

MARIANNE AYUMI SHIRAI

**CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU PELA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE
CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Masson

CURITIBA

2010


-
- S558 Shirai, Marianne Ayumi
Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. / Marianne Ayumi Shirai . - Curitiba, 2010.
90f. . : il. [algumas color.] ; 30 cm.
Impresso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, 2010.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Masson.
1. Leite - Contaminação. 2. Leite – Composição. I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lucia, III. Título.
- CDD: 637.127

MARIANNE AYUMI SHIRAI

CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU PELA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora:



Prof.^a. Dr.^a. MARIA LÚCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof.^a. Dr.^a. MARCIA REGINA BEUX
Setor de Ciências Biológicas, UFPR



Prof.^a. Dr.^a. LUCIANA DE SOUZA NEVES ELLENDERSEN
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que não mediram esforços para garantir a educação de seus filhos.

Àqueles que acreditam e incentivam a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé e força para suportar os momentos difíceis e por não me deixar de desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais Ricardo e Suzana pelo exemplo de humildade, honestidade e dedicação ao trabalho. Agradeço imensamente por sempre me incentivar a estudar e por ser meu porto seguro.

Ao meu irmão Alysson pela companhia, apoio e por me servir de exemplo de determinação.

Aos parentes de Curitiba que gentilmente me receberam e pelo apoio dado durante esses últimos anos. Agradeço também os deliciosos e divertidos almoços de domingo que me proporcionaram.

Aos parentes e amigos do “norte” pelo incentivo e recepção nos feriados.

Ao meu namorado Fabio por sempre apoiar minhas decisões, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis.

Aos amigos Suellen, Tiemi; Flávio, Gabrieli, Maike, Fabiane e Vítor pela força, ajuda, companhia e contribuição no meu crescimento pessoal.

A orientadora Prof.^a Dr.^a. Maria Lucia Masson pela amizade e incentivo.

A Prof.^a Dr.^a. Márcia Regina Beux e Dr.^a. Luciana de Souza Neves Ellendersen pela participação na banca de defesa e pelas correções sugeridas para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot e à Prof.^a Dr.^a. Nina Waszczyjnskyj pela participação na banca de qualificação e sugestões dadas ao trabalho.

Aos colegas de turma do mestrado Andréia, Cristina, Diana, Érika, Eriel, Elisa, Fabíula e Milene pelo convívio e amizade.

Aos colegas de mestrado “calouros” Valesca, Marlene, Diego, Danielle, João, Marilice, Cátia e Renata.

Aos colegas doutorandos Bogdan, Silvana e Cristina Benincá.

A UFPR e ao PPGTA pela oportunidade.

Aos professores da UFPR e do PPGTA pelos conhecimentos transmitidos.

Aos professores da prática de docência do Reuni Regina Maria Matos Jorge, João Batista Chiocca e Luciana Igarashi Mafra pela oportunidade de participar da disciplina de Fenômenos de transporte experimental II.

Ao secretário Paulo pelos serviços prestados e conselhos.

Ao Prof. Dr. Papa Matar Ndiaye por permitir o uso da linha de carbonatação.

A Fazenda Escola que concedeu as amostras de leite e ao Ceppa por permitir a realização da análise de turbidez.

Ao aluno de iniciação tecnológica Ramon pelo auxílio nas análises, pela companhia e amizade.

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal: muito obrigada!

RESUMO

O armazenamento do leite sob refrigeração trouxe benefícios para o setor leiteiro, pois houve uma redução da perda do produto devido à ação acidificante de bactérias mesófilas. Se a contagem inicial de microrganismos for alta, a refrigeração por longos períodos pode favorecer o desenvolvimento de um subgrupo dos mesófilos denominados de psicrotróficos. Os psicrotróficos são capazes de produzir enzimas extracelulares que resistem ao tratamento térmico e a sua intensa atividade pode acarretar na perda da qualidade do leite e produtos lácteos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da acidificação com CO₂ sobre as características microbiológicas, a viscosidade e a turbidez do leite cru obtido de dois produtores (A e B) da região metropolitana de Curitiba - PR. Na primeira etapa avaliou-se o leite quanto: pH, acidez Dornic, proteínas, gordura, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado, cinzas, densidade, viscosidade e turbidez. A segunda etapa consistiu no emprego de um planejamento fatorial 2³ completo com repetição em triplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis independentes pH de acidificação (entre 5,8 e 6,4), tempo (entre 0 e 10 dias) e temperatura (entre 5 e 10°C) de armazenamento do leite acidificado frente às variáveis dependentes mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos e lipolíticos, coliformes totais, viscosidade e turbidez. Estatisticamente os dados foram tratados por ANOVA e metodologia de superfície de resposta. Houve diferença estatística nas características físico-químicas do leite cru dos dois produtores. Após 10 dias de armazenamento a 5°C, a acidificação em pH 5,8 mostrou-se mais eficiente com uma redução de 1,61 ciclos logaritmos para A e 1,13 para B no crescimento de mesófilos; 2,00 e 2,33 ciclos logaritmos para psicrotróficos; 1,56 e 3,80 ciclos logaritmos para psicrotróficos proteolíticos; 0,23 e 1,52 ciclos logaritmos para psicrotróficos lipolíticos e 1,45 e 1,20 ciclos logaritmos para coliformes totais. A viscosidade não foi afetada logo após a acidificação, no entanto durante o armazenamento verificou-se um aumento nos valores. Houve aumento na turbidez devido à acidificação e para esta propriedade também foi observada elevação nos valores durante o armazenamento refrigerado. A superfície de resposta mostrou que, em geral, os modelos lineares são capazes de representar bem a variabilidade dos resultados obtidos e através dos gráficos observou-se que a tendência de resposta foi parecida para os dois produtores. Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a acidificação com CO₂ aumenta o tempo útil do leite cru através da inibição do crescimento de microrganismos.

Palavras-chave: Acidificação. Viscosidade. Metodologia de superfície de resposta. Microrganismos.

ABSTRACT

The storage of milk under refrigeration brought benefits to the dairy industry, because there was a reduction of product loss due to the acidification action of mesophilic bacteria. If the initial count of microorganism is high, refrigeration for long periods can promote the development of a subgroup of mesophiles named psychrotrophs. The psychrotrophs are able to produce extracellular enzymes that are resistant to heat treatment and its intense activity can result in loss quality of milk and dairy products. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of acidification with CO₂ under the microbiological characteristics, viscosity and turbidity of raw milk obtained from two producers (A and B) in Curitiba and its adjacencies. In the first step, milk was evaluated as pH, acidity, protein, fat, lactose, total dry extract, ash, density, viscosity and turbidity. The second step consisted in use of a Full Factorial Design 2³ with triplicate in central point to evaluate the effect of independent variables pH acidification (between 5.8 and 6.4), time (between 0 and 10 days) and temperature (between 5 and 10°C) storage of acidified milk face of dependent variables mesophiles, psychrotrophs, proteolytic and lipolytic psychrotrophs, total coliform, turbidity and viscosity. The analysis of variance (ANOVA) and response surface methodology were used to statistical analyses. For the physico-chemical characterization there was statistical difference between the two producers. After 10 days of storage at 5 °C, acidification at pH 5.8 was more efficient in the inhibition of all microorganism studied, with reduction of 1.61 log for A and 1.13 for B on the growth of mesophilic bacteria, 2.00 and 2.33 log for psychrotrophic, 1.56 and 3.80 log for proteolytic psychrotrophic, 0.23 and 1.52 log for lipolytic psychrotrophic and 1.45 and 1.20 log for total coliforms. The viscosity was not affected immediately after acidification, however during cold storage there was an increase in values. There was an increase in turbidity due to acidification and this property was also altered during refrigerated storage. The methodology of response surface showed that, in general, linear models are able to represent well the variability of results obtained and through the graphs the tendency of response was similar for the two producers. The results demonstrated that the acidification with CO₂ increases the shelf-life of raw milk by inhibiting the growth of microorganisms.

Key words: Acidification. Viscosity. Response surface methodology. Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 19 |
| FIGURA 2 – SISTEMA PARA ACIDIFICAÇÃO DO LEITE CRU COM DIÓXIDO DE CARBONO..... | 20 |
| FIGURA 3 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS..... | 34 |
| FIGURA 4 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C..... | 35 |
| FIGURA 5 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1 | 35 |
| FIGURA 6 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS | 40 |
| FIGURA 7 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C | 41 |
| FIGURA 8 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1 | 41 |
| FIGURA 9 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS..... | 45 |
| FIGURA 10 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C | 45 |
| FIGURA 11 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1 | 46 |
| FIGURA 12 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS | 50 |
| FIGURA 13 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C..... | 50 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 14 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM PH 6,1 | 51 |
| FIGURA 15 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO PH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS | 55 |
| FIGURA 16 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO PH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C | 55 |
| FIGURA 17 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM PH 6,1 | 56 |
| FIGURA 18 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO PH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS | 60 |
| FIGURA 19 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO PH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C | 60 |
| FIGURA 20 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM PH 6,1 | 61 |
| FIGURA 21 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO PH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS | 63 |
| FIGURA 22 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO PH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C | 63 |
| FIGURA 23 – GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM PH 6,1 | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - VOLUME DE LEITE CRU ADQUIRIDO E INDUSTRIALIZADO NO BRASIL..... | 5 |
| TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE DE VACA | 6 |
| TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE SAIS CONSTITUINTES DO LEITE..... | 8 |
| TABELA 4 – ESPECIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS E DA REGIÃO EXPERIMENTAL .. | 22 |
| TABELA 5 – DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ COMPLETO, COM REPETIÇÃO EM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL | 22 |
| TABELA 6 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU..... | 28 |
| TABELA 7 – CONTAGEM DE MESÓFILOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE | 31 |
| TABELA 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE MESÓFILOS | 33 |
| TABELA 9 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE | 37 |
| TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA, ESTIMATIVA DOS EFEITOS E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS..... | 39 |
| TABELA 11 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE | 43 |
| TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS | 44 |
| TABELA 13 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE | 47 |
| TABELA 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS | 49 |
| TABELA 15 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE | 52 |
| TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE COLIFORMES | 54 |
| TABELA 17 – VALORES DE VISCOSIDADE E TURBIDEZ DO LEITE DOS PRODUTORES A E B | 57 |

| | |
|--|----|
| TABELA 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA VISCOSIDADE | 59 |
| TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA TURBIDEZ..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| ANOVA | - Análise de variância |
| CO ₂ | - Dióxido de Carbono |
| F | - Fator do teste "F" |
| FAO | - Food Agriculture Organization |
| HCl | - Ácido Clorídrico |
| IAL | - Instituto Adolfo Lutz |
| IBGE | - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IN | - Instrução normativa |
| MAPA | - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento |
| NTU | - Unidades de turbidez nefelométricas |
| ppm | - Partículas por milhão |
| PR | - Paraná |
| R ² | - Coeficiente de determinação |
| UFC | - Unidades formadoras de colônia |
| UHT | - Ultra High Temperature |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 OBJETIVO..... | 3 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL..... | 4 |
| 2.2 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE..... | 5 |
| 2.3 MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS | 8 |
| 2.3.1 Contaminação do leite por psicrotróficos..... | 10 |
| 2.3.2 Produção de lipases e proteases por psicrotróficos | 11 |
| 2.4 ACIDIFICAÇÃO DO LEITE COM DIÓXIDO DE CARBONO | 13 |
| 2.4.1 Influência da acidificação sobre a microbiota do leite | 13 |
| 2.4.2 Influência da acidificação sobre os componentes do leite..... | 16 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 MATERIAL | 18 |
| 3.1.1 Leite..... | 18 |
| 3.1.2 Dióxido de carbono | 18 |
| 3.2 MÉTODOS | 19 |
| 3.2.1 Acidificação do leite com dióxido de carbono..... | 20 |
| 3.2.2 Delineamento experimental..... | 21 |
| 3.2.3 Análises Físico-Químicas | 23 |
| 3.2.3.1 pH..... | 23 |
| 3.2.3.2 Acidez titulável | 23 |
| 3.2.3.3 Gordura | 23 |
| 3.2.3.4 Frações nitrogenadas..... | 23 |
| 3.2.3.5 Densidade | 24 |
| 3.2.3.6 Extrato seco total..... | 24 |
| 3.2.3.7 Extrato seco desengordurado | 24 |
| 3.2.3.8 Cinzas | 24 |
| 3.2.3.9 Lactose..... | 25 |
| 3.2.3.10 Viscosidade | 25 |
| 3.2.3.11 Turbidez | 25 |
| 3.2.4 Análises Microbiológicas | 25 |
| 3.2.4.1 Contagem total de mesófilos | 25 |
| 3.2.4.2 Contagem total de psicrotróficos | 26 |
| 3.2.4.3 Contagem de psicrotróficos proteolíticos..... | 26 |
| 3.2.4.4 Contagem de psicrotróficos lipolíticos | 26 |
| 3.2.4.5 Contagem de Coliformes totais | 26 |
| 3.5 ANÁLISE DOS DADOS..... | 27 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU | 28 |
| 4.2 CONTAGEM DE MESÓFILOS..... | 30 |
| 4.2.1 Superfície de resposta para contagem de mesófilos..... | 32 |
| 4.3 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS..... | 36 |
| 4.3.1 Superfície de resposta para contagem de psicrotróficos..... | 38 |
| 4.4 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS..... | 42 |
| 4.4.1 Superfície de resposta para contagem de psicrotróficos proteolíticos | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS | 46 |
| 4.5.1 Superfície de resposta para contagem de psicrotróficos lipolíticos | 48 |
| 4.6 CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS | 51 |
| 4.6.1 Superfície de resposta para contagem de coliformes totais | 53 |
| 4.7 VISCOSIDADE E TURBIDEZ..... | 56 |
| 4.7.1 Superfície de resposta para viscosidade..... | 58 |
| 4.7.2 Superfície de resposta para turbidez..... | 61 |
| 5 CONCLUSÕES | 65 |
| SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento importante na dieta humana devido ao seu valor nutricional e biológico. Por ser um produto de fácil deterioração, é necessária a utilização de métodos de conservação para reduzir parcial ou totalmente a microbiota patogênica e deteriorante para prolongar o seu tempo de consumo com segurança e qualidade.

No primeiro trimestre do ano de 2009 foram adquiridos aproximadamente 4,9 bilhões de litros de leite pelos estabelecimentos industriais que atuam sob algum tipo de inspeção. Comparativamente, tanto ao mesmo período de 2008 observou-se certa estabilidade da aquisição (IBGE, 2009). Diante de valores expressivos que a produção de leite apresenta no Brasil, problemas relacionados à falta de qualidade configuram-se em um fator preocupante. A qualidade do leite está associada, de forma geral, com a carga microbiana presente no produto.

O setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte do leite, visando a melhoria na qualidade do produto nacional. Nos últimos anos, tem-se observado a adoção acelerada de resfriamento do produto na fazenda após a ordenha, com posterior coleta e transporte do leite em caminhões-tanque isotérmicos (SANTOS; FONSECA, 2003). Esse procedimento foi regulamentado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa n° 51 em 2002 (BRASIL, 2002).

O armazenamento do leite cru refrigerado na fonte de produção possui as vantagens de reduzir custos de produção, transporte e perda do produto devido à atividade acidificante de bactérias mesófilas.

Conforme Santos e Fonseca (2001), a eficiência da refrigeração do leite logo após a ordenha é maximizada se associada a outros fatores, como a adoção de práticas higiênicas durante a ordenha. 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 microrganismos psicrotóxicos. Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura, um resfriamento marginal do leite.

Os níveis de contaminação por microrganismos psicrotróficos têm-se tornado uma séria preocupação do ponto de vista da qualidade e em relação à segurança alimentar, visto que algumas espécies psicrotróficas são patogênicas (BRUM, 2004).

Deve-se considerar ainda que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, por períodos prolongados, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicrotróficas, sendo que muitas destas enzimas são termorresistentes (GRIFFITHS PHILIPS; MUIR, 1981; PATEL; BARTLETT; HAMID, 1983). Com o aumento da proteólise há uma redução no valor econômico do leite pelo seu impacto negativo sobre as proteínas funcionais, especialmente a caseína (MA; BARBANO; SANTOS, 2003). O desenvolvimento de altos níveis de ácidos graxos livres devido à lipólise transmite sabor ranço em produtos lácteos, tornando-os sensorialmente inaceitáveis (MA *et al.*, 2000).

Uma das tecnologias propostas para controlar o crescimento destes microrganismos durante o armazenamento refrigerado é a acidificação do leite por injeção de dióxido de carbono ou carbonatação. Estudos indicam que o dióxido de carbono é um inibidor efetivo no crescimento de bactérias psicrotróficas em leite cru.

De acordo com Ma e Barbano (2003), a indústria leiteira tem interesse em expandir o uso da tecnologia com dióxido de carbono e para buscar novas oportunidades é importante o entendimento minucioso do impacto da adição da mesma sobre os componentes do leite.

A legislação brasileira não prevê o uso de aditivos químicos e coadjuvantes de tecnologia no leite cru (BRASIL, 2002) justificando a importância de um estudo detalhado desta tecnologia para evitar o emprego indiscriminado ou sem parâmetros de processos devidamente definidos. Dessa forma, a tecnologia de acidificação com CO₂ para aumentar o tempo de conservação do leite poderia ser viável para uso em escala industrial ou até mesmo na propriedade rural.

Diante do exposto, este trabalho visa avaliar o efeito das variáveis pH de acidificação, tempo e temperatura de armazenamento sobre a viscosidade, turbidez e características microbiológicas do leite cru coletados de dois produtores da região metropolitana de Curitiba - PR.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da acidificação do leite cru com dióxido de carbono sobre a viscosidade, turbidez e características microbiológicas durante o armazenamento em diferentes temperaturas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a caracterização físico-química do leite cru refrigerado.

Avaliar através de um planejamento fatorial completo a influência das variáveis pH, tempo e temperatura de armazenamento sobre as variáveis dependentes mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, psicrotróficos lipolíticos, coliformes totais, viscosidade e turbidez.

Verificar se amostras de leite obtidas de diferentes produtores e maneiras de obtenção (manual ou mecânica) apresentam respostas semelhantes frente às variáveis pH, tempo e temperatura de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

A produção de leite tem um papel fundamental em todas as economias, especialmente nos países em desenvolvimento, porque além de envolver um componente social, o leite é considerado um produto essencial para a população nestes países (ZOCCAL; GOMES, 2005).

O sistema agroindustrial do leite tem sido um dos mais importantes no agronegócio brasileiro. Em termos mundiais, a produção brasileira de leite de vaca ocupou a sexta posição, atrás dos Estados Unidos, Índia, China, Rússia e Alemanha, segundo os dados estimados pela FAO em 2006 (IBGE, 2006).

Em 2007, as regiões brasileiras que se destacaram foram o Sudeste (47,2%), Sul (25,7 %) e Centro-oeste (16 %), com 89% da produção nacional, seguidas das regiões Nordeste e Norte com respectivamente 5,8 % e 5,0 %. Os maiores estados produtores de leite foram Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Santa Catarina (MAPA, 2007).

No Brasil, a pecuária leiteira é praticada em todo o território nacional. As condições climáticas do País permitem a adaptação da atividade às peculiaridades regionais. Observa-se, conseqüentemente, a existência de diversas formas ou modelos de produção de leite. Existem sistemas com diferentes graus de especialização, desde propriedades de subsistência, utilizando técnicas rudimentares e produção diária menor que dez litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, usando tecnologias avançadas e com produção diária superior a 50 mil litros (ZOCCAL; GOMES, 2005).

A TABELA 1 mostra o volume de leite cru resfriado que foi utilizado e adquirido pelos estabelecimentos industriais brasileiros que estão sob inspeção sanitária municipal, estadual e federal, no período de julho de 2008 a maio de 2009. Os dados do IBGE (2009) mostraram que a aquisição e industrialização do leite apresentaram certa estabilidade durante o período pesquisado.

