescens*. A adição de CO₂ reduziu em 50% a produção de proteases e a produção de lipases foi 85% maior no leite não tratado após 5 dias de armazenamento a 7°C.

Trabalho recente publicado por Rasolofo et al. (2010) avaliou o efeito do emprego da termização e da adição de CO₂ sobre o desenvolvimento microbiano em leite cru durante 7 dias de armazenamento refrigerado (4 e 8°C). Os autores observaram que o CO₂ foi mais eficiente em inibir o desenvolvimento de psicotróficos no leite armazenado a 4°C, entretanto a contagem passou a aumentar após 3 dias de armazenamento. Após a termização, a população de psicotróficos foi reduzida e permaneceu constante durante os 7 dias de armazenamento a 4°C, indicando que este tratamento foi tão eficiente quanto a pasteurização no controle destes micro-organismos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O leite cru utilizado nos experimentos foi coletado de um produtor situado no município de Sertanópolis, região metropolitana de Londrina/PR. Após a ordenha, o leite foi imediatamente resfriado pela imersão dos latões em banho de gelo, até atingir a temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o resfriamento o leite foi transportado para o laboratório de leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). O tempo de transporte foi em média de 30 minutos.

4.2 PROCESSAMENTO

Os experimentos foram realizados em escala laboratorial utilizando-se leite cru integral e o fluxograma geral do experimento é apresentado na Figura 1.

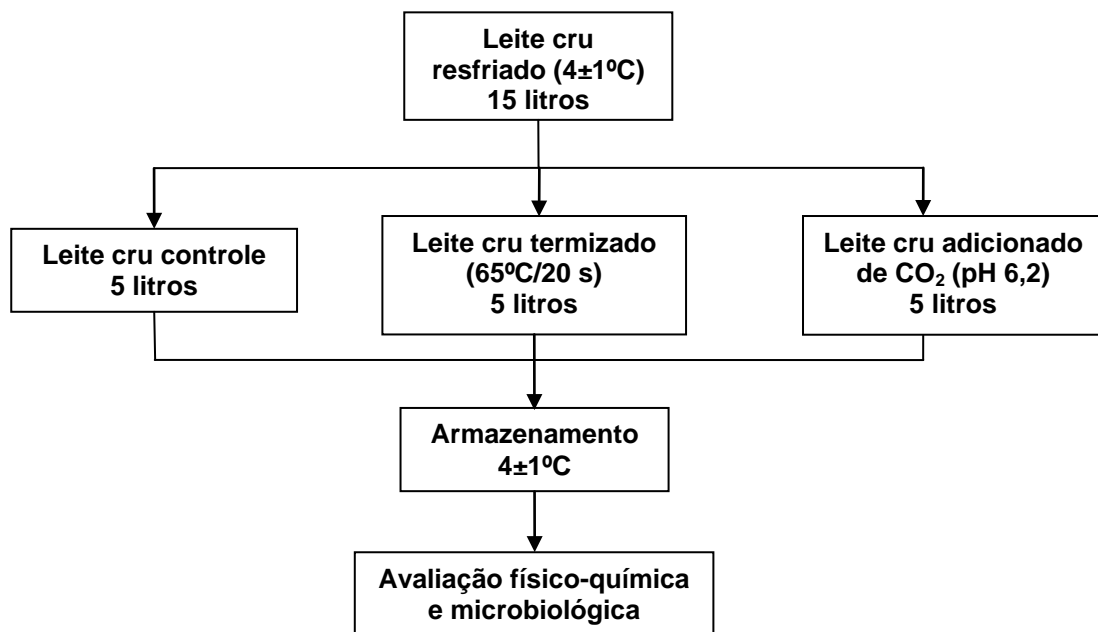


Figura 1 – Fluxograma geral do experimento.

Imediatamente após a recepção, o leite cru (15 litros) foi dividido em três porções. A primeira porção foi o leite cru controle que não sofreu nenhum tipo de tratamento, sendo mantido a 4°C . A segunda porção, foi submetida a termização ($65^{\circ}\text{C}/20\text{ s}$) e na sequência foi resfriada a 4°C em banho de gelo. A última porção foi

adicionada de CO₂ (até pH 6,20±0,05), borbulhando-se o gás diretamente no leite com o auxílio de uma mangueira de borracha devidamente higienizada, acoplada num cilindro de CO₂.

As amostras controle, termizada e adicionada de CO₂ foram acondicionadas em garrafas PET de 240 mL higienizadas e fechadas hermeticamente com tampas de rosca. Em seguida foram armazenadas em BOD a 4±1°C, onde permaneceram até os dias de análise.

4.3 PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM E ANÁLISES

Após a recepção do latão, o leite cru foi submetido à agitação e amostras foram coletadas em frascos estéreis, destinados à realização das análises microbiológicas e frascos higienizados, para as análises físico-químicas.

O leite cru foi analisado quanto ao pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC) e nitrogênio não protéico (NNP). O teor de lactose foi calculado por diferença. Para caracterização microbiológica o leite cru foi avaliado quanto à contagem padrão em placas e contagem de micro-organismos psicotróficos.

Para as análises microbiológicas do leite cru, uma alíquota de 10 mL do leite foi transferida para um frasco contendo 90 mL de solução de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10⁻¹. A partir desta, foram feitas as diluições subsequentes necessárias à realização das análises.

Durante o armazenamento refrigerado amostras foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas após 3, 10, 13 e 16 dias quanto ao pH, nitrogênio total, nitrogênio não caseico e nitrogênio não protéico. A contagem padrão em placas e a contagem de psicotróficos foram avaliadas após 3, 6, 10, 13 e 16 dias de armazenamento refrigerado. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, enquanto as avaliações microbiológicas foram realizadas em duplicata.

Os resultados de nitrogênio foram expressos como proteína usando o fator de conversão de 6,38. A proteína (P) e a caseína (CN) foram calculadas por (NT-NNP) x 6,38 e (NT-NNC) x 6,38, respectivamente, onde NT é o conteúdo de nitrogênio total do leite. O decréscimo da relação (CN/P) x 100 foi utilizado como índice de proteólise.

4.4 METODOLOGIAS PARA AS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.4.1 Análises físico-químicas

- pH: determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras (AOAC, 1995);
- Acidez titulável: determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína (AOAC, 1995);
- Extrato Seco Total: determinado por secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995);
- Gordura: determinada pelo Método de Gerber para leite, de acordo com British Standard Institution (1989);
- Proteína total: determinada pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator de correção 6,38 (AOAC, 1995);
- Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC): avaliado a partir do filtrado após precipitação do leite ao ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6), de acordo com AOAC (1995).
- Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP): determinado a partir do filtrado após precipitação do leite pela adição de ácido tricloroacético (TCA 12%), de acordo com AOAC (1995).

4.4.2 Análises microbiológicas

- Contagem padrão em placas: contagem pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA), incubado a 35°C por 48 horas (APHA, 1992);
- Psicotróficos: contagem em ágar padrão (PCA), utilizando plaqueamento em superfície e incubação a 7°C por 10 dias (APHA, 1992).

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas (*Split-plot*) em blocos com três repetições. O bloco foi o leite utilizado em cada um dos três processamentos. As parcelas foram os tratamentos aplicados (3 níveis de

variação) e a sub-parcela foi o tempo de armazenamento refrigerado (5 níveis de variação para a proteólise e 6 níveis de variação para as contagens microbiológicas), que correspondem à avaliação da proteólise do leite cru no dia da recepção (dia 0) e após 6, 10, 13 e 16 dias de armazenamento e à avaliação das contagens microbianas após 0, 3, 6, 10, 13 e 16 dias de armazenamento. O efeito dos tratamentos sobre as características físico-químicas e microbiológicas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de comparação entre médias de Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5%.

O desenvolvimento dos micro-organismos psicrotróficos também foi avaliado utilizando-se o modelo matemático de Gompertz descrito na Equação 1, segundo Martin, Werner e Hotchkiss (2003). Os parâmetros avaliados foram o tempo da fase lag e a taxa de crescimento.

$$Y(t) = Y_0 + a_1 \cdot e^{\{-e^{[-a_2 \cdot (t-\tau)]}\}} \quad (1)$$

Onde,

$Y(t)$ = log da contagem de micro-organismos no tempo t ;

Y_0 = log da contagem de micro-organismos no tempo zero;

t = tempo (dias);

a_1 , a_2 e τ = parâmetros do modelo de Gompertz.