TABELA 1– VOLUME DE LEITE CRU ADQUIRIDO E INDUSTRIALIZADO NO BRASIL.

| Período | Volume adquirido (litros) | Industrializado (litros) |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| Julho 2008 | 1.594.165 | 1.592.131 |
| Agosto 2008 | 1.573.243 | 1.570.080 |
| Setembro 2008 | 1.509.183 | 1.504.937 |
| Outubro 2008 | 1.582.565 | 1.576.635 |
| Novembro 2008 | 1.618.610 | 1.611.360 |
| Dezembro 2008 | 1.727.775 | 1.719.637 |
| Janeiro 2009 | 1.771.773 | 1.763.116 |
| Fevereiro 2009 | 1.573.428 | 1.563.320 |
| Março 2009 | 1.612.531 | 1.605.704 |
| Abril 2009 | 1.449.138 | 1.446.296 |
| Mai 2009 | 1.431.047 | 1.418.787 |
| Junho 2009 | 1.404.575 | 1.393.779 |

FONTE: IBGE, Pesquisa Trimestral do leite (2009).

A pecuária leiteira no Brasil vem sendo marcada, nos últimos anos, por um intenso processo de especialização da produção. Apesar de o cenário atual ser mais positivo para a pecuária de leite, alguns pontos devem ser observados para promover o crescimento do setor:

- aumento da demanda por produtos lácteos;
- programa de incremento da produção de sólidos no leite cru;
- programa de melhoria de qualidade do leite;
- aumento da rentabilidade na cadeia, com a diminuição do número de intermediários e também de custos logísticos;
- aumento da produtividade, participação governamental no sentido de disponibilizar recursos para apoio à comercialização, incluindo contratos de opção privada, além da abertura de mercados ainda fechados ao Brasil (MAPA, 2007).

2.2 DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas

e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002).

Do ponto de vista biológico, o leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos (ORDÓÑEZ, 2005).

A água é o componente mais abundante no qual se encontram em solução os demais compostos. Alguns minerais apresentam-se na forma de solução iônica, a lactose e a albumina aparecem como solução verdadeira, a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura na forma de pequenos glóbulos dispersos, constituindo uma emulsão (TRONCO, 2008). A composição aproximada do leite de vaca está apresentada na TABELA 2.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE DE VACA

| Constituinte | Teor (g/100g) | Varição (g/100g) |
|----------------------|---------------|------------------|
| Água | 87,3 | 85,5 – 88,7 |
| Lactose | 4,6 | 3,8 – 5,3 |
| Gordura | 3,9 | 2,4 – 5,5 |
| Proteínas | 3,25 | 2,3 – 4,4 |
| Substâncias minerais | 0,65 | 0,53 – 0,8 |
| Ácidos orgânicos | 0,18 | 0,13 – 0,22 |
| Outros | 0,14 | - |

FONTE: Adaptado de WALSTRA e JENNES (1984).

O conteúdo de gordura é a fração mais variável e está presente principalmente na forma de triglicerídeos e corresponde a aproximadamente 98% da gordura do leite. Os 2% consistem em diglicerídeos, monoglicerídeos, colesterol, fosfolipídeos, ácido graxo livre e cerebrosídeos (WALSTRA; JENNESS, 1987).

Os lipídeos ocorrem como glóbulos, com 0,1 – 20 μm de diâmetro, envolvidos por uma membrana, o qual atua como emulsificante. A concentração de lipídeos varia com a espécie, raça, estágio de lactação, infecção mastítica, entre outros. Os lipídeos do leite exibem variação na composição dos ácidos graxos e no tamanho e estabilidade dos glóbulos. Estas variações, especialmente no perfil de ácidos graxos, são impossíveis de serem padronizadas e por isso são responsáveis pela diferença nas propriedades reológicas, cor, estabilidade química e propriedades nutricionais de produtos lácteos que contém gordura (FOX, 2000).

As proteínas do leite são divididas em duas classes principais. A primeira fração, que corresponde a aproximadamente 80% da proteína total do leite bovino, é formada pela caseína. A segunda fração compreende as proteínas do soro lácteo (CHEFTEL *et al.*, 1989).

A caseína é definida como uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e ao fósforo e precipita-se quando o leite é acidificado até pH 4,6 a 20 °C (GUIZANI, 2007). É formada por várias submicelas α (α_{s1} , α_{s2}), β e κ , mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas, apresentando um comportamento distinto frente ao cálcio: as frações α e β são sensíveis, enquanto a fração κ é insensível ao cálcio. Tal comportamento explica a ação estabilizadora da κ -caseína, que protege as frações α_s e β em relação ao cálcio (TRONCO, 2008).

As proteínas do soro possuem formato globular e incluem: β - lactoglobulina, α - lactoalbumina, albumina do soro, lactotransferrina e imunoglobulinas. O leite ainda contém numerosas proteínas menores, especialmente enzimas que são desprezíveis por seu peso, mas não pela sua atividade (GUIZANI, 2007; WALSTRA; JENNESS, 1987).

A lactose é o açúcar predominante e é um dissacarídeo redutor formado por uma molécula de glicose e galactose onde se encontra totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite. Esta proporciona ao leite um sabor adocicado e constitui a principal fonte de carbono da maioria dos microrganismos que crescem no leite (GUIZANI, 2007; WALSTRA; JENNESS, 1987).

Os minerais do leite são principalmente sais inorgânicos, onde uma parte se encontra ionizada e outra em forma de sais complexos. Nem todos os sais encontram-se em solução, as micelas de caseína contêm fosfato de cálcio não dissolvido e traços de citrato, o primeiro se denomina de fosfato de cálcio coloidal. Alguns cátions como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} se associam às proteínas carregadas negativamente, também podem ser encontradas pequenas quantidades de outros íons, como Cl^- . Quase todos os sais do leite se encontram no soro e nas micelas de caseína e uma quantidade mínima unida aos glóbulos de gordura. O leite possui ainda na composição fósforo, na forma de ortofosfato, e enxofre (WALSTRA; JENNESS, 1987). A Tabela 3 mostra a concentração média dos sais que constituem o leite.

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE SAIS CONSTITUINTES DO LEITE

| Constituinte | Conteúdo médio (mg/ L) | Varição |
|-----------------------------------|------------------------|-------------|
| Sódio | 500 | 350 - 600 |
| Potássio | 1450 | 1350 – 1550 |
| Cálcio | 1200 | 1000 – 1400 |
| Magnésio | 130 | 100 – 150 |
| Fósforo (total) ^a | 950 | 750 – 1100 |
| Fósforo (inorgânico) ^b | 750 | c |
| Cloreto | 1000 | 800 – 1400 |
| Sulfato | 100 | c |
| Carbonato (como CO ₂) | 200 | c |
| Citrato (como ácido cítrico) | 1750 | c |

^a Fósforo total incluindo fosfato coloidal inorgânico, fosfato caseína, fosfato inorgânico solúvel, éster de fosfato e fosfolipídeos.

^b Fósforo (inorgânico) incluindo fosfato coloidal inorgânico e fosfato inorgânico solúvel.

^c variação não informada pelos autores.

FONTE: Adaptado de FOX; McSWEENEY (1998)

No leite, as enzimas são encontradas em baixas concentrações, mas sua atividade é tal que, por serem catalisadores bioquímicos, podem provocar importantes mudanças, inclusive em baixa concentração (ORDÓÑEZ, 2005). Além de suas enzimas naturais (lilases, peroxidases, catalases, fosfatases, etc), o leite possui também enzimas provenientes de microrganismos (TRONCO, 2008).

O leite contém diversas vitaminas (mesmo que algumas estejam presentes apenas como traços), classificadas em lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (B e C). A maioria das vitaminas hidrossolúveis (complexo B) é sintetizada pelos microrganismos do rúmen e, dessa forma, os níveis de vitaminas no leite refletem os níveis presentes no sangue. As vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) estão associadas com glóbulos de gordura do leite. O leite ainda possui vitaminas B₁ e B₂ (SANTOS; FONSECA, 2002).

2.3 MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

Microrganismos psicrotróficos são aqueles que crescem em alimentos sob refrigeração (0-7°C), mas apresentam temperatura ótima acima de 20°C. São

definidos como microrganismos capazes de produzir crescimento visível a 7 ± 1 °C no prazo de 7 a 10 dias, independente de sua temperatura ótima (COLLINS, 1981).

Na classificação tradicional dos microrganismos em função da temperatura – termófilos, mesófilos e psicrófilos – os psicrotróficos são um subgrupo dos mesófilos, não dos psicrófilos, porque esses últimos não sobrevivem à temperatura ambiente. Os psicrotróficos, ao contrário, se multiplicam em alimentos refrigerados, mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila (SILVA *et al.*, 2007).

Os microrganismos psicrotróficos são ubíquos na natureza e suas principais fontes são o solo, poeira, ar, água, vegetação e fezes (SHAH, 1994). O número de microrganismos psicrotróficos no leite cru está relacionado com as condições higiênicas de produção e com o binômio tempo e temperatura no qual o leite é mantido até o seu processamento (COUSIN, 1982).

Quando o leite é obtido em condições sanitárias adequadas, a microbiota psicrotrófica representa menos de 10% da microbiota total do leite fresco, comparado a mais de 75% sob condições não sanitárias (NIELSEN, 2002).

As bactérias psicrotróficas encontradas no leite e nos produtos lácteos não constituem um grupo taxonômico específico. As cepas descritas pertencem aos dois grandes grupos de bactérias (Gram positivas e Gram negativas), e foram incluídas em pelo menos 15 gêneros (ORDÓÑEZ, 2005).

Os gêneros envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Yersinia*, *Staphylococcus* e *Listeria*, além de algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras. *Pseudomonas* e *Bacillus* são os principais gêneros envolvidos, sendo *Pseudomonas* o predominante (MARSHALL; SCHIMIDT, 1998). Além desses gêneros incluem também *Serratia*, *Corynebacterium* e *Clostridium*, entre outros microrganismos psicrotróficos do leite, podendo a *Yersinia*, *Bacillus* e *Listeria* serem capazes de provocar enfermidades em humanos pela ingestão de leite cru, em condições especiais (FONSECA; SANTOS, 2000).

Existe também um grupo de microrganismos denominados de psicrotróficos termodúricos, que além de se multiplicarem sob refrigeração, sobrevivem à pasteurização. Espécies mais freqüentes deste grupo pertencem ao gênero *Bacillus* e sua origem está relacionada à água, tetas/úberes, solo e equipamentos mal higienizados. Não só suas enzimas, mas o próprio microrganismo continua viável por toda a cadeia produtiva desde a sua ordenha até o produto final (SILVA, 2005).

2.3.1 Contaminação do leite por psicotróficos

No Brasil, o leite *in natura* apresenta baixa qualidade quando comparado a outros países mais desenvolvidos, sendo que este fator está relacionado com a influência das estações do ano, as práticas de produção e manuseio na fazenda, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria. Além dos fatores anteriores, também contribuem para a presença e o desenvolvimento de microrganismos contaminantes no leite: a qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, sanidade dos ordenhadores e dos animais e principalmente, utensílios não higienizados corretamente (HUHN *et al.*, 1980).

A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação (FAGUNDES *et al.*, 2006) e os laticínios tem contado com isso para manter a qualidade do leite cru durante o armazenamento e transporte. No entanto, quanto maior o tempo de estocagem sob baixas temperaturas (7 a 10°C) de um leite apresentando alta contagem inicial de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final (leite pasteurizado, leite ultra pasteurizado e queijos), pela ação de microrganismos psicotróficos (MUIR, 1996).

Arcuri *et al.* (2008), analisaram amostras de leite cru refrigerado coletados de tanques individuais e coletivos da região da Zona da Mata – Minas Gerais e da região sudeste do Rio de Janeiro. Foi constatado que a contagem inicial de bactérias psicotróficas no leite cru e a mistura de matéria-prima de diversos produtores em tanques coletivos aumentaram os riscos de contaminação. Além disso, os resultados mostraram que o grupo psicotrófico inclui uma diversidade de gêneros bacterianos, com predominância do gênero *Pseudomonas*, e que em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração.

As proteases e lipases não são inativadas durante a pasteurização e/ou esterilização (tratamento UHT) e a atividade residual dessas enzimas pode diminuir a qualidade sensorial e a vida de prateleira de produtos derivados do leite (GRIFFITHS; PHILIPS; MUIR, 1981; FAIRBAIRN; LAW, 1986).

Melo Junior (2005) realizou um estudo sobre a influência da contagem de microrganismos psicotróficos na gelificação e sedimentação do leite UHT. O autor

constatou que a alta contagem de psicotróficos no leite cru influenciou na diminuição do teor de proteínas com conseqüente aumento na sedimentação. Além disso, foi verificado aumento na viscosidade do leite UHT ao longo de sua vida de prateleira, revelando uma tendência à gelificação.

A contaminação por microrganismos psicotróficos interfere no rendimento de fabricação de produtos derivados do leite gerando perdas econômicas consideráveis. Em um trabalho realizado por Cardoso (2006), verificou-se que o crescimento de bactérias psicotróficas no leite cru durante a estocagem a 10°C reduziu o rendimento do queijo Minas frescal em 6,78% e as perdas financeiras decorrentes dessa redução foram estimadas em US\$ 15.480,00 por mês para um laticínio que processa 50.000 litros de leite por dia.

Apesar da importância dos psicotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de identidade e qualidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. Entretanto, de acordo com Pinto, Martins e Vanetti (2006) é imprudente a 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 degradativas extracelulares.

2.3.2 Produção de lipases e proteases por psicotróficos

Durante o armazenamento refrigerado do leite, bactérias psicotróficas como *Pseudomonas* se desenvolvem e produzem enzimas extracelulares termorresistentes como lipases e proteases que afetam a qualidade do leite e derivados (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Enzimas proteolíticas de microrganismos podem estar localizadas dentro da célula (intracelular), associada à parede celular, ou ser excretada ao meio (extracelular) (KOHLMAN *et al.*, 1991).

Muitas espécies de *Pseudomonas* durante o crescimento em leite a 4°C podem produzir proteases suficientes para hidrolisar toda a caseína disponível em peptídeos solúveis (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). As proteases de origem psicotrófica apresentam capacidade de coagular a proteína do leite e possuem atividade hidrolítica em várias frações da caseína, apresentando, no entanto, baixa

atividade degradativa sobre as proteínas do soro. A fração protéica representada pela caseína é facilmente degradada devido à sua estrutura não helicoidal (SANTOS; FONSECA, 2001).

As proteases atacam principalmente a β -caseína e a κ -caseína, resultando no aparecimento de sabores amargos e no aumento da viscosidade do leite. É difícil determinar o tempo de armazenamento do produto para que se verifiquem essas alterações, mas algumas experiências realizadas a respeito indicam que concentrações de bactérias psicrotróficas de cerca de 10^6 UFC/mL no leite cru elaboram quantidade de proteases capazes de dar margem ao aparecimento, no leite UHT, das alterações mencionadas, em períodos inferiores a 20 semanas (ORDÓÑEZ, 2005). Além disso, a degradação da caseína pelas proteases implica em perdas no rendimento de queijos e produtos correlatos.

As lipases de psicrotróficos, assim como as proteases, são produzidas principalmente ao final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento (FRANK, 1997).

O substrato das lipases é constituído por triglicerídeos do leite, que são o componente majoritário da gordura (em torno de 98% dela), cuja ligação éster é rompida com a conseqüente liberação de ácidos graxos. Quando há taxa excessiva de ácidos graxos de baixo peso molecular, como o ácido butírico, aparecem os sinais típicos da rancificação hidrolítica. Também é difícil estabelecer a taxa de bactérias psicrotróficas do leite cru e o tempo necessário para que apareçam os sinais de rancificação no leite UHT ou em outros produtos lácteos. Afirmou-se que quando o leite cru apresenta uma carga de bactérias psicrotróficas não excessivamente alta (em torno de 10^5 UFC/mL), no leite UHT começa-se a perceber leve sabor de ranço entre 32 e 88 dias de armazenamento em temperatura ambiente (ORDÓÑEZ, 2005).

Algumas lipases de importância no leite são as lecitinases ou outras fosfolipases que são capazes de romper a integridade da membrana do glóbulo de gordura e expor a gordura à degradação por lipases naturalmente presentes no leite, resultando em degradação física da emulsão no leite (CRAVEN; MAC CAULEY, 1992; SHAH, 1994).

2.4 ACIDIFICAÇÃO DO LEITE COM DIÓXIDO DE CARBONO

O leite possui pequena quantidade de dióxido de carbono dissolvido. Entretanto, durante as etapas de ordenha, armazenamento e transporte a quantidade de dióxido de carbono dissolvido diminui drasticamente devido à exposição do leite ao ar. Como consequência desta exposição observa-se também a elevação nos níveis de oxigênio e nitrogênio dissolvidos no leite. O dióxido de carbono dissolvido pode ser encontrado na forma ácida (ácido carbônico) ou como carbonato (mono ou bicarbonato), contribuindo desta forma para a diminuição do pH do leite (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006).

A técnica de carbonatação consiste em injeção de dióxido de carbono sob pressão controlada para acidificar o leite. O leite retorna ao valor do seu pH inicial através da degaseificação a vácuo (RAOUCHE *et al.*, 2008).

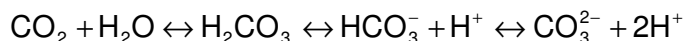
2.4.1 Influência da acidificação sobre a microbiota do leite

O controle do crescimento microbiano através da acidificação do leite com dióxido de carbono pode melhorar a qualidade e segurança dos produtos lácteos. O aumento do tempo de armazenamento do leite cru e do leite pasteurizado traz benefícios econômicos para a indústria leiteira em virtude do aumento da flexibilidade na utilização e distribuição do leite.

Pesquisas apontam que o dióxido de carbono age prolongando a fase lag e diminuindo a taxa de crescimento de microrganismos, sendo que o efeito inibitório é mais pronunciado em bactérias Gram negativas (MARTIN, WERNER; HOTCHKISS, 2003). Em leite tratado com dióxido de carbono, a extensão da fase lag aumentou o tempo de geração de espécies de *Pseudomonas* (ROBERTS; TORREY, 1988; AMIGO; OLANO; CALVO, 1995). Estudos indicam que o mecanismo de inibição microbiano está diretamente associado com o dióxido de carbono e não com o efeito da redução do pH ou substituição do oxigênio. Alguns efeitos diretos exercidos pelo dióxido de carbono inclui a sua habilidade de mudar a propriedade da membrana

microbiana, diminuir o pH intracelular e interferir nas reações enzimáticas (MA; BARBANO; SANTOS, 2003).

O dióxido de carbono deve-se primeiro dissolver na fase aquosa do leite para apresentar efeito inibitório sobre os microrganismos. Quando o gás dissolve-se, uma série de reações de hidratação ocorre. Em meio aquoso o CO₂ está em equilíbrio com a sua forma ionizada HCO₃⁻ de acordo com a seguinte equação:



Como conseqüência da reação, forma-se ácido carbônico o qual pode se dissociar para a forma de bicarbonato ou íons H⁺ (LOSS; HOTCHKISS, 2000). O grau de redução do pH está relacionado com a quantidade de CO₂ dissolvido, hidratado e protonado e também depende das propriedades intrínsecas da fase aquosa como a capacidade tamponante e o pH inicial (MA; BARBANO, 2003).

As moléculas de dióxido de carbono são apolares e mais solúveis em lipídeos do que em água. Quando o CO₂ entra em contato com a membrana celular, irá preferir se dissolver na bicamada lipídica. Feito isso, o CO₂ causará um aumento na fluidez da membrana (SEARS; EISENBERG, 1961¹ *apud* LOSS; HOTCHKISS, 2000) e irá expor o citoplasma da célula a um ambiente tóxico. Dependendo da concentração e da pressão, algumas moléculas de CO₂ irão se solubilizar no citoplasma, que é um ambiente aquoso com pH neutro. Nestas condições haverá uma redução no pH do citoplasma e uma mudança no gradiente de pH o que causará estresse nas células bacterianas (LOSS; HOTCHKISS, 2000).