A partir dos parâmetros a_1 , a_2 e τ foram calculados o tempo de fase lag e a taxa de crescimento conforme as Equações 2 e 3.

$$\text{Tempo de fase lag (dias)} = t_1 - (1 - a_2) \quad (2)$$

$$\text{Taxa de crescimento (ufc / ml / tempo)} = a_1 \cdot a_2 / e \quad (3)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE CRU

A composição do leite cru utilizado nos processamentos (Tabela 1) atendeu os requisitos físico-químicos e microbiológicos, estabelecidos pela IN nº 51 (BRASIL, 2002) e alterada pela IN nº 62 (BRASIL, 2011) que são: acidez 0,14 – 0,18% de ácido láctico, teor de gordura mínimo de 3,0%, teor mínimo de proteína de 2,9% e contagem padrão em placas menor que $6,0 \times 10^5$ ufc/mL. Essas características são um indicativo de que o leite cru utilizado nos experimentos foi obtido de forma higiênica e conservado adequadamente até o início dos experimentos. Apesar de não ser controlada pela legislação a contagem inicial de micro-organismos psicotróficos do leite cru ($3,1 \times 10^2$ ufc/mL) foi menor que a contagem de 10^6 ufc/mL considerada crítica para processamento do leite (FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Tabela 1 – Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru utilizado como matéria prima (n = 3).

	Média ± DP ⁽¹⁾
pH	6,81 ± 0,09
Acidez (°D)	15 ± 1
EST (%)	11,3 ± 0,9
Gordura (%)	3,9 ± 0,1
Lactose (%)	4,4 ± 0,9
Proteína total (%) ⁽²⁾	3,1 ± 0,7
Proteína (%)	3,2 ± 0,7
Caseína (%)	2,6 ± 0,6
CN/P (%) ⁽³⁾	80,1 ± 3,9
Contagem padrão em placas (ufc/mL)	$3,1 \times 10^4$
Psicotróficos (ufc/mL)	$3,1 \times 10^2$

⁽¹⁾DP = Desvio padrão; ⁽²⁾Proteína total = nitrogênio total x 6,38; ⁽³⁾CN/P (%): caseína como % da proteína.

5.2 EFEITO DA ADIÇÃO DE CO₂ E DA TERMIZAÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO

A Tabela 2 mostra o resultado da avaliação estatística para o efeito dos tratamentos sobre a contagem padrão em placas e a contagem de micro-organismos psicotróficos.

Tabela 2 – Resultado da avaliação estatística do desenvolvimento microbiano (n=3).

	Valor de $p^{(1)}$	
	CPP ⁽²⁾	Psicotróficos
Tratamento ⁽³⁾	<0,0001	<0,0001
Tempo de armazenamento	0,0461	<0,0001
Tratamento x tempo	<0,0001	<0,0001

⁽¹⁾ $p < 0,05$; ⁽²⁾CPP: contagem padrão em placas; ⁽³⁾Tratamento: leite cru controle, leite cru adicionado de CO₂ e leite termizado.

A contagem padrão em placas foi significativamente maior no leite cru controle quando comparada aos leites adicionado de CO₂ e termizado durante o período de armazenamento e apresentou valores médios de $2,0 \times 10^5$, $3,2 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^4$ ufc/mL para os leites cru controle, adicionado de CO₂ e termizado. Durante o armazenamento a 4°C a contagem padrão em placas aumentou para todos os tratamentos (Figura 2), entretanto, para o leite cru controle houve um aumento significativo após o 6º dia. Partindo-se da contagem padrão inicial de $3,1 \times 10^4$ ufc/mL (4,5 log), o tempo necessário para que se atingisse a contagem mínima de $6,0 \times 10^5$ ufc/mL, regulamentada pela IN nº 62/2011 (BRASIL, 2011), foi menor para o leite cru (~10 dias), enquanto as amostras adicionada de CO₂ e termizada não alcançaram este limite durante os 16 dias de avaliação do experimento.

Observa-se na Figura 2 que a contagem padrão em placas do leite adicionado de CO₂ manteve-se constante durante todo o experimento, mostrando a eficiência do CO₂ em retardar o desenvolvimento microbiano. Para o leite termizado pode ser observada uma variação na contagem ao longo do tempo de armazenamento, provavelmente proveniente de falhas na execução da análise. Entretanto, a contagem padrão do leite termizado manteve-se sempre abaixo da contagem limite ($6,0 \times 10^5$ ufc/mL), conservando adequadamente o leite durante o tempo de análises do experimento.