O crescimento bacteriano foi reduzido em 50% após a adição de CO₂ em leite cru armazenado a 6,7°C por 48 horas (SHIPE *et al.*, 1978² *apud* RAJAGOPAL; WERNER; HOTCHKISS, 2005). King e Mabbit (1982) adicionaram 30 mM/L de dióxido de carbono no leite cru e notaram um aumento no tempo de conservação do leite, com contagem inicial de 10³ UFC/mL, em 3 dias. Até mesmo o leite com uma contagem inicial maior (10⁵ UFC/mL) apresentou um aumento de 1,3 dias na sua vida de prateleira. Com isso, pode-se afirmar que a qualidade do leite foi maximizada quando a contagem bacteriana inicial foi baixa.

¹ SEARS, D. F.; EISENBERG, R. M. A model representing a physiological role of CO₂ at the cell membrane. **Journal of General Physiology**, v. 44, n.5, p. 869-887, 1961.

² SHIPE, W. F. *et al.* Off-flavors of milk: Nomenclature standards and bibliography. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 855-869, 1978.

Roberts e Torrey (1988) adicionaram de 20 a 30 mM/L de dióxido de carbono em leite cru e verificaram que o tempo requerido para a contagem total de aeróbios aumentar em uma escala logarítmica foi 24 horas maior do que o leite não tratado. Os autores observaram que ao armazenar o leite por um período de 6 dias a 7°C, a contagem de coliformes, psicrotróficos e anaeróbios (facultativos e obrigatórios) foram significativamente mais baixos no leite cru tratado com dióxido de carbono do que o não tratado.

Espie e Madden (1997) constataram que a contagem de *Pseudomonas* foi 3 ciclos logaritmos menor no leite contendo 30 mM/L de CO₂ e armazenado a 4°C por 4 dias quando comparado com o controle.

Alguns pesquisadores não mediram diretamente a concentração de CO₂, mas observaram o efeito da redução do pH devido à adição deste gás sobre o desenvolvimento de psicrotróficos. Ao reduzir o pH de 6,8 para 6,0 a inibição do crescimento de psicrotróficos obtida após 4 dias de armazenamento a 7 °C foi de 1,41 log₁₀ UFC/mL (SIERRA *et al.*, 1996). A mesma redução de pH diminuiu a contagem de psicrotróficos lipolíticos em 1 log₁₀ UFC/mL após 4 dias a 4 °C (RUAS - MADIEDO *et al.*, 1996).

Ma, Barbano e Santos. (2003), acidificaram o leite cru a 4°C até pH 6,2 através da adição de 1500 ppm de dióxido de carbono e ácido clorídrico. No leite acidificado com dióxido de carbono foi verificado diminuição no crescimento de psicrotróficos, na proteólise e lipólise, em contrapartida a acidificação com HCl não teve o mesmo impacto. Os autores concluíram que o efeito sobre as bactérias foi principalmente devido ao dióxido de carbono e não pela redução do pH ou substituição do oxigênio presente no leite.

Rowe (1988) estudou o efeito do CO₂ sobre enzimas extracelulares produzidas por *Pseudomonas fluorescens*. A dissolução de 30 mM/L de CO₂ reduziu em 50% a produção de proteases e a produção de lipases foi 85% maior no leite não tratado com CO₂ após 5 dias de armazenamento a 7°C. Estudos de Habulin e Knez (2001) demonstraram que o dióxido de carbono supercrítico (100 bar) também pode diminuir significativamente a atividade de lipases produzidas por *Pseudomonas fluorescens*.

Martin, Werner e Hotchkiss (2003) observaram que o CO₂ dissolvido reduziu o crescimento 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 microrganismo para microrganismo.

Estudos com o intuito de verificar o efeito da acidificação com CO₂ no crescimento de Coliformes em leite cru também foram realizados. Ruas - Madiedo *et al.* (1996) constataram que após 4 dias de armazenamento a 4°C o leite acidificado até pH 6,0 teve contagem de 2,5 log₁₀ UFC/mL e o leite não acidificado teve 3,5 log₁₀ UFC/mL. Roberts e Torrey (1988) também obtiveram uma redução de 1 – 1,5 log₁₀ UFC/mL no crescimento de coliformes.

2.4.2 Influência da acidificação sobre os componentes do leite

Para maximizar o benefício da tecnologia de carbonatação é necessário entender as conseqüências da adição de dióxido de carbono sobre o leite. Além das pesquisas sobre o uso de dióxido de carbono para controlar o crescimento de microrganismos, trabalhos sobre a influência desta tecnologia nos parâmetros bioquímicos, físico-químicos e nos métodos analíticos do leite também estão sendo realizados.

Ma *et al.* (2001) estudaram o efeito do dióxido de carbono dissolvido em leite sobre o desempenho de alguns métodos analíticos como o teste de resíduo de antibiótico, ponto crioscópico, análise de componentes (proteína, lactose e gordura) por infravermelho e teste de fosfatase alcalina. Foi observado que a adição de 1000 ppm de dióxido de carbono ao leite não afetou o desempenho dos métodos de análise de antibiótico. A injeção de dióxido de carbono diminuiu o pH e o ponto crioscópico do leite, mas esse decréscimo foi reversível após a remoção do dióxido de carbono dissolvido. Em relação ao teste de fosfatase alcalina, a adição de dióxido de carbono não afetou a sensibilidade do teste e não interferiu no momento de diferenciar o leite pasteurizado do não pasteurizado.

Ruas Madiedo *et al.* (1998), estudaram o efeito da adição de dióxido de carbono sobre as vitaminas lipossolúveis do leite e constataram que o emprego do mesmo inibiu o crescimento microbiano sem afetar a estabilidade das vitaminas.

Gevaudan *et al.* (1996), pesquisaram os efeitos do tratamento do leite por injeção de dióxido de carbono e posterior despressurização sobre os minerais e

poder tamponante do leite. Foi notado que pH do leite decresceu com a gaseificação e retornou ao valor inicial após degaseificação. Não foram verificadas mudanças nos teores de fósforo inorgânico, cálcio ou magnésio na fase aquosa, porém as propriedades tamponantes do leite mostraram alterações. De acordo com os autores, a mudança na capacidade tamponante do leite foi causada pelo fosfato de cálcio coloidal, o qual foi alterado para outra forma de sal durante a acidificação.

A acidificação reversível por dióxido de carbono até pH 5,5 não causa mudanças permanentes nos minerais da micela, na composição, potencial zeta e no tamanho médio da proteína. No entanto, o tratamento com dióxido de carbono modifica a capacidade tamponante do leite e de hidratação da micela e melhora a propriedade de coagulação (GUILHAUME *et al.*, 2004; RAOUCHE *et al.*, 2007). Resultados sugerem que a forma dos sais de fosfato de cálcio micelar muda e a superfície se reorganiza durante o processo, afetando a estabilidade coloidal da micela da caseína. Dependendo do pH de acidificação essas mudanças são de diferentes magnitudes e mais ou menos reversíveis (RAOUCHE *et al.*, 2007).

O tratamento com CO₂ permite o armazenamento refrigerado do leite cru por períodos maiores. No entanto, pode ocorrer uma redução na qualidade sensorial caso o leite não seja degaseificado antes do processamento térmico (AMIGO; OLANO; CALVO, 1995).

De acordo com Rajagopal, Werner e Hotchkiss (2005) o tratamento do leite cru a baixa pressão com dióxido de carbono reduz a taxa de crescimento bacteriano sem causar a precipitação da proteína. A combinação desta técnica com a refrigeração pode melhorar a qualidade microbiológica e segurança do leite cru e pode ser uma estratégia efetiva para o transporte deste produto para longas distâncias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Programa de Pós - graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, localizada na cidade de Curitiba – PR.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Leite

O leite cru empregado neste experimento foi coletado de dois produtores da região metropolitana de Curitiba – PR.

No primeiro produtor, denominado neste trabalho como Produtor A, o leite foi obtido por meio de ordenha mecânica, por pessoas treinadas que seguem um procedimento de higiene. Nessa propriedade o leite ordenhado é imediatamente resfriado em tanque de expansão provido de sistema de agitação e controle de temperatura.

Para o segundo produtor, denominado como Produtor B, o leite foi ordenhado de forma manual. Como a produção diária é pequena, o leite é armazenado em geladeira de uso doméstico.

Para os dois produtores, seguiu-se o mesmo procedimento de coleta onde logo após a ordenha, o leite foi coletado em recipiente estéril, o qual foi imerso em gelo e imediatamente transportado para o laboratório.

3.1.2 Dióxido de carbono

O dióxido de carbono utilizado para a acidificação do leite foi adquirido da White Martins, acondicionado na sua forma liquefeita em cilindro de aço, tipo T, com

capacidade para 33 m³ e pressão de vapor de 58,3 kgf/cm². O grau analítico de pureza deste gás foi de 99,995% na fase líquida.

3.2 MÉTODOS

O fluxograma geral do experimento está apresentado na Figura 1, onde para cada produtor seguiu-se os mesmos procedimentos.

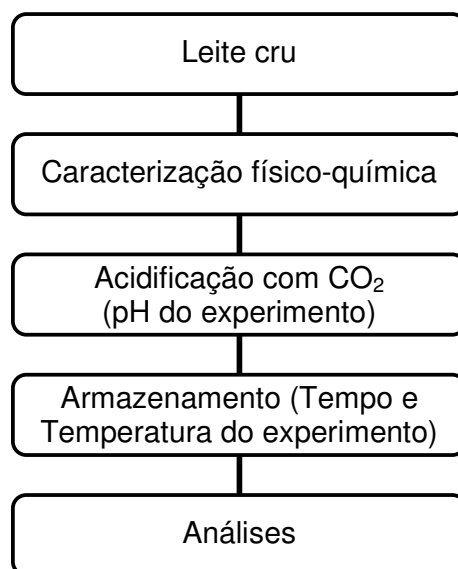


FIGURA 1- FLUXOGRAMA GERAL DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

No momento da recepção do leite foi feita a sua caracterização físico-química. Em seguida realizou-se a acidificação do leite com dióxido de carbono sendo que este processo será detalhado no item 3.2.1.

O leite acidificado foi envasado em garrafas de vidro esterilizadas e armazenados sob condições de tempo e temperatura especificadas na Tabela 4 do delineamento experimental.

Decorrido o tempo de armazenamento foram realizadas as análises microbiológicas, viscosidade e turbidez. Amostras sem acidificação com CO₂ (controle) também foram armazenadas nas condições empregadas neste trabalho (tempo e temperatura do experimento) para avaliar a ação inibitória do dióxido de

carbono frente aos microrganismos pesquisados e verificar a influência na viscosidade e turbidez do leite cru.

O efeito de inibição foi calculado mediante diferença entre a contagem microbiana da amostra controle e a contagem microbiológica do leite acidificado para cada combinação de tempo e temperatura.

3.2.1 Acidificação do leite com dióxido de carbono

Para a realização dos ensaios de acidificação do leite, utilizou-se o sistema de carbonatação empregado no trabalho de Hamerski (2009).

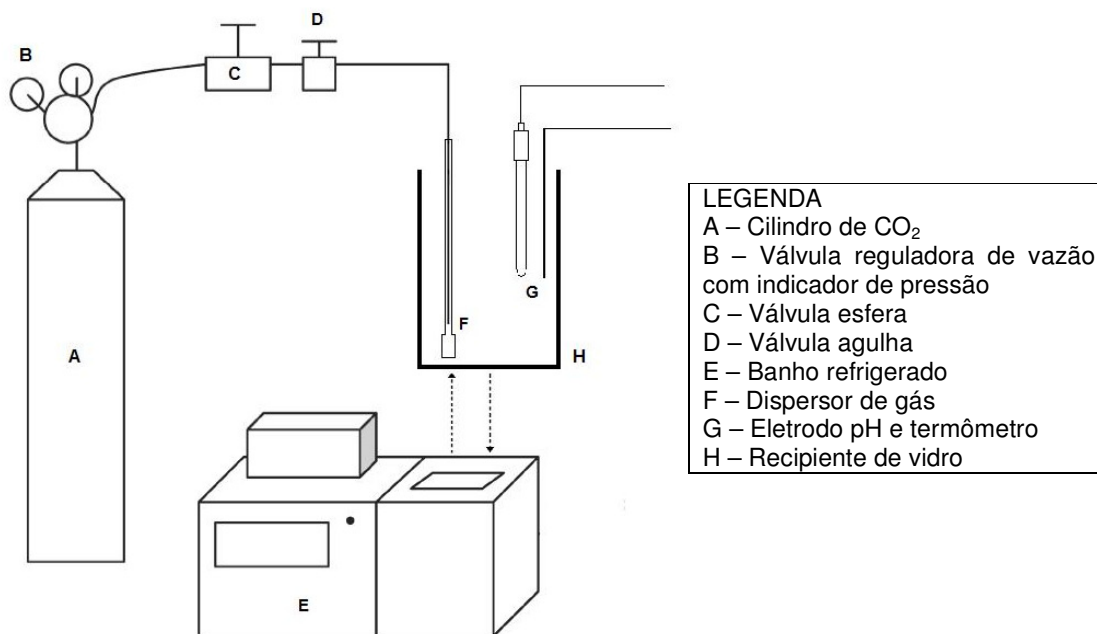


FIGURA 2– SISTEMA PARA ACIDIFICAÇÃO DO LEITE CRU COM DIÓXIDO DE CARBONO

FONTE: Adaptado de HAMERSKI (2009).

De acordo com a Figura 2, o sistema consistiu em uma válvula reguladora de vazão com indicador de pressão (Figura 2, B), uma válvula esfera (Figura 2, C) que permitiu o bloqueio ou alimentação do gás no recipiente e uma válvula de agulha (Figura 2, D) que realizou o ajuste fino da vazão de gás.

O leite foi borbulhado em recipiente de vidro com capacidade de 1.000 mL e este foi imerso em um banho termostático (Tecnal, modelo TE 184). A temperatura de operação para todos os ensaios foi fixada em 5°C. Durante o processo, o pH foi controlado pelo eletrodo de vidro específico para amostras com proteína, conectado ao pHmetro portátil digital (Metrohm, modelo 826) e a temperatura por um termômetro digital. Ao final da linha de gás estava conectado um dispersor de gás (Figura 2, F) feito de vidro *Pyrex* provido de placa porosa na extremidade inferior. A porosidade média foi de 35 µm e a utilização deste permitiu a diminuição no tamanho das bolhas de gás, o que aumentou o contato com o leite.

O borbulhamento com CO₂ foi realizado a pressão ambiente e em sistema aberto até o momento em que o leite atingiu o pH em estudo.

3.2.2 Delineamento experimental

O planejamento fatorial é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores). Ele permite uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim uma análise de uma variável, sujeita a todas as combinações das demais (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

O delineamento experimental deste trabalho consistiu no emprego de um planejamento fatorial 2³, com repetição em triplicata no ponto central.

Para tornar possível a execução, ao menos aproximada, da inferência estatística, é usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental. Com tal procedimento viabiliza-se o cálculo dos resíduos e, conseqüentemente, do erro padrão e então das estimativas por intervalo. Ensaios no ponto central podem fornecer informações úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Os fatores avaliados foram pH de acidificação, tempo e temperatura de armazenamento do leite acidificado em dois níveis de variação. Vale salientar que os níveis estudados neste trabalho foram estabelecidos por meio de testes preliminares, os quais não serão apresentados neste momento. O nível inferior foi indicado como -1, o nível superior como +1 e o ponto central intermediário como 0.

Na Tabela 4 estão apresentadas as variáveis (fatores) exploradas neste trabalho com seus respectivos níveis.

TABELA 4 – ESPECIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS E DA REGIÃO EXPERIMENTAL

| Variável | Nível | | |
|------------------|-------|-----|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| pH | 5,8 | 6,1 | 6,4 |
| Tempo (dias) | 0 | 5 | 10 |
| Temperatura (°C) | 5 | 7,5 | 10 |

A Tabela 5 representa a matriz do planejamento fatorial completo, com repetição no ponto central em triplicata. No total foram realizados 11 ensaios para cada produtor de leite.

TABELA 5 – DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 COMPLETO, COM REPETIÇÃO EM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL

| Ensaio | pH | Tempo (dias) | Temperatura (°C) |
|---------|-----|--------------|------------------|
| 1 | 5,8 | 0 | 5 |
| 2 | 6,4 | 0 | 5 |
| 3 | 5,8 | 10 | 5 |
| 4 | 6,4 | 10 | 5 |
| 5 | 5,8 | 0 | 10 |
| 6 | 6,4 | 0 | 10 |
| 7 | 5,8 | 10 | 10 |
| 8 | 6,4 | 10 | 10 |
| 9 (PC) | 6,1 | 5 | 7,5 |
| 10 (PC) | 6,1 | 5 | 7,5 |
| 11 (PC) | 6,1 | 5 | 7,5 |

NOTA: PC = ponto central.

Os ensaios foram conduzidos de modo completamente aleatório para impedir que erros atípicos fossem associados a determinadas combinações de níveis.

3.2.3 Análises Físico-Químicas

3.2.3.1 pH

O pH foi medido em pHmetro portátil, digital provido de eletrodo específico para amostras com proteína (Metrohm, modelo 826). O pHmetro foi previamente calibrado em tampões pH 4,0 e 7,0.

3.2.3.2 Acidez titulável

Determinado através da titulação da amostra com solução Dornic (hidróxido de sódio N/9), na presença de indicador fenolftaleína. Cada 0,1 mL da solução de hidróxido de sódio N/9 equivale a 1 °D (IAL 427/IV, 2008).

3.2.3.3 Gordura

Determinado através da utilização do butirômetro de Gerber. A análise baseou-se na quebra da emulsão do leite por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico (densidade 1,820 g/ml) e álcool isoamílico (densidade 0,815 g/ml) e posterior centrifugação. A leitura da quantidade de gordura foi realizada de forma direta na escala do butirômetro (IAL 433/IV, 2008).

3.2.3.4 Frações nitrogenadas

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl. A proteína total foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator de conversão 6,38 (IAL 037/IV, 2008).

3.2.3.5 Densidade

Medida através da utilização do termolactodensímetro com a amostra a 15°C (IAL 423/IV, 2008).

3.2.3.6 Extrato seco total

Foi determinado por método indireto com o emprego do Disco de Ackermann (IAL 430/IV, 2008).

3.2.3.7 Extrato seco desengordurado

Obtido teoricamente por diferença entre os valores de extrato seco total e gordura previamente determinados (IAL 431/IV, 2008).

3.2.3.8 Cinzas

Determinado por incineração em mufla a 550°C durante 3 horas (BRASIL, 2006). As cinzas do leite são constituídas principalmente por óxidos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo e por cloretos (IAL, 2008).

3.2.3.9 Lactose

Foi calculada por diferença através da equação empregada por Sanvido (2007):

$$\text{Lactose (\%)} = \% \text{ Extrato Seco Total} - (\% \text{ Gordura} + \% \text{ Proteína total} + \% \text{ Cinzas})$$

3.2.3.10 Viscosidade

A viscosidade foi medida com o auxílio do viscosímetro capilar, modelo Schott CT 52, com capilar Canon Fensk tipo 513 01. Os valores da viscosidade foram expressos em cP (centipoise).

3.2.3.11 Turbidez

A turbidez foi medida em turbidímetro de bancada, marca Del Lab, modelo DLM-2000 B. O resultado foi expresso em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

3.2.4 Análises Microbiológicas

Antes das análises o leite foi homogeneizado na própria embalagem e estas foram desinfetadas externamente com álcool etílico a 70%. Em seguida foram realizadas diluições seriais em água peptonada 0,1% estéril.