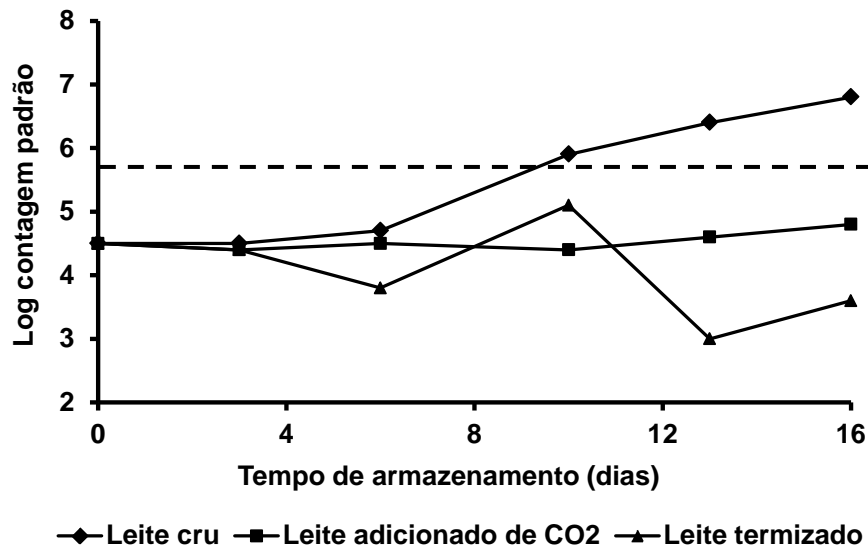


Figura 2 – Log da contagem padrão em placas (ufc/mL) do leite cru, termizado e adicionado de CO₂ durante o armazenamento refrigerado. (---) contagem padrão máxima permitida pela legislação brasileira ($6,0 \times 10^5$ ufc/mL).

A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi significativamente influenciada pelos tratamentos, pelo tempo de armazenamento e pela interação entre estes fatores (Tabela 1). O leite cru controle apresentou contagem de psicrotróficos maior quando comparado ao leite adicionado de CO₂ e ao leite termizado. Os valores médios para a contagem de micro-organismos psicrotróficos foram de $2,0 \times 10^5$, $6,3 \times 10^3$ e $1,6 \times 10^2$ ufc/mL, para o leite cru, adicionado de CO₂ e termizado, respectivamente. Independente do tratamento, a contagem de psicrotróficos aumentou durante o tempo de armazenamento refrigerado para todas as amostras, entretanto, este aumento foi maior para o leite controle (Figura 3).

Embora a legislação brasileira não estipule um padrão de qualidade com base na contagem de micro-organismos psicrotróficos diversos autores (MUIR, 1996; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SANTOS; FONSECA, 2001, SØRHAUG; STEPANIAK, 1997) mostraram que a qualidade dos produtos lácteos pode ser comprometida quando processados com leite cru com essa contagem acima de 10^6 ufc/mL. Como pode ser observado na Figura 3, para o leite cru, o tempo necessário para que se atingisse a contagem crítica de 10^6 ufc/mL foi de ~8 dias, enquanto para o leite adicionado de CO₂ e o leite termizado essa contagem limite não foi atingida até o final do experimento. Após 16 dias de armazenamento refrigerado a contagem de micro-organismos psicrotróficos do leite cru foi 2,2 e 3,8 ciclos log maior que no leite adicionado de CO₂ e no leite termizado, respectivamente.

Tanto a adição de CO₂ quanto a termização inibiram o desenvolvimento dos micro-organismos psicrotórficos. Entretanto, quando os dois métodos de conservação são comparados observa-se que apesar da ação inibidora do CO₂, a contagem de psicrotórficos nesta amostra começou a aumentar após 6 dias de armazenamento refrigerado, enquanto que no leite termizado este aumento pode ser observado somente após o 10º dia. Esta diferença no desenvolvimento de psicrotórficos entre o leite adicionado de CO₂ e o termizado pode ser explicada pela diferença de ação dos métodos sobre estes micro-organismos. A adição de CO₂ inibe o desenvolvimento dos psicrotórficos, prolongando a fase lag e diminuindo a taxa de crescimento (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006). Já a termização inativa os psicrotórficos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), fazendo com que sua contagem seja menor e permaneça assim durante todo o período de armazenamento refrigerado. De maneira geral, estes resultados sugerem que ambos os métodos podem ser utilizados para a conservação do leite cru refrigerado, evitando perdas econômicas e possíveis defeitos de qualidade nos produtos processados. Resultados semelhantes foram observados por Rasolofo et al. (2010) avaliando leite cru, leite adicionado de CO₂ e leite termizado armazenado a 4°C durante 7 dias.