3.2.4.1 Contagem total de mesófilos

Foi realizado pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando-se ágar padrão – PCA (Difco), com incubação a 35 °C por 48 horas (SILVA *et al.*, 2007). Os resultados da contagem foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

3.2.4.2 Contagem total de psicrotróficos

Foi feito pelo método de plaqueamento em superfície em ágar padrão - PCA (Difco), e incubação a 7 °C por 10 dias (SILVA *et al.*, 2007). Os resultados da contagem foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

3.2.4.3 Contagem de psicrotróficos proteolíticos

Foi determinado em ágar padrão – PCA (Difco) suplementado com 10% de leite em pó desnatado, por meio do método de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias (FRANK *et al.*, 1992). As colônias características de bactérias proteolíticas apresentam halos de clarificação, resultante da hidrólise da caseína e foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

3.2.4.4 Contagem de psicrotróficos lipolíticos

Utilizou-se o ágar base para ágar tributirina (Himedia) adicionado de tributirina (Sigma) com incubação a 7 °C por 10 dias (FRANK *et al.*, 1992). As colônias características de bactérias lipolíticas apresentam halos transparentes em virtude da hidrólise da tributirina e foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

3.2.4.5 Contagem de Coliformes totais

Foi determinado através da utilização de *Petriefilm* (3M) com incubação a 32°C durante 24 horas (SILVA *et al.*,2007).

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Os resultados das variáveis dependentes também foram tratados por análise de regressão múltipla da metodologia de superfície de resposta. A ANOVA foi aplicada para testar a adequação dos modelos lineares e a significância da regressão foi observada pelo coeficiente de determinação e quanto à falta de ajuste ao nível de 5% de significância. Além disso, para se visualizar o efeito das variáveis independentes nas respostas avaliadas foram construídos gráficos de superfície de resposta.

A análise estatística foi feita com o auxílio do programa computacional *STATISTICA 7.0* (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU

Os resultados referentes à caracterização físico-química do leite cru dos dois produtores encontram-se na TABELA 6. Nesta mesma tabela encontra-se os requisitos físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa n°51 de 2002 do MAPA.

TABELA 6 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU

| Características | Produtor A | Produtor B | IN 51/2002 |
|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|
| pH | 6,95 ± 0,01 ^a | 6,78 ± 0,02 ^b | * |
| Acidez (°Dornic) | 14,7 ± 1,1 ^b | 17,3 ± 0,6 ^a | 14 a 18 |
| Proteínas (%) | 3,09 ± 0,14 ^b | 4,64 ± 0,03 ^a | Mín. 2,9 |
| Gordura (%) | 3,67 ± 0,06 ^a | 2,77 ± 0,06 ^b | Mín. 3,0 |
| Lactose (%) | 4,78 ± 0,13 ^a | 4,03 ± 0,04 ^b | * |
| Extrato seco total (%) | 12,16 ± 0,07 ^b | 12,33 ± 0,07 ^a | * |
| Extrato seco desengodurado (%) | 8,49 ± 0,01 ^b | 9,56 ± 0,01 ^a | Mín. 8,4 |
| Cinzas (%) | 0,62 ± 0,008 ^b | 0,88 ± 0,01 ^a | * |
| Densidade (g/mL) | 1,030 ^a | 1,033 ^a | 1.028 – 1,034 |
| Viscosidade (cP) | 1,636 ± 0,01 ^b | 1,695 ± 0,004 ^a | * |
| Turbidez (NTU) | 3577 ± 11 ^a | 2663 ± 6 ^b | * |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. * requisitos físico-químicos não estabelecidos pela legislação.

Através da análise de variância (ANOVA) verificou-se que as características físico-químicas do leite cru apresentaram diferença significativa entre os produtores, com exceção da densidade. Esse fato era previsto, pois cada produtor possui uma composição genética de rebanho, com alimentação e sistema de confinamento diferentes.

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a qualidade do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de parições, a dieta oferecida à vaca e o estado de saúde do animal. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto

após a sua produção, como por exemplo, o manejo e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento (SANVIDO, 2007).

De acordo com a IN n° 51 de 2002 do MAPA, os valores de acidez titulável do leite cru devem se encontrar entre 14 a 18 °D. Os dois produtores apresentaram valores estatisticamente diferentes, mas estes se encontram dentro da faixa estabelecida pela legislação. Acidez titulável dentro do estabelecido pode ser um indicativo de que o leite possui baixa contagem de microrganismos mesófilos e de que foi armazenado sob refrigeração adequada. Estes microrganismos metabolizam a lactose produzindo ácido láctico que é detectado nesta análise. Lorenzetti (2006) encontrou valores médios de 14,35°D e 14,61 °D em leites das regiões de Curitiba e Alto Vale de Santa Catarina respectivamente. Hartmann (2009) relatou uma acidez média de 15,57°D para amostras de leite da Bacia leiteira do Oeste do Paraná.

O teor de gordura do Produtor B foi de 2,77% e encontrou-se abaixo do limite estabelecido pela legislação, que exige teor mínimo de 3,0 g/100 g. A matéria gorda do leite é influenciada principalmente pelas estações do ano, dieta alimentar dos rebanhos, composição racial, volume de produção, ordem de lactação e período de lactação (HARTMANN, 2009).

Os valores de densidade dos dois produtores não apresentaram diferença significativa, sendo de 1,030 g/mL para A e 1,033 g/mL para B, e se encontraram dentro da faixa estabelecida pela legislação (1,028 a 1,034 g/mL). O teste da densidade pode ser útil na detecção de adulteração do leite, uma vez que a adição de água causa diminuição da densidade, enquanto a retirada de gordura resulta em aumento da densidade (SANTOS; FONSECA, 2002). Assim, pode-se afirmar que os leites utilizados neste trabalho não sofreram adulteração.

A viscosidade do leite do produtor B foi estatisticamente diferente sendo de 1,695 cP e para o produtor A o valor obtido foi 1,636 cP. O leite é mais viscoso que a água devido à presença de glóbulos de gordura e micelas de caseína. A viscosidade normal do leite integral e do leite desnatado é de aproximadamente 1,632 e 1,404 cP, respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2001). Neste trabalho considerou-se que o maior valor de viscosidade em B se deve ao maior valor de extrato seco total.

Os requisitos proteínas e extrato seco desengordurado dos dois produtores encontraram-se de acordo com o estabelecido pelo Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado (BRASIL, 2002) sendo o teor mínimo

de proteína 2,9 g/100 g e teor mínimo de 8,4 g/100 g para extrato seco desengordurado.

Os teores de cinzas obtidos foram de 0,62% para o produtor A e 0,88% para o produtor B e encontraram-se em acordo com o descrito por Tronco (2008) e Walstra e Jennes (1984).

Valores elevados de turbidez foram encontrados para os leites analisados, sendo de 3577 NTU para o produtor A e 2663 para o produtor B. Em dispersões coloidais, como o leite, a turbidez é causada pela dispersão de partículas. Mudanças nos valores de turbidez ocorrem devido à agregação das micelas de caseína (KRUIF, 1993).

4.2 CONTAGEM DE MESÓFILOS

Na TABELA 7 estão apresentadas as contagem de mesófilos para cada ensaio e produtor. Para cada combinação de tempo e temperatura de armazenamento há uma amostra controle que não foi acidificada com CO₂. Nesta tabela encontra-se também o cálculo da diferença na contagem entre as amostras acidificadas e o controle.

A contagem inicial de mesófilos foi de 3,85 log₁₀ UFC/mL e 6,89 log₁₀ UFC/mL respectivamente para os produtores A e B. A contagem de mesófilos do produtor B foi maior que o estipulado pela IN 51 de 2002 do MAPA, que estabelece uma contagem máxima de 7,5 x 10⁵ UFC/mL ou 5,88 log₁₀ UFC/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. A alta contagem em B elevou a acidez titulável, como já constatado na TABELA 6. Valores parecidos com os encontrado neste trabalho foram relatados por Hartmann (2009) que encontrou contagem média de 6,33 log₁₀ UFC/mL em leites da região oeste do Paraná. Sanvido (2007) obteve 3,87 log₁₀ UFC/mL, valor este próximo ao obtido para o produtor A.

Embora o objetivo deste trabalho não seja contemplar aspectos relacionados aos sistemas de produção empregados nas propriedades rurais, pode-se afirmar com base na literatura (ARCURI *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2006; NERO *et al.*, 2005) que a contaminação elevada de mesófilos em leite cru pode estar associada com equipamentos de ordenha mal sanitizados, falhas nos procedimentos de ordenha,

higiene ambiental inadequada, falta de refrigeração imediata após a ordenha, entre outros fatores. Além disso, Austin e Bergeron (1995) associam o inadequado processo de limpeza do sistema de ordenha com a formação de biofilme protéico na superfície que entra em contato com o leite no interior do equipamento de ordenha. Este filme serve como fonte de contaminação de todo o leite que entra em contato com ele, elevando a contagem bacteriana do leite já a caminho do tanque de estocagem.

TABELA 7 – CONTAGEM DE MESÓFILOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE

| Ensaio (pH/t/T) | Produtor A (log₁₀UFC/mL) | Diferença A (log₁₀UFC/mL) | Produtor B (log₁₀UFC/mL) | Diferença B (log₁₀UFC/mL) |
|----------------------------|--|---|--|---|
| Controle (0/5) | 3,85 ± 0,004 ^e | | 6,89 ± 0,02 ^h | |
| 1 (5,8/0/5) | 3,56 ± 0,33 ^e | 0,30 | 6,36 ± 0,02 ⁱ | 0,53 |
| 2 (6,4/0/5) | 3,78 ± 0,44 ^e | 0,07 | 6,72 ± 0,03 ^h | 0,17 |
| Controle (10/5) | 7,36 ± 0,02 ^{a,b} | | 9,33 ± 0,02 ^c | |
| 3 (5,8/10/5) | 5,75 ± 0,08 ^d | 1,61 | 8,20 ± 0,08 ^e | 1,13 |
| 4 (6,4/10/5) | 7,29 ± 0,09 ^b | 0,06 | 9,77 ± 0,02 ^a | * |
| Controle (0/10) | 3,85 ± 0,004 ^e | | 6,89 ± 0,02 ^h | |
| 5 (5,8/0/10) | 3,56 ± 0,33 ^e | 0,30 | 6,36 ± 0,02 ⁱ | 0,53 |
| 6 (6,4/0/10) | 3,78 ± 0,04 ^e | 0,07 | 6,72 ± 0,03 ^h | 0,17 |
| Controle (10/10) | 8,01 ± 0,08 ^a | | 9,54 ± 0,04 ^b | |
| 7 (5,8/10/10) | 7,31 ± 0,08 ^b | 0,70 | 8,92 ± 0,08 ^d | 0,62 |
| 8 (6,4/10/10) | 7,54 ± 0,32 ^{a,b} | 0,47 | 9,29 ± 0,01 ^c | 0,25 |
| Controle (5/7,5) | 6,45 ± 0,12 ^c | | 8,19 ± 0,02 ^e | |
| 9 (6,1/5/7,5) | 5,58 ± 0,16 ^d | 0,87 | 7,20 ± 0,04 ^g | 1,00 |
| 10 (6,1/5/7,5) | 5,92 ± 0,10 ^{c,d} | 0,53 | 7,27 ± 0,05 ^{f,g} | 0,92 |
| 11 (6,1/5/7,5) | 6,09 ± 0,06 ^{c,d} | 0,36 | 7,40 ± 0,09 ^f | 0,79 |

NOTAS: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios. * não houve redução na contagem bacteriana.

No tempo 0, a acidificação com CO₂ não influenciou na contagem de mesófilos, ou seja, para o produtor A as contagens dos ensaios 1, 2, 5 e 6 foram estatisticamente iguais ao controle. Já para o produtor B verificou-se que apenas a acidificação em pH 5,8 (ensaios 1 e 5) mostrou diferença significativa entre a amostra controle. Ma, Barbano e Santos (2003) também relataram este fato em seu

trabalho, indicando que o efeito inibitório do CO₂ ocorreu durante a estocagem sob refrigeração e não logo ao ser adicionado ao leite.

Após 10 dias de armazenamento a 5°C verificou-se que o leite acidificado em pH 5,8 (ensaio 3) apresentou contagem de 1,61 logaritmos menor para A e 1,13 para B quando comparado com o controle. Para este caso a combinação da temperatura de 5°C e pH 5,8 foi mais efetiva na inibição do crescimento de mesófilos. Resultados parecidos foram obtidos por Ruas-Madiedo *et al.* (1996), onde o leite tratado com CO₂ reduziu em 1 a 1,5 logaritmos o crescimento de mesófilos. Roberts e Torrey (1988) constataram um aumento na fase lag de mesófilos em leite cru acidificado armazenado a 7°C. Ma, Barbano e Santos (2003) constataram que ao adicionar 1500 ppm de CO₂ ao leite cru, houve uma diminuição de 1 a 2 logaritmos na contagem de mesófilos após 21 dias de armazenamento a 4°C.

A acidificação em pH 6,4 não teve um efeito inibitório significativo sobre as bactérias mesófilas, pois para o produtor A a contagem do ensaio 4 e 8 foram iguais os seus respectivos controle. Para esse caso, foi possível observar também que diferentes temperaturas de armazenamento não influenciaram na contagem, pois os ensaios 4 e 8 foram estatisticamente iguais.

4.2.1 Superfície de resposta para contagem de mesófilos

O método mais usado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a análise de variância (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). A TABELA 8 apresenta a ANOVA para ajuste de modelos lineares de superfície de resposta para a contagem de mesófilos, a estimativa dos efeitos e o coeficiente de determinação (R^2). Foi possível verificar que a variável tempo possuiu efeito significativo ($p < 0,05$) nos dois produtores. Apenas para o produtor B foi notado efeito significativo da variável pH.

A falta de ajuste dos modelos lineares não foi significativa, indicando que para este caso a superfície de resposta pode descrever bem a tendência de resposta. Através do coeficiente de determinação pode-se afirmar que o modelo linear representou aproximadamente 96% da variação total em torno da média tanto para o produtor A como para o B.

TABELA 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE MESÓFILOS

| Fator | Soma dos Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|----------|-----------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 5,4695* |
| pH (1) | 0,6161 | 1 | 0,61611 | 9,1001 | 0,09455 | 0,55502 |
| Tempo (2) | 21,826 | 1 | 21,8262 | 322,38 | 0,00308* | 3,3035* |
| Temperatura (3) | 0,4079 | 1 | 0,40791 | 6,0249 | 0,13352 | 0,4516 |
| 1 x 2 | 0,2150 | 1 | 0,21509 | 3,1769 | 0,21662 | 0,3279 |
| 1 x 3 | 0,2160 | 1 | 0,21607 | 3,1914 | 0,21594 | -0,3286 |
| 2 x 3 | 0,4079 | 1 | 0,40791 | 6,0249 | 0,13352 | 0,4516 |
| 1 x 2 x 3 | 0,2160 | 1 | 0,21607 | 3,1914 | 0,21594 | -0,3286 |
| Falta de ajuste | 0,6330 | 1 | 0,63304 | 9,3502 | 0,09237 | |
| Erro puro | 0,1354 | 2 | 0,06770 | | | |
| Total | 24,673 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,96886$ |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 7,6555* |
| pH (1) | 0.8799 | 1 | 0.87994 | 80.374 | 0.01221* | 0,6633* |
| Tempo (2) | 12.555 | 1 | 12.5556 | 1146.84 | 0.00087* | 2,5055* |
| Temperatura (3) | 0.0075 | 1 | 0.00753 | 0.688 | 0.49413 | 0,0613 |
| 1 x 2 | 0.1852 | 1 | 0.18527 | 16.922 | 0.05432 | 0,3043 |
| 1 x 3 | 0.1796 | 1 | 0.17963 | 16.407 | 0.05588 | -0,2996 |
| 2 x 3 | 0.0075 | 1 | 0.00753 | 0.688 | 0.49413 | 0,0613 |
| 1 x 2 x 3 | 0.1796 | 1 | 0.17963 | 16.407 | 0.05588 | -0,2996 |
| Falta de ajuste | 0.5528 | 1 | 0.55286 | 50.499 | 0.01923 | |
| Erro puro | 0.0219 | 2 | 0.01095 | | | |
| Total | 14.569 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,96055$ |

NOTA: R^2 = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% ($p < 0,05$)

O valor máximo de R^2 é 1, e só ocorrerá se não houver resíduo nenhum e portanto toda a variação em torno da média for explicada pela regressão. Quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 , melhor será o ajuste do modelo às respostas observadas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Neste trabalho não serão apresentados os coeficientes de regressão juntamente com os modelos matemáticos para predição da contagem de mesófilos. Os gráficos de superfície de respostas foram construídos apenas para fins de

verificação da tendência de resposta das variáveis independentes frente às dependentes.

Os gráficos de superfície de resposta mostram os resultados para a contagem de mesófilos, onde os efeitos dos fatores são mostrados duas de cada vez. Em todos os gráficos a variável fixa corresponde ao ponto central do delineamento experimental sendo pH 6,1, tempo de 5 dias e temperatura de 7,5 °C. Como neste trabalho empregou-se o planejamento fatorial comum, os gráficos obtidos tiveram a forma de um plano, visto que o modelo matemático proposto foi linear.

Na FIGURA 3 estão apresentados os gráficos de superfície de resposta da contagem de mesófilos em função do pH e da temperatura para os produtores A e B. Verificou-se que para os dois produtores as menores contagens ocorreram em níveis baixos de pH e temperatura de armazenamento. Isso pode ter ocorrido porque em temperaturas mais baixa a solubilidade do CO₂ é maior e com isso, maiores quantidades de CO₂ continuou disponível para atuar sobre os mesófilos.

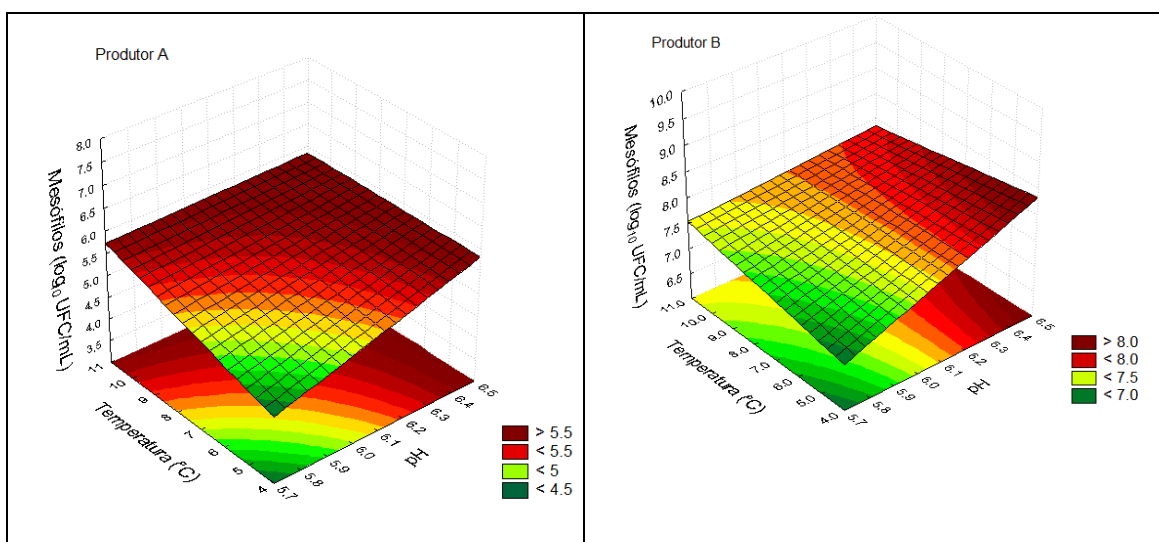


FIGURA 3— GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

Na FIGURA 4 encontram-se os gráficos de superfície de resposta em função do tempo e do pH e pode-se observar que os dois produtores possuem a mesma tendência de resposta. As maiores contagens se encontraram em tempo e pH maiores. Até o quinto dia de armazenamento, tanto para A como para B, não foi

verificada a influência do pH, pois as contagens foram parecidas em toda faixa explorada neste trabalho.

Embora o crescimento bacteriano ocorra no leite cru durante o armazenamento a baixas temperaturas, um único parâmetro não determina a taxa de crescimento. Grandes diferenças na taxa de crescimento ocorrem em qualquer temperatura e isto parece estar largamente relacionada com as diferentes cepas bacterianas presentes em diferentes amostras de leite (HARYANI *et al.*, 2003).

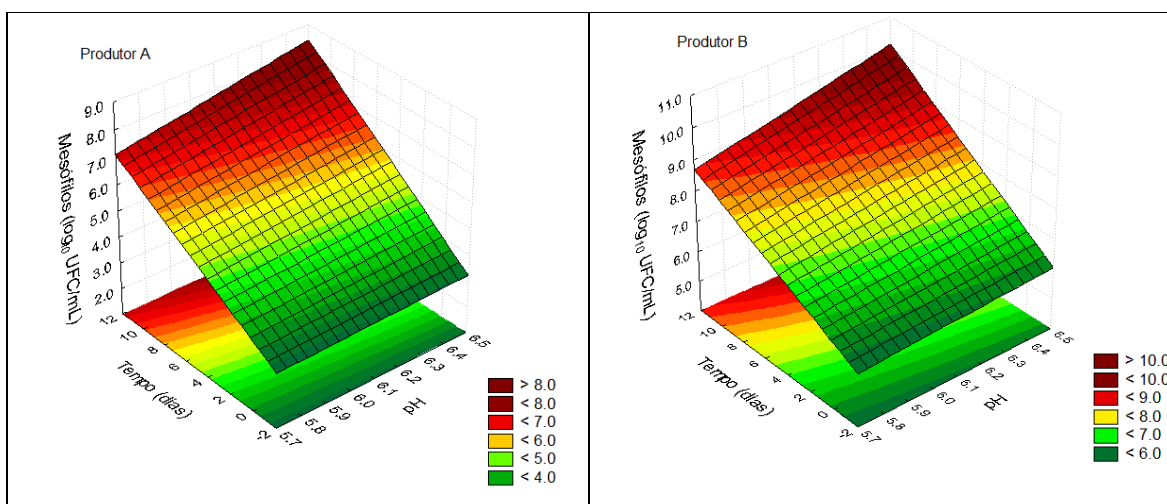


FIGURA 4– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

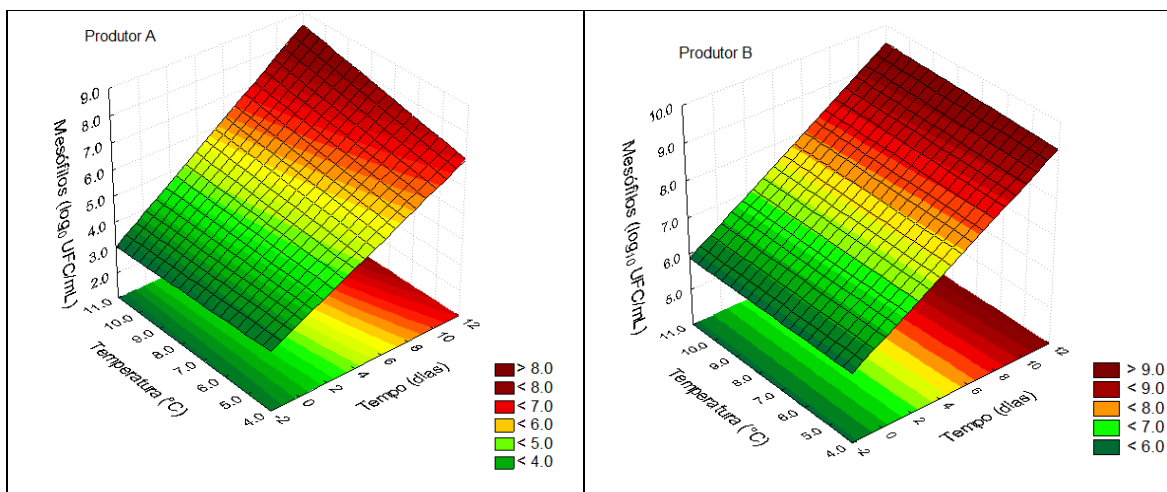


FIGURA 5– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE MESÓFILOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

Os gráficos da contagem de mesófilos em função da temperatura e do tempo de armazenamento do leite acidificado em pH 6,1 encontram-se na FIGURA 5. Para este caso também foi constatado que as respostas dos dois produtores possuíram o mesmo comportamento. Ao avaliar a influência destas duas variáveis juntas, verificou-se que a faixa de temperatura empregada para o armazenamento do leite cru acidificado pareceu ter pouco efeito sobre o crescimento de mesófilos, ou seja, nas diferentes temperaturas empregadas o desenvolvimento microbiano foi parecido. Já o tempo possui influência significativa, pois com o decorrer do tempo houve aumento significativo na contagem destes microrganismos.

4.3 CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS

A contagem inicial de psicotróficos foi de 2,59 \log_{10} UFC/mL para A e 4,43 \log_{10} UFC/mL para B (TABELA 9). Valores superiores foram obtidos por Moura (2008) que encontrou contagens médias de 6,2 \log_{10} UFC/mL em leites coletados de diferentes laticínios do estado de Alagoas. Lorenzetti (2006) encontrou altas contagens de psicotróficos sendo de 8,99 \log_{10} UFC/mL para amostras de leite da região de Curitiba e 6,16 \log_{10} UFC/mL para amostras da região do Alto Vale de Santa Catarina. Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) encontraram valores médios de 6,0 e 6,5 \log_{10} UFC/mL de bactérias psicotróficas em diferentes laticínios do Rio Grande do Sul. Pinto, Martins e Vanetti (2006) encontraram valores de psicotróficos próximos aos obtidos para o produtor B em amostras de leite coletadas de silo industrial da Zona da Mata Mineira. Hartmann (2009) encontrou contagem de 5,92 \log_{10} UFC/mL em amostras de leite da região oeste do Paraná.

A legislação brasileira não estipula um limite para a população de psicotróficos, no entanto de acordo com Pinto, Martins e Vanetti (2006) não é recomendável a fabricação de produtos lácteos a partir do leite cru com contagem de psicotróficos superior a 6,7 \log_{10} UFC/mL. Champagne *et al.* (1994) relataram que normalmente é preciso que o leite tenha uma contagem acima de 6 \log_{10} UFC/mL de microrganismos psicotróficos para que se torne perceptível as mudanças de aroma e sabor do leite. Com base nesses trabalhos, pode-se considerar que os leites utilizados neste trabalho possuíram contagens aceitáveis.

TABELA 9 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE

| Ensaio | Produtor A (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença A (log ₁₀ UFC/mL) | Produtor B (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença B (log ₁₀ UFC/mL) |
|------------------|--|---|--|---|
| Controle (0/5) | 2,59 ± 0,16 ^f | | 4,43 ± 0,09 ^{g,h} | |
| 1 (5,8/0/5) | 2,30 ± 0,43 ^f | 0,29 | 4,41 ± 0,46 ^{g,h} | 0,02 |
| 2 (6,4/0/5) | 2,74 ± 0,06 ^f | * | 4,03 ± 0,11 ^h | 0,39 |
| Controle (10/5) | 6,45 ± 0,08 ^a | | 8,02 ± 0,03 ^a | |
| 3 (5,8/10/5) | 4,45 ± 0,10 ^{d,e} | 2,00 | 5,69 ± 0,30 ^{d,e} | 2,33 |
| 4 (6,4/10/5) | 6,04 ± 0,03 ^{a,b} | 0,41 | 7,63 ± 0,05 ^{a,b} | 0,39 |
| Controle (0/10) | 2,59 ± 0,16 ^f | | 4,43 ± 0,09 ^{g,h} | |
| 5 (5,8/0/10) | 2,30 ± 0,43 ^f | 0,29 | 4,41 ± 0,46 ^{g,h} | 0,02 |
| 6 (6,4/0/10) | 2,74 ± 0,06 ^f | * | 4,03 ± 0,11 ^h | 0,39 |
| Controle (10/10) | 6,68 ± 0,09 ^a | | 8,38 ± 0,05 ^a | |
| 7 (5,8/10/10) | 5,44 ± 0,14 ^{b,c} | 1,23 | 6,44 ± 0,07 ^{c,d} | 1,93 |
| 8 (6,4/10/10) | 5,96 ± 0,02 ^{a,b} | 0,72 | 7,64 ± 0,03 ^{a,b} | 0,74 |
| Controle (5/7,5) | 5,95 ± 0,02 ^{a,b} | | 6,87 ± 0,02 ^{b,c} | |
| 9 (6,1/5/7,5) | 3,92 ± 0,32 ^e | 2,03 | 4,80 ± 0,03 ^{t,h} | 2,07 |
| 10 (6,1/5/7,5) | 4,63 ± 0,05 ^{d,e} | 1,33 | 5,37 ± 0,07 ^{e,f} | 1,50 |
| 11 (6,1/5/7,5) | 4,85 ± 0,21 ^{c,d} | 1,10 | 4,91 ± 0,22 ^{e,f,g} | 1,95 |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios. * não houve redução na contagem bacteriana.

Como já verificado para a contagem de mesófilos, no tempo inicial a contagem de psicotróficos não mostrou diferença significativa entre o controle e as amostras acidificadas (ensaios 1, 2, 5, 6) tanto para o produtor A como para o B. Isso confirma novamente que o CO₂ não possui efeito sobre os microrganismos logo ao ser adicionado ao leite.

A acidificação com pH 5,8 foi mais efetiva na inibição do crescimento de psicotróficos após 10 dias. Isso se afirma porque para o ensaio 3 obteve-se uma redução de 2,00 e 2,33 logaritmos para o produtor A e B respectivamente. Além disso, para o ensaio 7 constatou-se uma redução de 1,23 logaritmos para A e 1,97 logaritmos para B.

A condição experimental do ponto central teve efeito no sentido de retardar o crescimento de psicotróficos. Foi verificado que em relação ao controle os leites

acidificados (ensaios 9, 10 e 11) apresentaram contagem em média 1,6 logaritmos menor.

A utilização do CO₂ em leite cru para inibir o crescimento de psicrotróficos foi objeto de estudo de muitos pesquisadores. Os psicrotróficos presentes no leite cru são sensíveis ao CO₂ (KING; MABBITT, 1982; SIERRA *et al.*, 1996). Após 6 dias de armazenamento a 7°C o leite cru contendo 25 mM/L de CO₂ teve 3,4 log₁₀ UFC/mL menos psicrotróficos quando comparado ao controle (ROBERTS; TORREY, 1998). King e Mabbitt (1982) relataram em seu trabalho que a fase lag de psicrotróficos do leite cru com 30 mM/L de CO₂ armazenado a 4°C foi de 6 dias, já para o leite sem tratamento o tempo foi de apenas 2 dias. Espie e Madden (1997) relataram que a utilização de 30 e 45 mM/L de CO₂ foi efetiva na inibição do crescimento de psicrotróficos, quando o leite foi armazenado a 6°C por 7 dias. Ma, Barbano e Santos (2003) obtiveram uma redução no crescimento de psicrotróficos de 2 ciclos logaritmos em comparação com o leite não acidificado.

O tratamento em pH 6,4 não influenciou significativamente na contagem de psicrotróficos, pois os ensaios 4 e 8 foram estatisticamente iguais às amostras controle, tanto para A como para B.

4.3.1 Superfície de resposta para contagem de psicrotróficos

Os resultados da ANOVA, da estimativa dos efeitos e o do coeficiente de determinação para a contagem de psicrotróficos encontram-se na TABELA 10.

Para o produtor A o fator tempo teve efeito significativo ($p < 0,05$). Para o produtor B além do tempo, verificou-se um efeito de interação significativo entre as variáveis pH e tempo.

O coeficiente de determinação para os dois produtores foram praticamente iguais sendo de 0,95294 para A e de 0,95723 para B. Pode-se afirmar com base na literatura (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007) que esse coeficiente é ótimo e que os modelos lineares representaram bem a contagem de psicrotróficos. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa indicando novamente a adequação do modelo linear proposto.

TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA, ESTIMATIVA DOS EFEITOS E COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS

| Fator | Soma dos Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------|--------|---------|--------------------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 4,1245* |
| pH (1) | 1,1112 | 1 | 1,1112 | 4,7459 | 0,1612 | 0,7454 |
| Tempo (2) | 17,4421 | 1 | 17,4421 | 74,492 | 0,0131* | 2,9531* |
| Temperatura (3) | 0,1029 | 1 | 0,1029 | 0,4395 | 0,5755 | 0,2268 |
| 1 x 2 | 0,1895 | 1 | 0,1895 | 0,8096 | 0,4631 | 0,3078 |
| 1 x 3 | 0,1459 | 1 | 0,1459 | 0,6231 | 0,5126 | -0,27 |
| 2 x 3 | 0,1029 | 1 | 0,1029 | 0,4395 | 0,5755 | 0,2268 |
| 1 x 2 x 3 | 0,1459 | 1 | 0,1459 | 0,6231 | 0,5126 | -0,27 |
| Falta de ajuste | 0,4818 | 1 | 0,4818 | 2,0579 | 0,2878 | |
| Erro puro | 0,4682 | 2 | 0,2341 | | | |
| Total | 20,190 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,95294 |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 5,3967* |
| pH (1) | 0,7150 | 1 | 0,7150 | 7,8597 | 0,1071 | 0,5979 |
| Tempo (2) | 13,8467 | 1 | 13,8467 | 152,19 | 0,0065* | 2,6312* |
| Temperatura (3) | 0,0742 | 1 | 0,0742 | 0,8160 | 0,4617 | 0,1926 |
| 1 x 2 | 1,8803 | 1 | 1,8803 | 20,668 | 0,0451* | 0,9696* |
| 1 x 3 | 0,0681 | 1 | 0,0681 | 0,7492 | 0,47796 | -0,1846 |
| 2 x 3 | 0,0742 | 1 | 0,0742 | 0,8160 | 0,46170 | 0,1926 |
| 1 x 2 x 3 | 0,0681 | 1 | 0,0681 | 0,7492 | 0,4779 | -0,1846 |
| Falta de ajuste | 0,5654 | 1 | 0,5654 | 6,2147 | 0,1302 | |
| Erro puro | 0,1819 | 2 | 0,0909 | | | |
| Total | 17,47434 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,95723 |

NOTA: R² = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% (p<0,05)

Os gráficos de superfície de resposta para a contagem de psicrotróficos em função do pH e da temperatura se encontram na FIGURA 6. Para os dois produtores verificou-se a mesma tendência de resposta onde as menores contagens se encontraram em níveis de pH e temperatura baixos. Observou-se que conforme aumentou-se o pH e a temperatura, maior foi o desenvolvimento de psicrotróficos. Como para a contagem de mesófilos, pode-se considerar que quando acidificou-se o leite em pH menores, houve maiores quantidades de CO₂ adicionados e com a

diminuição da temperatura, constatou-se também uma maior solubilidade do gás na fase aquosa do leite. Como a quantidade de CO₂ solubilizado aumentou, maior foi a ação inibitória sobre os psicrotróficos.

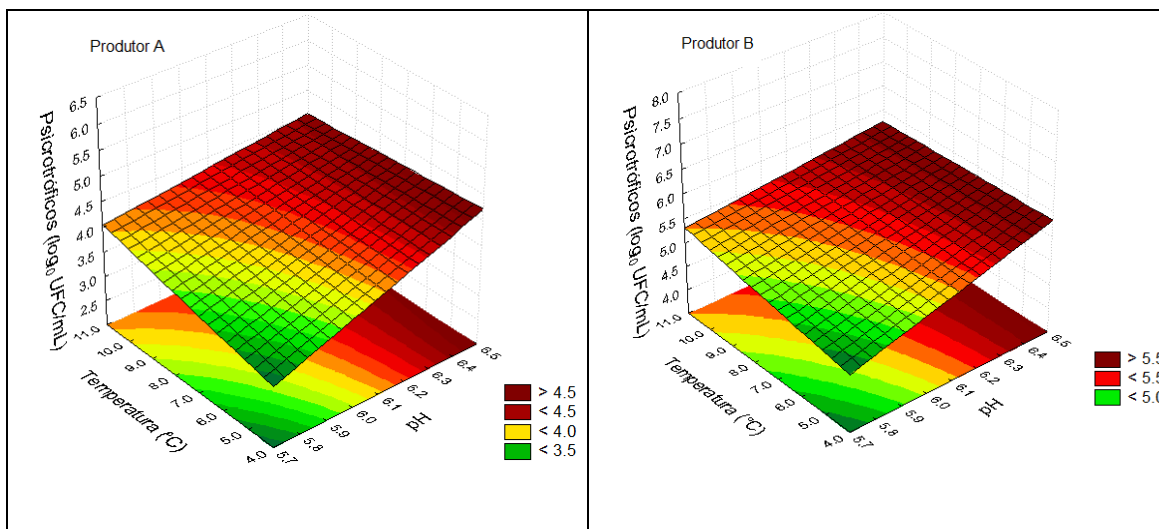


FIGURA 6– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

Através dos gráficos da FIGURA 6 pode-se constatar também que a temperatura de armazenamento do leite cru está diretamente relacionada com a taxa de multiplicação de microrganismo neste produto. Martin, Werner e Hotchkiss (2003) ressaltam que o efeito combinado do CO₂ e da temperatura seria a forma adequada para se ter reduções significativas no desenvolvimento de microrganismos no leite cru.

Na FIGURA 7 encontram-se os gráficos da contagem de psicrotróficos em função do pH e do tempo na temperatura de 7,5°C. Novamente foi verificado que os dois produtores possuíram a mesma tendência de resposta. Como já verificado na TABELA 10, a variável tempo possuiu efeito significativo e nestes gráficos pode-se constatar claramente este fato. A contagem de psicrotróficos aumentou significativamente no decorrer do armazenamento refrigerado. No tempo inicial, as menores contagens se encontraram em toda faixa de pH estudada e como já verificado anteriormente, o CO₂ parece não possuir efeito logo ao ser adicionado.

Ao considerar a contagem de psicrotróficos de 6,7 log₁₀ UFC/mL como limite para a vida de prateleira do leite cru (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), pode-se considerar que para o produtor A o leite se encontra dentro do estabelecido durante

todo o período estudado (10 dias). Já para o produtor B esse tempo é ligeiramente menor. Logo, pode-se afirmar que quanto menor a contagem inicial do leite, como para o produtor A, maior é o tempo útil de consumo.