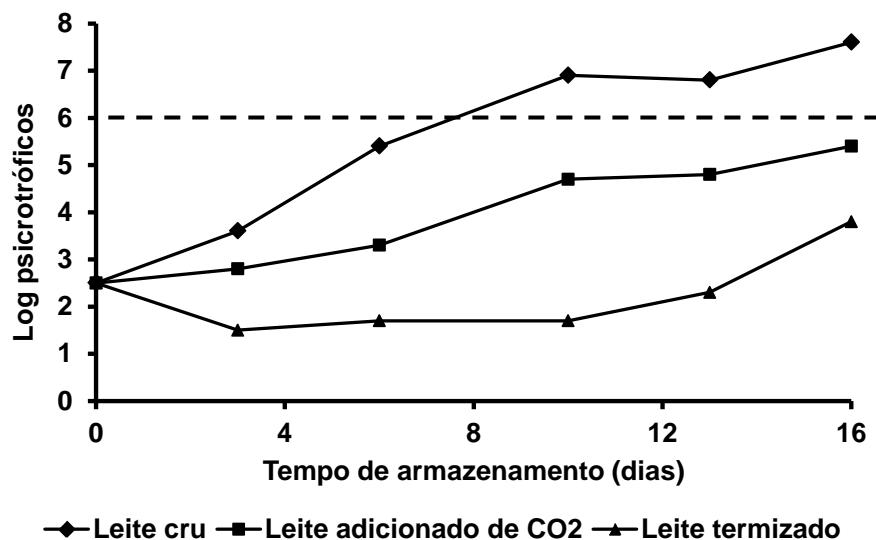


Figura 3 - Log da contagem de psicrotórficos (ufc/mL) do leite cru, termizado e adicionado de CO₂ durante o armazenamento refrigerado. (---) contagem de psicrotórficos considerada crítica para o processamento do leite (10⁶ ufc/mL).

Os tratamentos influenciaram o tempo de fase lag dos micro-organismos psicotróficos (Figura 4a). As amostras de leite adicionado de CO₂ e leite termizado apresentaram aumento de ~2,2 e ~10,3 vezes no tempo de fase lag quando comparadas ao leite cru controle. Este aumento da fase lag pode ser relacionado com os resultados observados no acompanhamento da contagem de psicotróficos que manteve-se constante no leite adicionado de CO₂ até o 6º dia de armazenamento refrigerado (Figura 3). Os efeitos dos tratamentos sobre a taxa de crescimento (Figura 4b) não foram claros e não puderam ser relacionados com a contagem de psicotróficos durante o tempo de armazenamento (Figura 3). De maneira geral, o leite adicionado de CO₂ apresentou menor taxa de crescimento que o leite cru, provavelmente devido à influência do CO₂ no desenvolvimento microbiano. Para o leite termizado foi observada uma maior taxa de crescimento que não reflete o desenvolvimento mais lento dos micro-organismos psicotróficos durante o armazenamento (Figura 3).

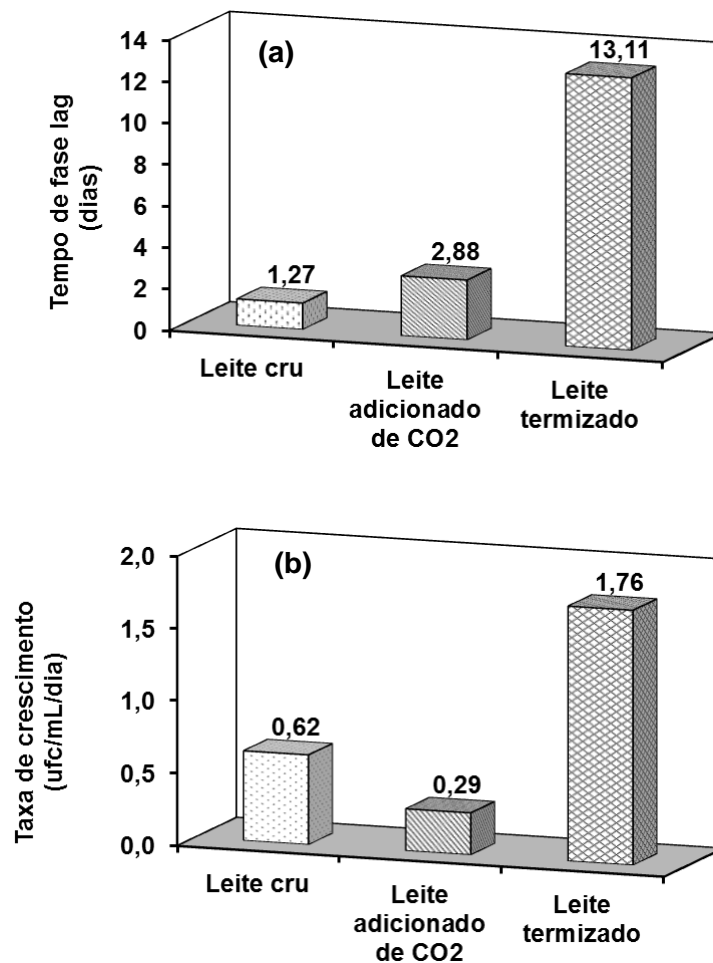


Figura 4 - (a) Tempo de fase lag e (b) taxa de crescimento de micro-organismos psicotróficos no leite cru, leite adicionado de CO₂ e leite termizado.