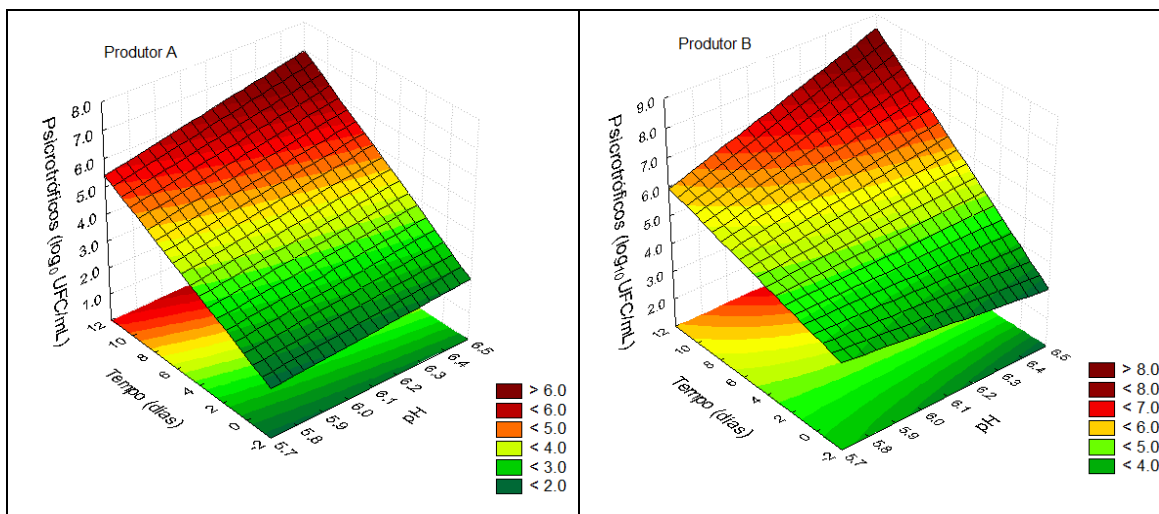


FIGURA 7– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

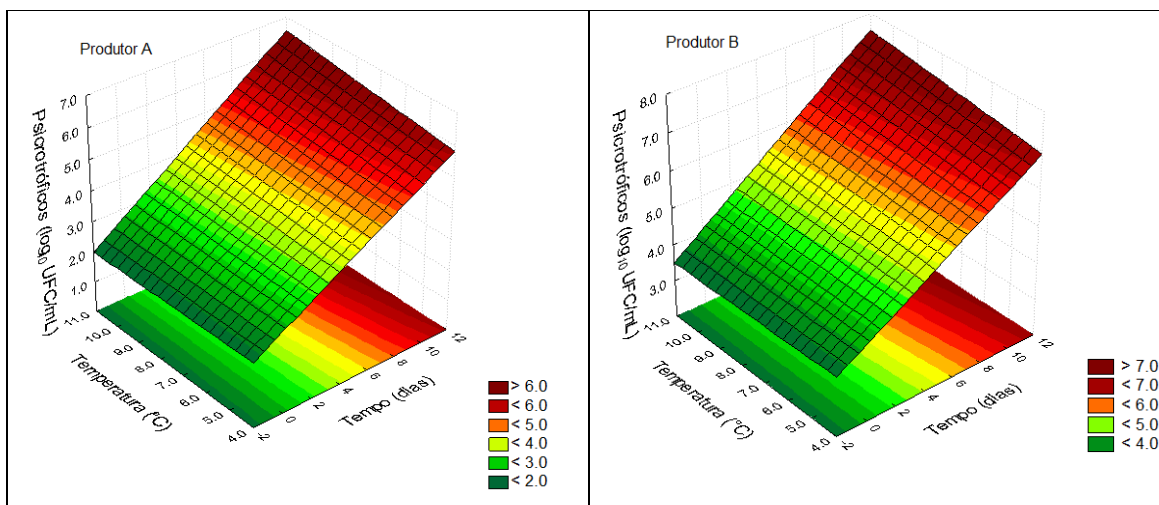


FIGURA 8– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

Na FIGURA 8 verificou-se que a contagem aumentou com o decorrer do tempo. Ao avaliar o efeito das variáveis tempo e temperatura em pH 6,1 não foi notado efeito significativo da temperatura, pois em toda faixa estudada as contagens foram parecidas.

Izidoro (2008) estudou o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento do leite cru sobre a multiplicação de psicrotróficos. O autor observou em seus experimentos que a contagem de microrganismos psicrotróficos foi maior no leite incubado a 12°C em relação ao leite armazenado a 8°C, que por sua vez, foi maior do que aquele incubado a 4°C. Haryani *et al.* (2003), também constataram que o aumento na temperatura de armazenamento do leite aumentou consideravelmente a taxa de crescimento de psicrotróficos. No entanto, para o leite acidificado com CO₂ não foi verificado o efeito da temperatura quando este foi avaliado juntamente com a variável tempo.

4.4 CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS

A contagem inicial de psicrotróficos proteolíticos foi menor para o produtor A do que para o produtor B (TABELA 11). Para este caso novamente foi constatado que o CO₂ não possui efeito sobre o metabolismo microbiano logo ao ser adicionado, pois através da ANOVA verificou-se que os ensaios 1, 2, 5 e 6 foram iguais ao controle. Para o produtor A verificou-se uma exceção, onde a contagem dos ensaios 2 e 6 foram diferentes e mais elevadas do que o controle, sendo um fator negativo.

Cardoso (2006) obteve alta contagem de psicrotróficos proteolíticos quando comparado com os valores obtidos neste trabalho, sendo de 6,04 log₁₀ UFC/mL. Aaku (2004) ao analisar amostras de leite cru provenientes de laticínios de Botswana - África obteve contagens de 2 a 5 log₁₀ UFC/mL.

Os psicrotróficos proteolíticos produzem enzimas hidrolíticas como as proteases que são capazes de degradar as frações da caseína. Muitas destas enzimas são termorresistentes e a sua intensa atividade resulta na perda da qualidade do leite e dos produtos lácteos derivados. Cousin (1982) relata que a atividade proteolítica e lipolítica não é significativa quando a contagem de psicrotróficos não excede 6 log₁₀ UFC/mL.

No tempo final de 10 dias de armazenamento, as maiores reduções foram observadas em acidificação com pH 5,8 e temperatura de armazenamento de 5 °C (ensaio 3), sendo de 1,56 logaritmos para A e 3,80 para B.

TABELA 11 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE

| Ensaio (pH/t/T) | Produtor A (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença A (log ₁₀ UFC/mL) | Produtor B (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença B (log ₁₀ UFC/mL) |
|--------------------|--|---|--|---|
| Controle (0/5) | 1,67 ± 0,52 ^f | | 4,00 ± 0,06 ^{d,f} | |
| 1 (5,8/0/5) | 1,69 ± 0,12 ^f | * | 3,27 ± 0,05 ^{e,f} | 0,73 |
| 2 (6,4/0/5) | 2,53 ± 0,27 ^e | * | 3,00 ± 0 ^f | 1,00 |
| Controle (10/5) | 6,04 ± 0,19 ^a | | 7,82 ± 0,06 ^a | |
| 3 (5,8/10/5) | 4,48 ± 0,20 ^{c,d} | 1,56 | 4,02 ± 0,03 ^{d,f} | 3,80 |
| 4 (6,4/10/5) | 5,93 ± 0,04 ^a | 0,04 | 6,15 ± 0,11 ^c | 1,67 |
| Controle (0/10) | 1,67 ± 0,52 ^f | | 4,00 ± 0,06 ^{d,f} | |
| 5 (5,8/0/10) | 1,69 ± 0,12 ^f | * | 3,27 ± 0,05 ^{e,f} | 0,73 |
| 6 (6,4/0/10) | 2,53 ± 0,27 ^e | * | 3,00 ± 0 ^f | 1,00 |
| Controle (10/10) | 6,21 ± 0,13 ^a | | 7,07 ± 0,32 ^{a,b} | |
| 7 (5,8/10/10) | 4,00 ± 0 ^d | 1,21 | 5,69 ± 0,12 ^c | 1,38 |
| 8 (6,4/10/10) | 5,66 ± 0,08 ^{a,b} | * | 7,24 ± 0,05 ^a | * |
| Controle (5/7,5) | 5,97 ± 0,07 ^a | | 6,30 ± 0,06 ^{b,c} | |
| 9 (6,1/5/7,5) | 4,15 ± 0,21 ^d | 1,82 | 4,06 ± 0,08 ^{d,e} | 2,24 |
| 10 (6,1/5/7,5) | 4,47 ± 0,01 ^{c,d} | 1,49 | 4,63 ± 0,21 ^d | 1,67 |
| 11 (6,1/5/7,5) | 5,09 ± 0,07 ^{b,c} | 0,87 | 4,48 ± 0,67 ^d | 1,82 |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios. * não houve redução na contagem bacteriana.

A condição do ponto central também foi efetiva na inibição destes microrganismos e de acordo com a ANOVA, apesar da diferença nos tratamentos as contagens foram estatisticamente iguais, ou seja, o ensaio 3 foi igual aos ensaios 9, 10 e 11.

Para o produtor B foi verificado o efeito significativo da acidificação a pH 6,4 e temperatura de armazenamento de 5°C (ensaio 4), sendo a diferença de 1,67 logaritmos em relação ao controle. Para a temperatura de 10°C (ensaio 8) não foi verificado redução no crescimento de psicrotróficos proteolíticos.

4.4.1 Superfície de resposta para contagem de psicrotróficos proteolíticos

Através da ANOVA (TABELA 12) verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) da variável dependente tempo, indicando neste caso ser o responsável pelo aumento da população bacteriana de psicrotróficos proteolíticos. Para o produtor B observou-se efeito de interação entre pH e tempo.

TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS

| Fator | Soma dos Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------|-----------|-----------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 3,8392* |
| pH (1) | 2,86963 | 1 | 2,86963 | 12,4676 | 0,07169 | 1,1978 |
| Tempo (2) | 16,88858 | 1 | 16,88858 | 73,3751 | 0,01335* | 2,9059* |
| Temperatura (3) | 0,07078 | 1 | 0,07078 | 0,3075 | 0,63495 | -0,1881 |
| 1 x 2 | 0,25147 | 1 | 0,25147 | 1,09257 | 0,40562 | 0,3545 |
| 1 x 3 | 0,00568 | 1 | 0,00568 | 0,02469 | 0,88958 | 0,0533 |
| 2 x 3 | 0,07078 | 1 | 0,07078 | 0,3075 | 0,63495 | -0,1881 |
| 1 x 2 x 3 | 0,00568 | 1 | 0,00568 | 0,02469 | 0,88958 | 0,0533 |
| Falta de ajuste | 2,211 | 1 | 2,211 | 9,60603 | 0,090233 | |
| Erro puro | 0,46034 | 2 | 0,23017 | | | |
| Total | 22,8339 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,88301$ |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 4,4363* |
| pH (1) | 1,2434 | 1 | 1,2434 | 14,2151 | 0,063700 | 0,7884 |
| Tempo (2) | 13,980 | 1 | 13,9803 | 159,8246 | 0,006199* | 2,6438* |
| Temperatura (3) | 0,9494 | 1 | 0,9494 | 10,8543 | 0,081082 | 0,689 |
| 1 x 2 | 2,2228 | 1 | 2,2228 | 25,4114 | 0,037172* | 1,0542* |
| 1 x 3 | 0,0424 | 1 | 0,0424 | 0,4854 | 0,558090 | -0,1456 |
| 2 x 3 | 0,9494 | 1 | 0,9494 | 10,8543 | 0,081082 | 0,689 |
| 1 x 2 x 3 | 0,0424 | 1 | 0,0424 | 0,4854 | 0,558090 | -0,1456 |
| Falta de ajuste | 0,0099 | 1 | 0,0099 | 0,1139 | 0,767883 | |
| Erro puro | 0,1749 | 2 | 0,0874 | | | |
| Total | 19,61535 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,99057$ |

NOTA: R^2 = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% ($p < 0,05$)

Para esta resposta a falta de ajuste não foi significativa indicando que a metodologia de superfície de resposta com modelos lineares descreve bem os

resultados obtidos. Os coeficientes de determinação foram de 0,88301 e 0,99057 respectivamente para A e B, mostrando novamente a boa explicação na variabilidade dos resultados.

Ao plotar os gráficos da contagem de psicrotróficos proteolíticos em função do pH e da temperatura (FIGURA 9), observou-se que os dois produtores apresentaram tendência de resposta diferentes. Para o produtor B as menores contagens se concentraram em níveis de pH e temperatura inferiores, diferente do verificado para o produtor A onde em níveis de pH baixo e temperatura alta encontraram-se populações bacterianas menores.

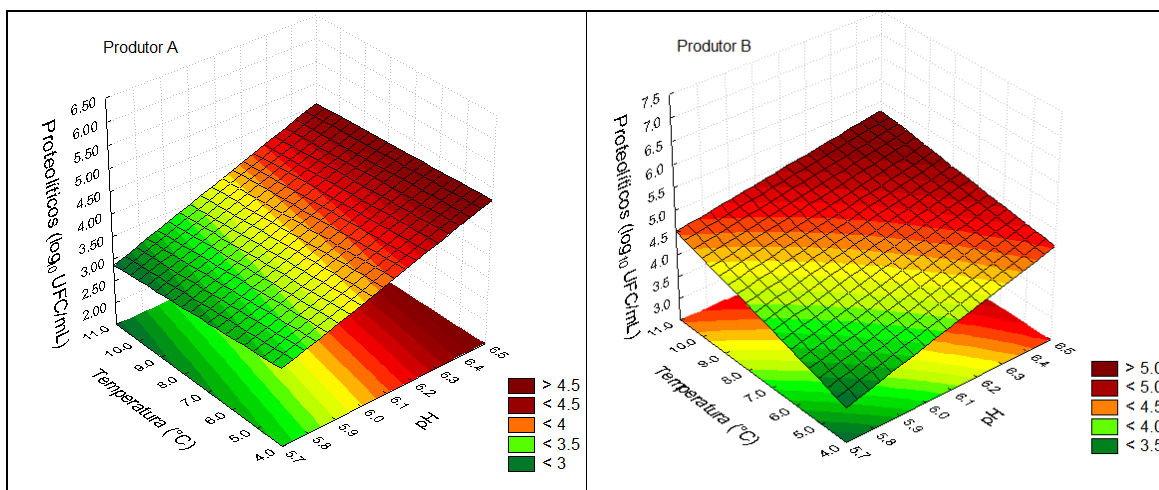


FIGURA 9– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

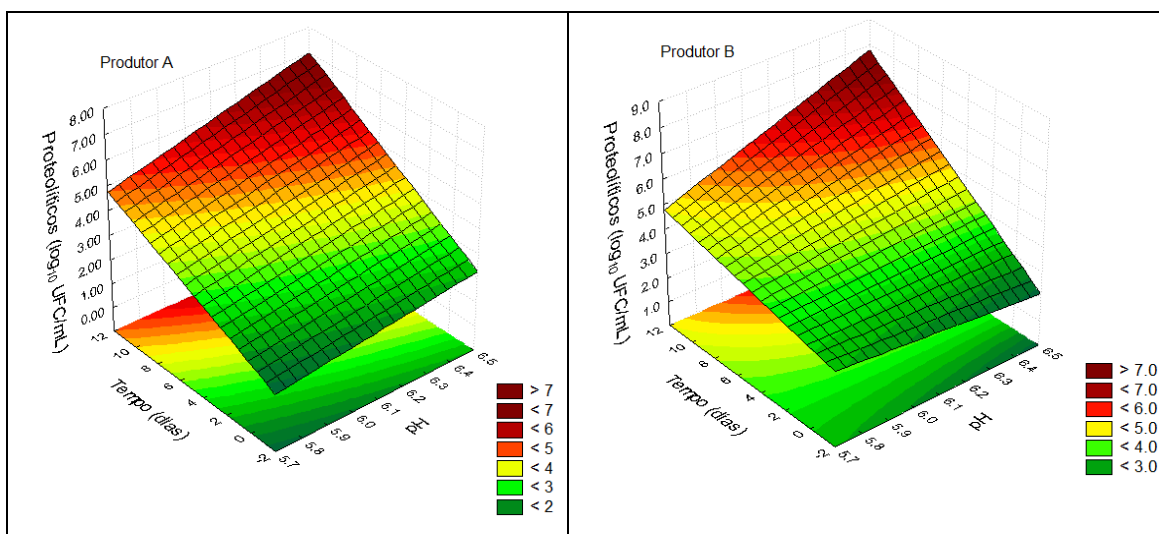


FIGURA 10– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

Na FIGURA 10 foi possível verificar claramente o efeito significativo do tempo no aumento da população de psicrotróficos proteolíticos para os dois produtores. Em relação ao pH constatou-se efeito contrário no tempo inicial, para A em níveis inferiores de pH houve menores contagens e em B esse fato foi verificado em níveis elevados de pH.

Para A não foi verificada influência da temperatura durante os 10 dias de armazenamento (FIGURA 11). Já para B o efeito da temperatura foi significativo a partir de 5 dias.

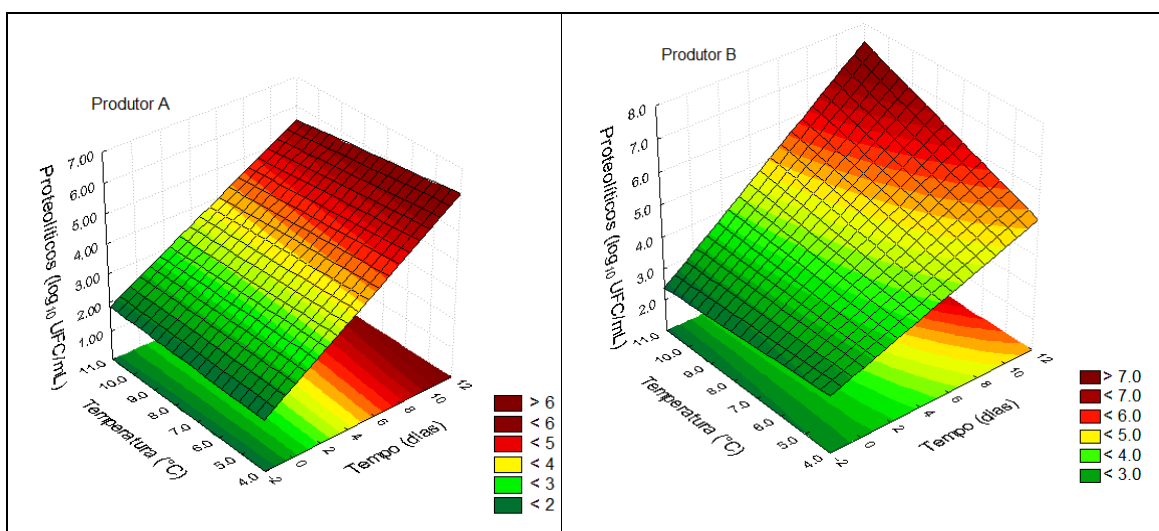


FIGURA 11– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

Cardoso (2006) obteve um aumento de 2 ciclos logarítmicos na população de psicrotróficos proteolíticos em leite destinado à produção de queijo minas frescal armazenado a 10 °C por 4 dias. Esse aumento influenciou a produção gerando baixo rendimento do queijo minas frescal.

4.5 CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS LIPOLÍTICOS

A contagem inicial de psicrotróficos lipolíticos foi de 2,15 e 3,98 \log_{10} UFC/mL para os produtores A e B respectivamente (TABELA 13). Cardoso (2006)

obteve contagem de $6,3 \times 10^4$ UFC/mL (ou $4,80 \log_{10}$ UFC/mL), Aaku *et al.* (2004) encontraram de 4 a 5 \log_{10} UFC/mL em leite cru bovino.

A presença de psicotróficos lipolíticos no leite cru é indesejável porque são capazes de produzir lipases que são termorresistentes e podem apresentar atividade residual de 25% após a pasteurização e de 9 % após tratamento UHT (SHAH, 1994). Além disso, o desenvolvimento de altos níveis de ácidos graxos livres devido à lipólise transmite sabor ranço em produtos lácteos, tornando-os sensorialmente inaceitáveis (MA *et al.*, 2000)

TABELA 13 – CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE

| Ensaio (pH/t/T) | Produtor A (\log_{10} UFC/mL) | Diferença A (\log_{10} UFC/mL) | Produtor B (\log_{10} UFC/mL) | Diferença B (\log_{10} UFC/mL) |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Controle (0/5) | $2,15 \pm 0,21^{b,c}$ | | $3,98 \pm 0,03^{d,e}$ | |
| 1 (5,8/0/5) | $2,00 \pm 0^c$ | 0,15 | $3,27 \pm 0,05^{i,g}$ | 0,71 |
| 2 (6,4/0/5) | $2,00 \pm 0^c$ | 0,15 | $3,00 \pm 0^g$ | 0,98 |
| Controle (10/5) | $4,00 \pm 0^a$ | | $5,54 \pm 0,09^{b,c}$ | |
| 3 (5,8/10/5) | $3,77 \pm 0,10^a$ | 0,23 | $4,02 \pm 0,03^{d,e}$ | 1,52 |
| 4 (6,4/10/5) | $3,15 \pm 0,21^{a,c}$ | 0,85 | $5,77 \pm 0,10^{b,c}$ | * |
| Controle (0/10) | $2,15 \pm 0,21^{b,c}$ | | $3,98 \pm 0,03^{d,e}$ | |
| 5 (5,8/0/10) | $2,00 \pm 0^c$ | 0,15 | $3,27 \pm 0,05^g$ | 0,71 |
| 6 (6,4/0/10) | $2,00 \pm 0^c$ | 0,15 | $3,00 \pm 0^g$ | 0,98 |
| Controle (10/10) | $3,00 \pm 0^{a,c}$ | | $6,48 \pm 0,17^a$ | |
| 7 (5,8/10/10) | $3,24 \pm 0,34^{a,c}$ | * | $4,04 \pm 0,06^{d,e}$ | 2,44 |
| 8 (6,4/10/10) | $3,50 \pm 0,71^{a,b}$ | * | $5,95 \pm 0,07^{a,b}$ | 0,53 |
| Controle (5/7,5) | $4,30 \pm 0,43^a$ | | $5,37 \pm 0,10^c$ | |
| 9 (6,1/5/7,5) | $3,00 \pm 0^{a,c}$ | 1,30 | $3,93 \pm 0,48^{d,e}$ | 1,44 |
| 10 (6,1/5/7,5) | $3,59 \pm 0,83^a$ | 0,71 | $4,44 \pm 0,06^d$ | 0,94 |
| 11 (6,1/5/7,5) | $3,35 \pm 0,49^{a,c}$ | 0,95 | $3,58 \pm 0,03^{e,f}$ | 1,79 |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios. * não houve redução na contagem bacteriana.