5.3 EFEITO DA ADIÇÃO DE CO₂ E DA TERMIZAÇÃO SOBRE O PH E A PROTEÓLISE

A Tabela 3 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação destes fatores sobre o pH e proteólise do leite cru.

Tabela 3 – Resultado da avaliação estatística do efeito dos tratamentos sobre o pH e a proteólise das amostras de leite cru refrigerado (n = 3).

	Valor de $p^{(1)}$	
	pH	CN/P ⁽²⁾
Tratamentos ⁽³⁾	< 0,0001	0,3643
Tempo de armazenamento	<0,0001	0,0051
Tratamento x tempo	0,4269	0,9649

⁽¹⁾ $p < 0,05$. ⁽²⁾CN/P: caseína como porcentagem da proteína. ⁽³⁾Tratamentos: leite cru controle, leite cru adicionado de CO₂, leite termizado.

O pH do leite foi influenciado pelos tratamentos e os valores médios são apresentados na Figura 5. Como esperado, o pH do leite adicionado de CO₂ foi significativamente menor que o pH do leite termizado e do leite cru controle, já que a adição do CO₂ provoca a formação de ácido carbônico, e conseqüentemente, o abaixamento do pH (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006). Ma et al. (2001) e Gevaudan et al. (1996) também observaram a diminuição do pH do leite após a injeção de CO₂, e reportam que esse decréscimo foi reversível após a remoção do gás.

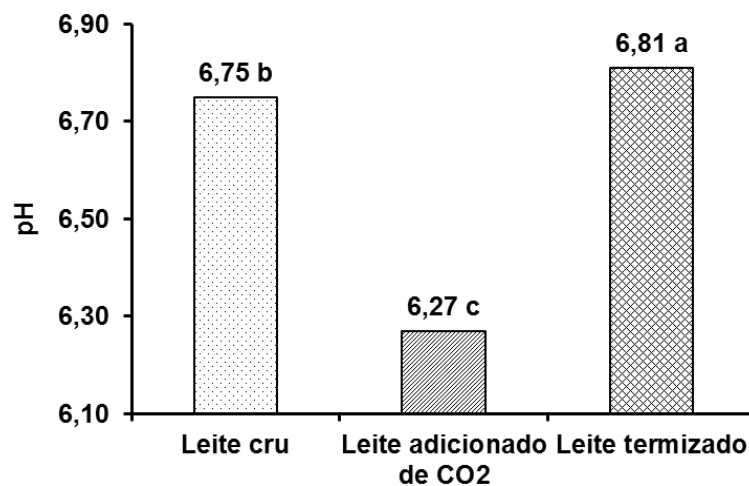


Figura 5 – Efeito dos tratamentos sobre o pH do leite.

O pH do leite também foi afetado pelo tempo de armazenamento. A Figura 6 mostra o comportamento do pH ao longo dos 16 dias de armazenamento refrigerado e nota-se que no leite cru controle e no leite termizado o pH não sofreu variações até o 10º dia e diminuiu significativamente no 16º dia, provavelmente devido ao processo natural de acidificação do leite. O pH do leite adicionado de CO₂ não apresentou variação significativa durante os 16 dias de avaliação, mostrando que a embalagem utilizada foi eficiente para evitar a perda de CO₂ durante o tempo de armazenamento.

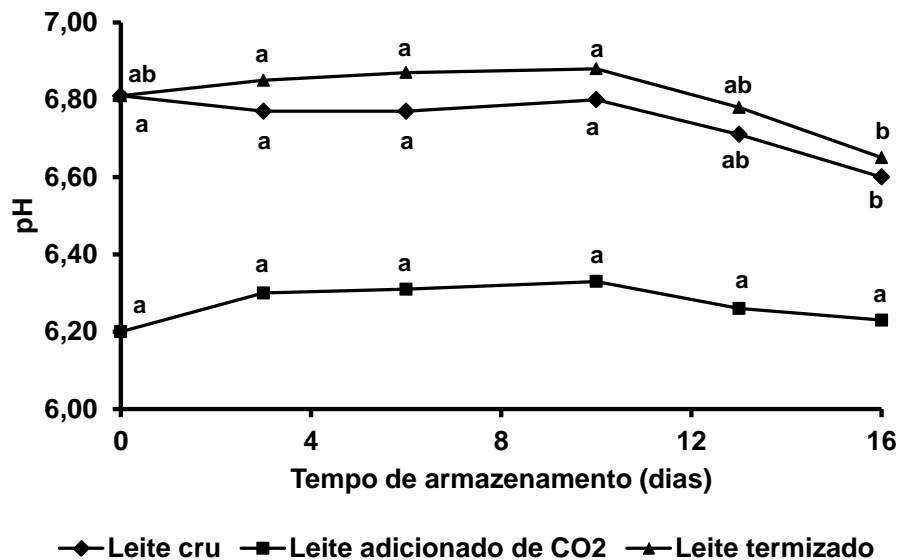


Figura 6 – Comportamento do pH do leite cru controle, adicionado de CO₂ e termizado durante o armazenamento refrigerado.

A proteólise, avaliada pelo decréscimo da relação CN/P (caseína como porcentagem da proteína) foi significativamente influenciada apenas pelo tempo de armazenamento (Tabela 3). Independente do tratamento aplicado, a proteólise aumentou para todas as amostras durante os 16 dias de armazenamento a 4°C (Figura 7).

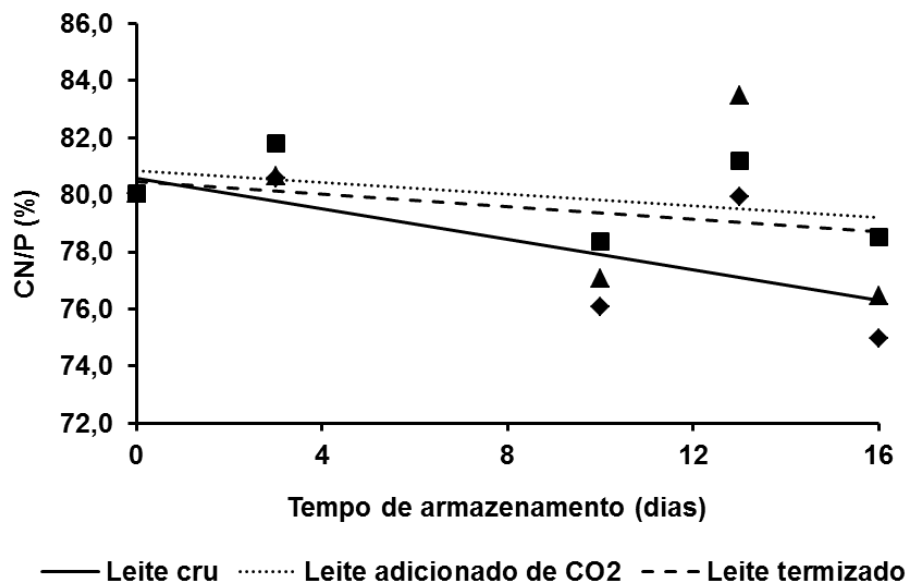


Figura 7 – Comportamento da proteólise (CN/P) durante o armazenamento refrigerado das amostras de leite.

Apesar do leite cru controle apresentar uma contagem de micro-organismos psicrotróficos significativamente maior que as demais amostras (Tabela 2), o que sugere uma maior quantidade de proteases produzidas por estes micro-organismos, não foi possível nas condições deste estudo estabelecer uma relação entre o aumento da proteólise e a contagem de psicrotróficos. Como pode ser observado na Figura 7, o comportamento da proteólise das amostras do leite termizado e do leite adicionado de CO₂ foi semelhante, entretanto, como a avaliação estatística não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3), estes resultados não permitem uma conclusão sobre o melhor método para diminuição da proteólise durante o armazenamento refrigerado do leite.

A diminuição da proteólise em leite cru adicionado de CO₂ como consequência da menor contagem de micro-organismos psicrotróficos foi observada diversos autores (KING; MABBITT, 1982; MA et al., 2001; VIANNA; GIGANTE, 2010), entretanto não foram encontrados trabalhos publicados sobre a influência da termização sobre a proteólise do leite cru.

6 CONCLUSÃO

Através das condições empregadas e dos dados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- A adição de CO₂ e a termização retardaram o desenvolvimento microbiano, mantendo baixas a contagem padrão em placas e a contagem de micro-organismos psicotróficos, ao longo do tempo.

- Observou-se aumento da proteólise em todos os tratamentos, porém os dados não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos.

Desta forma, tanto a adição de CO₂, quanto a termização, associadas às condições adequadas de higiene na ordenha, armazenamento e transporte, podem ser utilizadas como métodos de conservação da qualidade do leite cru, possibilitando às indústrias o processamento de uma de matéria prima de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington, 1992.

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996. **Altera dispositivos do Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarlegislacao.do?operacao=visualizar&id=18058>. Acesso em: 18/11/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.172, p.8-13, 20 set. 2002 a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. Alteração da Instrução Normativa nº 51. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.251, p.6-11, 30 dez. 2011 a. Seção 1.

BRITO, José Reinaldi Feitosa; BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva. A composição e a qualidade do leite. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Eds.). **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1998, p. 46-50.

CARVALHO, A. F; FREITAS, R.; CAMPOS, F. M.; **Qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Viçosa – MG**, Disponível em <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p055.pdf>>. Acesso em: 18/11/2011.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy Microbiology Handbook**. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 39-90.

CHAMPAGNE, C. P. et al. M.W.Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**. V. 64, n. 1. p. 157-160, 1981.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119-163.

ENEROTH, A. et al. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v. 10, p. 325-331, 2000.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p. 249–253, 1997.

EVANGELISTA, D. T. **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos**. 2008. 65p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONSECA, C. S. P. **Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais**. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **A qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Black Academic and Professional, 1998. 478p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. Ver. Amol. Barueri, SP: Manoel, 2008, 986 p.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: Dürr, J. W. et al. (Eds.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**, 2004, Passo Fundo. Anais... Passo Fundo: UPF, 2004. p. 235-254.

GRUETZMACHER, T. J.; BRADLEY Jr., R. L. Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 6, p. 625-631, 1999.

GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

GEVAUDAN, S.; LAGAÚDE, A.; TARODO DE LA FUENTE, CUQ, J.L. Effect of treatment by gaseous carbon dioxide on the colloidal phase of skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1713-1721, 1996.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 25-34, 2002.

HARDING, F. **Milk quality**. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165p.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 5, p. 158-168, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002 – 2003**. Aquisição alimentar domiciliar per capita. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002/pof2002.pdf>>. Acesso em: 15/12/2011.

JAYARAO, B. M. et al. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3561-3573, 2004.

KING, J. S.; MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 439–447, 1982.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation of ultra-high-temperature sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, n. 1, p. 145-148, 1977.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. In: SMIT, G. **Dairy processing – Improving quality**. Boca Raton: CRC Press, p. 5-38, 2000.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1959-1968, 2001.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition on raw milk on proteolysis and lipolysis at 4 °C. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1616-1631, 2003.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1932-1940, 2003.

MARTINS, M. C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 13, n. 3, p. 38-51, 2004.

MARTINS, P. R. G. et al. Produção e qualidade do leite em sistemas de produção da região leiteira de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 212-217, 2007.

MESQUITA, I. V. U ; MEDEIROS, A. N. Efeito da dieta na composição química e Características sensoriais do leite de cabras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora: v. 59, n. 337, 2004.

MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: **Simpósio internacional sobre qualidade do leite**. Curitiba. Anais... Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p. 40-43.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 24-32 e p. 67-72, 1996.

NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p.191-195, 2005.

NÖRNBERG, M. de F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrótróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

PADILHA, M. do R. de F. et al. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 167-171, 2001.

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

RASOLOFO, E. A.; ST-GELAIS, D.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 108-118, 2010.

ROBERTS, R. F.; TORREY G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 52-60, 1988.

ROWE, M. T. Effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens*, **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 51-56, 1988.

RUAS-MADIEDO, P. et al. Influence of Carbon Dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1552-1555, 1998.

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

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L.da. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v. 19, n. 1, p. 1215, 2003.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens com atmosfera modificada**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. 114 p.

SILVEIRA, T. M. L. **Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino**. 2002. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 35-40, 1997.

TEIXEIRA, A. M. et al. Agilizando a contagem de bactérias em leite cru brasileiro. **Indústria de Laticínios**, v. 4, n. 25, p. 46-49, 2000.

VIANNA, P. C. B.; GIGANTE, M. L. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado adicionado de dióxido de carbono. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 375, p. 51-59, 2010.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y fisicalactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 762p.

ZOCHE, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science** v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.