Através da ANOVA verificou-se que os diferentes níveis de pH de acidificação não interferiram na contagem no tempo inicial, pois os valores foram estatisticamente iguais nos ensaios 1, 2, 5 e 6 tanto para A como para B.

Para o produtor A, a adição de CO₂ não possuiu efeito inibitório significativo, pois após 10 dias de armazenamento refrigerado as contagens dos ensaios 3, 4, 7 e 8 foram estatisticamente iguais aos seus respectivos controle. Apesar de na condição do ponto central (ensaios 9, 10 e 11) a contagem também ter sido estatisticamente igual ao controle, foi possível obter em média uma redução de um logaritmo no crescimento de psicotróficos lipolíticos.

Em compensação para o produtor B reduções significativas foram obtidas através da acidificação em pH 5,8 sendo de 1,52 e 2,44 ciclos logaritmos para os ensaios 3 e 7 respectivamente após 10 dias. Para este caso novamente verificou-se inibição no crescimento nas condições do ponto central. Ruas-Madiedo *et al.* (1996), reduziu o pH do leite de 6,8 para 6,0 por meio da adição de CO₂ e notaram uma redução de 1 ciclo logaritmo na população lipolítica após 4 dias a 4 °C.

Para os dois produtores após 10 dias a acidificação em pH 6,4 não contribuiu significativamente na redução do crescimento de psicotróficos lipolíticos mesmo nas diferentes temperaturas de armazenamento (ensaios 4 e 8).

O efeito bactericida do CO₂ sobre os psicotróficos lipolíticos não está bem elucidado, no entanto estudos de Loss e Hotchkiss (2000) indicam que a característica apolar do CO₂ faz com que este seja mais solúvel na fração lipídica do leite o que dificulta a ação e o desenvolvimento destas bactérias.

De acordo com Haryani *et al.* (2003), o principal fator que determina a atividade lipolítica é o tipo de bactéria psicotrófica que cresce no leite cru e não o número dessas bactérias.

4.5.1 Superfície de resposta para contagem de psicotróficos lipolíticos

A TABELA 14 apresenta a análise de variância para modelos lineares de superfície de resposta, a estimativa dos efeitos e o coeficiente de determinação para a contagem de psicotróficos lipolíticos.

Para os dois casos verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) apenas para o fator tempo, indicando desta forma este ser o único responsável pelo aumento da contagem de psicotróficos lipolíticos.

Com os valores de R^2 obtidos pode-se considerar que os modelos lineares de superfície de resposta representaram bem os dados obtidos. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa indicando novamente a adequação desses modelos.

TABELA 14 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS

| Fator | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|---------|----------|-----------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 2,8726* |
| pH (1) | 0,0162 | 1 | 0,0162 | 0,1852 | 0,70882 | -0,09 |
| Tempo (2) | 4,006 | 1 | 4,0060 | 45,7963 | 0,02114* | 1,4152* |
| Temperatura (3) | 0,0042 | 1 | 0,0042 | 0,0483 | 0,84632 | -0,0459 |
| 1 x 2 | 0,0162 | 1 | 0,0162 | 0,1852 | 0,70882 | -0,09 |
| 1 x 3 | 0,0974 | 1 | 0,0974 | 1,1140 | 0,40187 | 0,2207 |
| 2 x 3 | 0,0042 | 1 | 0,0042 | 0,0483 | 0,84632 | -0,0459 |
| 1 x 2 x 3 | 0,0974 | 1 | 0,0974 | 1,1140 | 0,40187 | 0,2207 |
| Falta de ajuste | 0,7982 | 1 | 0,7982 | 9,1256 | 0,09433 | |
| Erro puro | 0,1749 | 2 | 0,0874 | | | |
| Total | 5,2150 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,81338$ |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 4,0237* |
| pH (1) | 1,2260 | 1 | 1,2260 | 6,5815 | 0,12424 | 0,7829 |
| Tempo (2) | 6,5746 | 1 | 6,5746 | 35,293 | 0,02718* | 1,813* |
| Temperatura (3) | 0,0049 | 1 | 0,0049 | 0,0264 | 0,88582 | 0,0496 |
| 1 x 2 | 2,1995 | 1 | 2,1995 | 11,8073 | 0,07525 | 1,0486 |
| 1 x 3 | 0,0032 | 1 | 0,0032 | 0,0173 | 0,90736 | 0,0401 |
| 2 x 3 | 0,0049 | 1 | 0,0049 | 0,0264 | 0,88582 | 0,0496 |
| 1 x 2 x 3 | 0,0032 | 1 | 0,0032 | 0,0173 | 0,90736 | 0,0401 |
| Falta de ajuste | 0,0072 | 1 | 0,0072 | 0,0386 | 0,86224 | |
| Erro puro | 0,3725 | 2 | 0,1862 | | | |
| Total | 10,396 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,96347$ |

NOTA: R^2 = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% ($p < 0,05$)

Na FIGURA 12 observou-se tendência de resposta completamente diferente para os dois produtores quando plotou-se os gráfico da contagem em função do pH e da temperatura. Para o produtor B a temperatura não apresentou influência sobre

o número de microrganismos, como já constatado na TABELA 13, e a contagem aumentou com o aumento do pH.

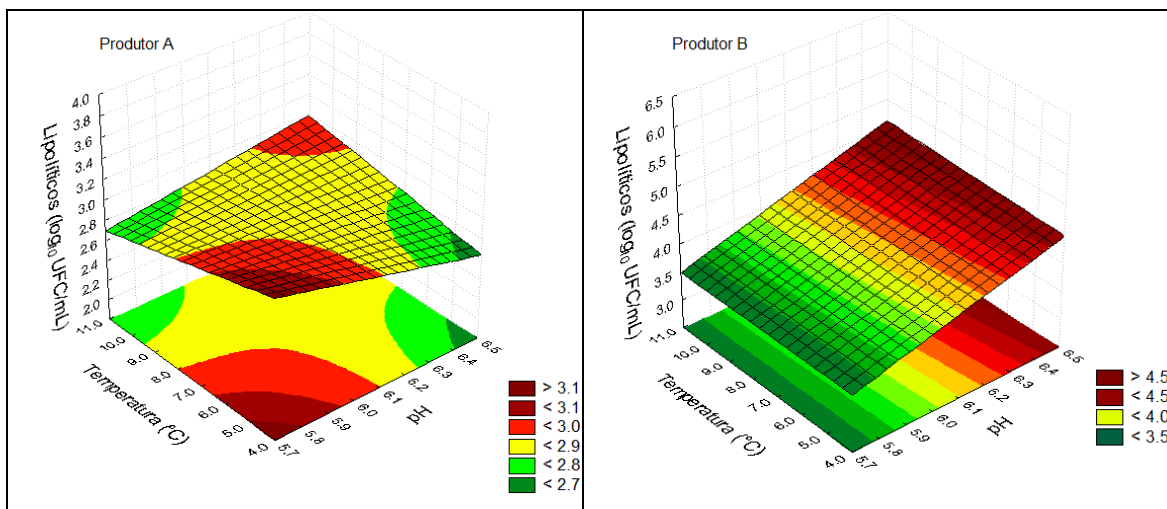


FIGURA 12– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

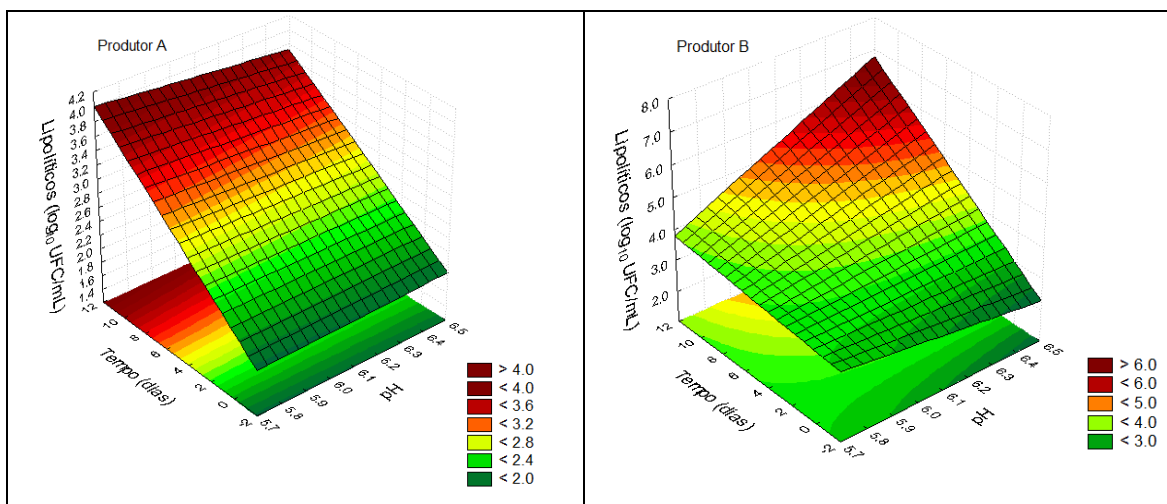


FIGURA 13– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

Nos gráficos de superfície de resposta da contagem de psicrotróficos lipolíticos em função do pH e do tempo em temperatura de 7,5°C (FIGURA 13), observou-se aumento no desenvolvimento deste microrganismo no decorrer do tempo e efeito negativo do pH para o produtor A. Em compensação para o produtor B, as maiores contagens se concentraram em níveis de pH e tempo elevados.

Nos gráficos em função do tempo e da temperatura (FIGURA 14) a temperatura de armazenamento não foi significativa, apenas o tempo como já foi verificado anteriormente. Os dois produtores apresentaram tendência de reposta semelhantes onde as contagens foram aumentando com o tempo, independente da temperatura em estudo.

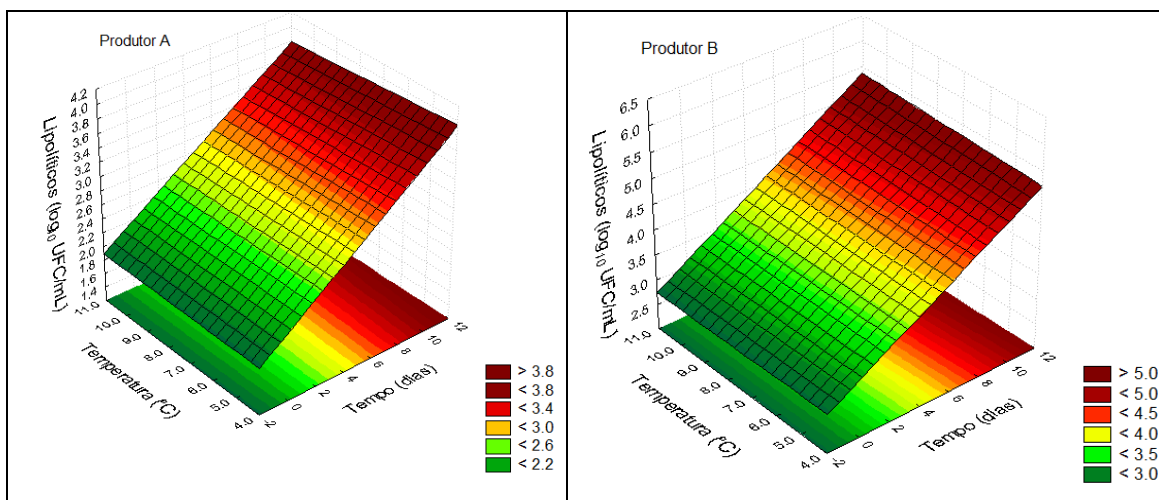


FIGURA 14– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

4.6 CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS

A contagem inicial de coliformes totais foi de $1,15 \log_{10}$ UFC/mL para A e $3,32 \log_{10}$ UFC/mL para B (TABELA 15). Sanvido (2006) em seu trabalho obteve $2,56 \log_{10}$ UFC/mL. Mattos (2008) ao analisar amostras de leite da região agreste de Pernambuco encontrou contagens entre $1,5 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^7$ UFC/mL, sendo que 98% das amostras analisadas estavam com contagem acima de 10^5 UFC/mL. Conforme esse mesmo autor, os resultados indicaram que as condições de obtenção do leite foram insatisfatórias e que contagens de coliformes totais acima de 100 UFC/mL indicam condições inadequadas de higiene. Com base nisso, pode-se considerar que o procedimento de ordenha do produtor B não foi adequado.

TABELA 15 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E DIFERENÇA NA CONTAGEM EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS CONTROLE

| Ensaio (pH/t/T) | Produtor A (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença A (log ₁₀ UFC/mL) | Produtor B (log ₁₀ UFC/mL) | Diferença B (log ₁₀ UFC/mL) |
|--------------------|--|---|--|---|
| Controle (0/5) | 1,15 ± 0,21 ^f | | 3,32 ± 0,13 ^g | |
| 1 (5,8/0/5) | 1,39 ± 0,12 ^f | * | 4,74 ± 0,09 ^{c,d,f} | * |
| 2 (6,4/0/5) | 1,54 ± 0,09 ^f | * | 4,45 ± 0,21 ^{e,f} | * |
| Controle (10/5) | 3,45 ± 0,05 ^c | | 5,59 ± 0,21 ^{b,c} | |
| 3 (5,8/10/5) | 2,00 ± 0 ^e | 1,45 | 4,39 ± 0,55 ^f | 1,20 |
| 4 (6,4/10/5) | 3,71 ± 0,03 ^{b,d} | * | 6,58 ± 0,11 ^a | * |
| Controle (0/10) | 1,15 ± 0,21 ^f | | 3,32 ± 0,13 ^g | |
| 5 (5,8/0/10) | 1,39 ± 0,12 ^f | * | 4,74 ± 0,09 ^{c,d,f} | * |
| 6 (6,4/0/10) | 1,54 ± 0,09 ^f | * | 4,45 ± 0,21 ^{e,f} | * |
| Controle (10/10) | 4,89 ± 0,02 ^a | | 4,89 ± 0,58 ^{b,f} | |
| 7 (5,8/10/10) | 3,64 ± 0,06 ^{b,c} | 1,25 | 5,09 ± 0,12 ^{b,f} | * |
| 8 (6,4/10/10) | 3,00 ± 0 ^d | 1,89 | 6,52 ± 0,02 ^{a,c} | * |
| Controle (5/7,5) | 3,98 ± 0,05 ^b | | 5,70 ± 0,09 ^{a,b} | |
| 9 (6,1/5/7,5) | 3,32 ± 0,24 ^{c,d} | 0,66 | 5,35 ± 0,01 ^{b,d,e} | 0,35 |
| 10 (6,1/5/7,5) | 3,80 ± 0,08 ^b | 0,18 | 5,43 ± 0,02 ^{b,d} | 0,27 |
| 11 (6,1/5/7,5) | 3,97 ± 0,02 ^b | 0,01 | 5,60 ± 0,03 ^{b,c} | 0,10 |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios. * não houve redução na contagem bacteriana.

Para a contagem de coliformes totais também foi verificado que o CO₂ não interferiu no metabolismo microbiano logo ao ser adicionado, pois para o produtor A as contagens dos ensaios 1, 2, 5 e 6 foram estatisticamente iguais ao controle.

Após 10 dias de armazenamento refrigerado apenas o ensaio 3 mostrou redução significativa sendo de 1,45 logaritmos para A e 1,20 para B. Ruas-Madiedo *et al.*, (1996) obtiveram uma redução de um ciclo logaritmo no desenvolvimento de coliformes totais, Roberts e Torrey (1988) de 1 a 1,5 logaritmos e Espie e Madden de 2,3 logaritmos. Como já constatado para os outros microrganismos pesquisados neste trabalho, acidificação a pH 5,8 e temperatura de armazenamento de 5 °C reduziu o crescimento de coliformes totais.

Considerando que ao acidificar o leite a pH cada vez menor, maiores quantidades de CO₂ estariam sendo dissolvidos, pode-se levar em conta que maior é a magnitude de inibição. Espie e Madden (1997) também concordam que quanto

maior a quantidade de CO₂ dissolvido, maior o efeito no desenvolvimento de microrganismos.

No produtor A também foram observadas reduções significativas no desenvolvimento de coliformes totais para os ensaios 7 e 8. A temperatura de 10°C empregada foi eficiente independente do pH de acidificação.

A alta contagem inicial observada em B influenciou no efeito inibitório do CO₂ durante os 10 dias, pois com exceção do ensaio 3 não foram observadas diminuições significativas em nenhum dos outros ensaios.

4.6.1 Superfície de resposta para contagem de coliformes totais

De acordo com a ANOVA (TABELA 16), para o leite do produtor A apenas o tempo apresentou efeito significativo. O R² obtido foi baixo, sendo de 0,60895, e indicou que modelos lineares de superfície de resposta foram capazes de explicar apenas uma pequena parte da variabilidade dos dados em torno da média. A falta de ajuste também foi significativa, apontando novamente que o modelo proposto não foi adequado para fins preditivos. Ainda assim, esses modelos podem ser utilizados para verificar graficamente a tendência de resposta da contagem de coliformes totais, no processo de acidificação do leite com CO₂, frente aos efeitos do pH, tempo e temperatura.

Para o leite do produtor B o pH e o tempo apresentaram efeito significativo, assim como sua interação. Neste caso modelos lineares de superfície de resposta foram capazes de explicar bem a variabilidade dos dados obtidos, pois R² foi de 0,953 e a falta de ajuste não foi significativa.

TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA CONTAGEM DE COLIFORMES

| Fator | Soma dos Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|---------|--------------------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 2,6553* |
| pH (1) | 0,2679 | 1 | 0,2679 | 2,3398 | 0,2657 | 0,366 |
| Tempo (2) | 5,4090 | 1 | 5,4090 | 47,2263 | 0,0205* | 1,6445* |
| Temperatura (3) | 0,0875 | 1 | 0,0875 | 0,7642 | 0,4741 | 0,2092 |
| 1 x 2 | 0,0588 | 1 | 0,0588 | 0,5137 | 0,5479 | 0,1715 |
| 1 x 3 | 0,6381 | 1 | 0,6381 | 5,5713 | 0,1421 | -0,5648 |
| 2 x 3 | 0,1282 | 1 | 0,1282 | 1,1197 | 0,4009 | 0,2532 |
| 1 x 2 x 3 | 0,7414 | 1 | 0,7414 | 6,4736 | 0,1259 | -0,6088 |
| Falta de ajuste | 4,4787 | 1 | 4,4787 | 39,1041 | 0,0246* | |
| Erro puro | 0,2290 | 2 | 0,1145 | | | |
| Total | 12,0390 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,60895 |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 5,2132* |
| pH (1) | 1,1627 | 1 | 1,1627 | 71,545 | 0,0136* | 0,7624* |
| Tempo (2) | 2,2029 | 1 | 2,2029 | 135,545 | 0,0072* | 1,0495* |
| Temperatura (3) | 0,0501 | 1 | 0,0501 | 3,085 | 0,2210 | 0,1583 |
| 1 x 2 | 2,2053 | 1 | 2,2053 | 135,69 | 0,0072* | 1,05* |
| 1 x 3 | 0,0730 | 1 | 0,0730 | 4,4965 | 0,1680 | -0,1911 |
| 2 x 3 | 0,0501 | 1 | 0,0501 | 3,0850 | 0,2210 | 0,1583 |
| 1 x 2 x 3 | 0,0730 | 1 | 0,0730 | 4,4965 | 0,1680 | -0,1911 |
| Falta de ajuste | 0,2543 | 1 | 0,2543 | 15,652 | 0,0583 | |
| Erro puro | 0,0325 | 2 | 0,0162 | | | |
| Total | 6,1043 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,953 |

NOTA: R² = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% (p<0,05)

Ao considerar a região da superfície onde se concentram as menores contagens, os dois produtores possuíram a mesma tendência de resposta em níveis de pH e temperatura inferiores (FIGURA 15). Analisando-se a região de maiores contagens, nota-se que para o produtor B quanto maior o pH, maior o número de microrganismos.

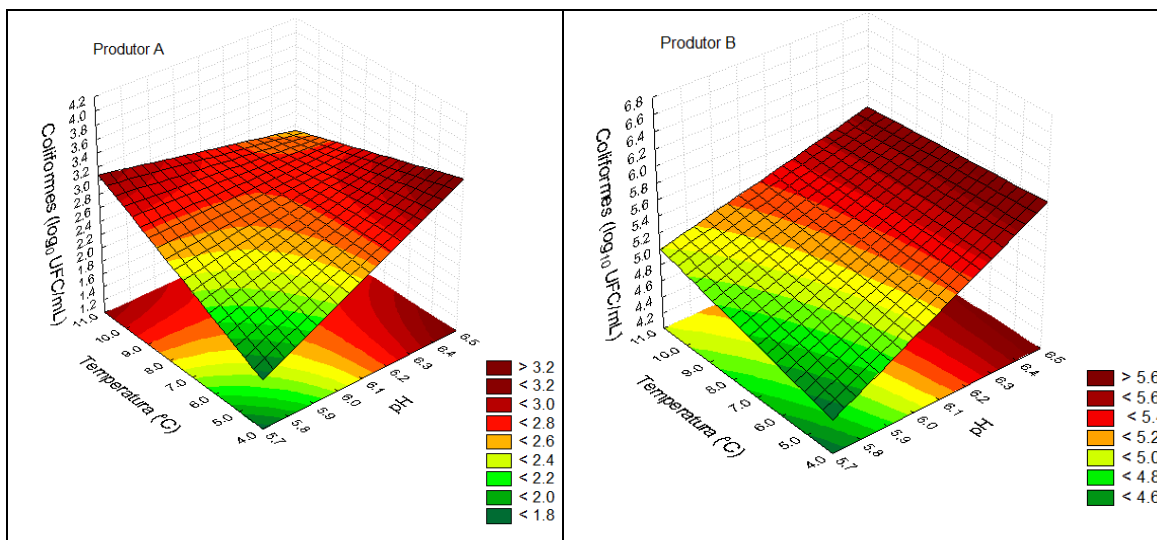


FIGURA 15– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

No gráfico da contagem de coliformes totais em função do pH e do tempo em temperatura de 7,5°C (FIGURA 16), observou-se efeito significativo do tempo para os dois produtores e efeito negativo do pH no produtor A na região de baixas contagens. As maiores contagens se concentraram em pH e tempo elevados para os dois casos.

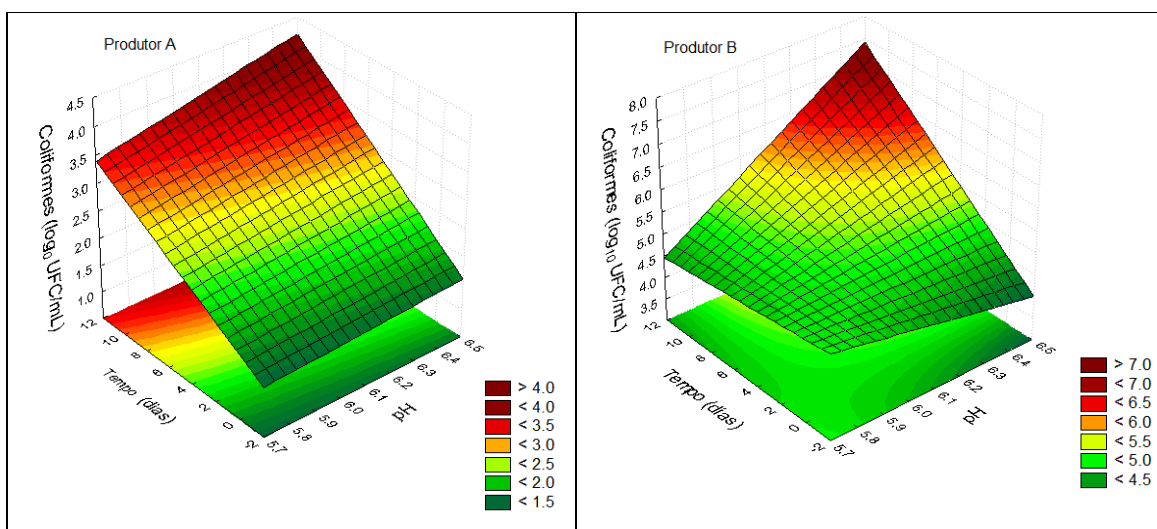


FIGURA 16– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

Na FIGURA 17 pode-se verificar que a temperatura não influenciou no desenvolvimento de coliformes totais tanto para A como para B. Este fato já foi

observado para os outros microrganismos estudados neste trabalho. No decorrer do armazenamento verificou-se aumento significativo na população de coliformes independente da temperatura empregada.

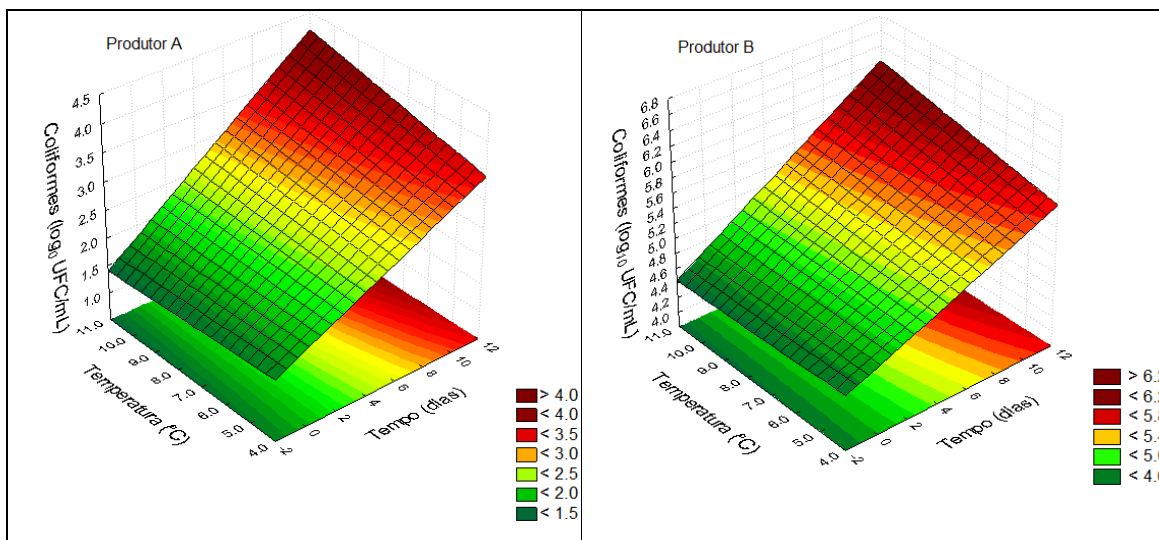


FIGURA 17– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

4.7 VISCOSIDADE E TURBIDEZ

Em relação à viscosidade (TABELA 17), tanto para A como para B constatou-se que logo ao adicionar CO₂ no leite não houve modificação nesta propriedade, pois os ensaios 1, 2, 5 e 6 foram estatisticamente iguais ao controle.

Com o decorrer do armazenamento a viscosidade aumentou e isso pode estar relacionado com as enzimas produzidas por psicrotróficos e com a produção de ácido láctico por bactérias mesófilas durante o armazenamento. As proteases de origem psicrotrófica apresentam capacidade de coagular a proteína do leite e possuem atividade hidrolítica em várias frações da caseína (SANTOS; FONSECA, 2001). A κ-caseína localizada na superfície da micela de caseína é preferencialmente hidrolisada, e esta hidrólise causa o desenvolvimento de gosto amargo e induz o aumento da viscosidade. Em contrapartida, a atividade acidificante dos microrganismos mesófilos podem ter contribuído para a precipitação das proteínas presentes no leite acarretando no aumento de sua viscosidade.

TABELA 17 – VALORES DE VISCOSIDADE E TURBIDEZ DO LEITE DOS PRODUTORES A E B

| Ensaio (pH/t/T) | Viscosidade (cP) | | Turbidez (NTU) | |
|--------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Produtor A | Produtor B | Produtor A | Produtor B |
| Controle (0/5) | 1,636 ± 0,004 ^c | 1,695 ± 0,004 ^{c,e} | 3577 ± 11 ⁱ | 2663 ± 6 ^g |
| 1 (5,8/0/5) | 1,615 ± 0,008 ^c | 1,666 ± 0,004 ^{d,e,f} | 3610 ± 10 ^{g,h} | 3703 ± 6 ^d |
| 2 (6,4/0/5) | 1,621 ± 0,004 ^c | 1,699 ± 0,024 ^{c,d} | 3473 ± 6 ^j | 3707 ± 6 ^d |
| Controle (10/5) | 1,688 ± 0,007 ^b | 1,737 ± 0,042 ^b | 3573 ± 6 ⁱ | 3683 ± 6 ^d |
| 3 (5,8/10/5) | 1,719 ± 0,007 ^a | 1,748 ± 0,004 ^{b,c} | 3766 ± 6 ^d | 3863 ± 6 ^{a,b} |
| 4 (6,4/10/5) | 1,716 ± 0,013 ^a | 1,739 ± 0,023 ^{b,c} | 3600 ± 10 ^{h,i} | 3763 ± 6 ^c |
| Controle (0/10) | 1,636 ± 0,004 ^c | 1,695 ± 0,004 ^{c,e} | 3577 ± 11 ⁱ | 2663 ± 6 ^g |
| 5 (5,8/0/10) | 1,615 ± 0,008 ^c | 1,666 ± 0,004 ^{d,e,f} | 3610 ± 10 ^{g,h} | 3703 ± 6 ^d |
| 6 (6,4/0/10) | 1,621 ± 0,004 ^c | 1,699 ± 0,024 ^{c,d} | 3473 ± 6 ^j | 3707 ± 6 ^d |
| Controle (10/10) | 1,587 ± 0,004 ^d | 1,924 ± 0,036 ^a | 4020 ± 10 ^b | 3657 ± 6 ^e |
| 7 (5,8/10/10) | 1,638 ± 0,007 ^c | 1,705 ± 0,011 ^{c,d} | 3907 ± 11 ^c | 3853 ± 6 ^b |
| 8 (6,4/10/10) | 1,586 ± 0,004 ^d | 1,653 ± 0,016 ^{d,e,f} | 4187 ± 15 ^a | 3883 ± 23 ^a |
| Controle (5/7,5) | 1,625 ± 0,004 ^c | 1,769 ± 0,012 ^b | 3633 ± 6 ^{i,g} | 2960 ± 0 ⁱ |
| 9 (6,1/5/7,5) | 1,624 ± 0,015 ^c | 1,619 ± 0,009 [†] | 3647 ± 15 [†] | 3653 ± 6 ^e |
| 10 (6,1/5/7,5) | 1,614 ± 0,011 ^{c,d} | 1,620 ± 0,004 [†] | 3690 ± 0 ^e | 3653 ± 6 ^e |
| 11 (6,1/5/7,5) | 1,637 ± 0,015 ^c | 1,626 ± 0,004 [†] | 3650 ± 0 ^f | 3650 ± 0 ^e |

NOTA: Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. (pH/t/T) = pH, tempo e temperatura dos ensaios.

VIDAL-MARTINS *et al.* (2005) constataram aumento da viscosidade aparente durante a estocagem do leite UHT e isto estava relacionado com a presença de proteases produzidas por bactérias psicrófilas contaminantes do leite cru.

As características de viscosidade e de consistência de um produto podem determinar sua aceitação ou não por parte do consumidor. Estas também são importantes durante o processamento, até mesmo na determinação de parâmetros do processo. O conhecimento das propriedades reológicas é importante para o desenvolvimento contínuo de produtos e processos, equipamentos, manuseio e controle de qualidade. Uma vez que em muitas operações e tratamentos ocorrem mudanças das características do produto, é também importante conhecer como a viscosidade varia com o tratamento utilizado (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

A acidificação com CO₂ aumentou a turbidez do leite significativamente. Verificou-se também que no decorrer do armazenamento refrigerado houve elevação

deste parâmetro e isso pode ter ocorrido devido à flocculação das micelas de caseína que perderam a sua estabilidade coloidal com proteólise da κ -caseína (KRUIF, 1993).

O balanço mineral entre as fases coloidal e solúvel é essencialmente dependente da temperatura e do pH. A acidificação do leite solubiliza parcialmente o fosfato de cálcio coloidal e o cálcio diretamente ligado à caseína e como consequência ocorre modificações nas propriedades físico-químicas do leite (GEVAUDAN *et al.*, 1996). Em meio aquoso, o CO_2 está em equilíbrio com sua forma ionizada HCO_3^- que foi capaz de reagir não somente com o Ca e Mg solubilizados mas também com Na e K formando carbonatos solúveis como NaHCO_3 e KHCO_3 ou complexos com cátions divalentes solubilizados. Esse fato também pode ter contribuído para o aumento da turbidez do leite quando este foi acidificado com CO_2 .

4.7.1 Superfície de resposta para viscosidade

Para o produtor A as variáveis independentes tempo e temperatura possuíram efeito significativo ($p < 0,05$) conforme a ANOVA (TABELA 18). Verificou-se também efeito de interação significativo entre tempo e temperatura. Para este caso modelos lineares de superfície de resposta descreveu em média 95% da variabilidade dos dados obtidos mostrando a sua ótima aplicação. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa afirmando novamente a boa explicação que esse modelo apresenta.

No caso do produtor B verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) das variáveis tempo e temperatura, além de efeitos de segunda ordem pH x tempo e tempo x temperatura. Diferentemente do obtido para o produtor A, o coeficiente de determinação obtido foi baixo ($R^2 = 0,399$) e a falta de ajuste significativa mostrando que os modelos lineares não são eficientes para descrever a tendência de reposta da viscosidade do leite obtido do produtor B.

TABELA 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA VISCOSIDADE

| Fator | Soma dos Quadrados | Grau de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------|----------|--------------------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 1,6369* |
| pH (1) | 0,00022 | 1 | 0,00022 | 1,6085 | 0,33234 | -0,0106 |
| Tempo (2) | 0,00435 | 1 | 0,00435 | 31,0945 | 0,03068* | 0,0466* |
| Temperatura (3) | 0,00557 | 1 | 0,00557 | 39,8288 | 0,02420* | -0,0528* |
| 1 x 2 | 0,00055 | 1 | 0,00055 | 3,9347 | 0,18575 | -0,0165 |
| 1 x 3 | 0,00028 | 1 | 0,00028 | 2,0364 | 0,28971 | -0,0119 |
| 2 x 3 | 0,00557 | 1 | 0,00557 | 39,8288 | 0,0242* | -0,0528* |
| 1 x 2 x 3 | 0,00028 | 1 | 0,00028 | 2,0364 | 0,28971 | -0,0119 |
| Falta de ajuste | 0,00060 | 1 | 0,00060 | 4,3305 | 0,17291 | |
| Erro puro | 0,00028 | 2 | 0,00014 | | | |
| Total | 0,01774 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,95003 |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 1,6765* |
| pH (1) | 0,000004 | 1 | 0,000004 | 0,2148 | 0,6886 | 0,00135 |
| Tempo (2) | 0,001641 | 1 | 0,001641 | 96,1269 | 0,01024* | 0,00286* |
| Temperatura (3) | 0,002093 | 1 | 0,002093 | 122,622 | 0,00805* | -0,0323* |
| 1 x 2 | 0,001941 | 1 | 0,001941 | 113,721 | 0,00867* | -0,0311* |
| 1 x 3 | 0,000229 | 1 | 0,000229 | 13,415 | 0,06712 | -0,0107 |
| 2 x 3 | 0,002093 | 1 | 0,002093 | 122,622 | 0,00805* | -0,0323* |
| 1 x 2 x 3 | 0,000229 | 1 | 0,000229 | 13,415 | 0,06712 | -0,0107 |
| Falta de ajuste | 0,01236 | 1 | 0,01236 | 724,242 | 0,00137* | |
| Erro puro | 0,000034 | 2 | 0,000017 | | | |
| Total | 0,020626 | 10 | | | | |
| | | | | | | R ² = 0,399 |

NOTA: R² = coeficiente de determinação; R²_{Adj} = coeficiente de determinação ajustado; * significativo em nível de 5% (p<0,05)

Ao plotar a viscosidade em função do pH e da temperatura (FIGURA 18) verificou-se tendência de reposta semelhante para os dois produtores. A viscosidade aumentou com a diminuição da temperatura e aumento do pH em B. O efeito da temperatura sobre a viscosidade de um fluido difere notadamente segundo o estado físico (líquido ou gás). Nos líquidos como o leite, a viscosidade diminui com a elevação da temperatura enquanto a fluidez aumenta.

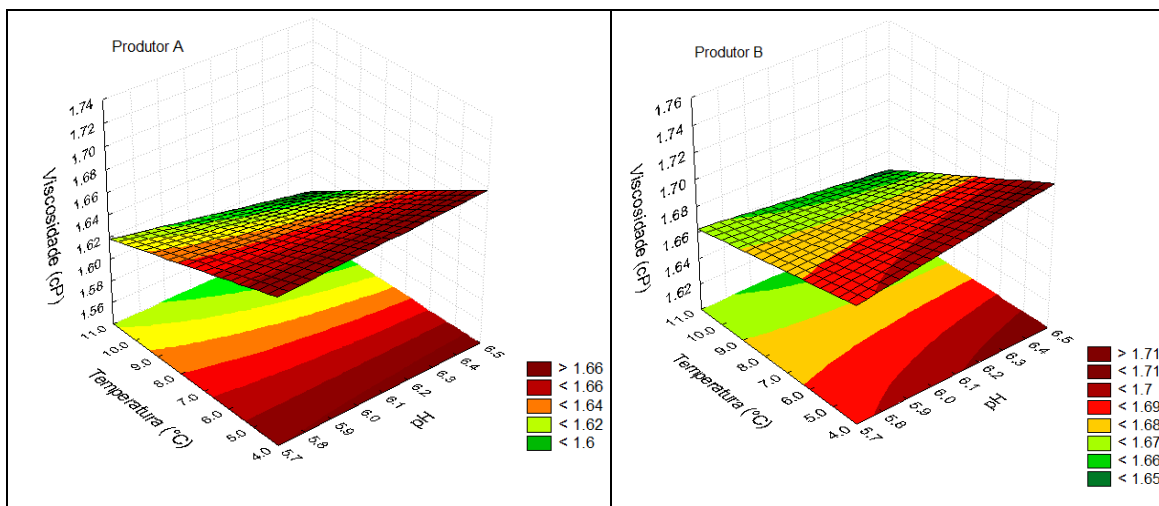


FIGURA 18- GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

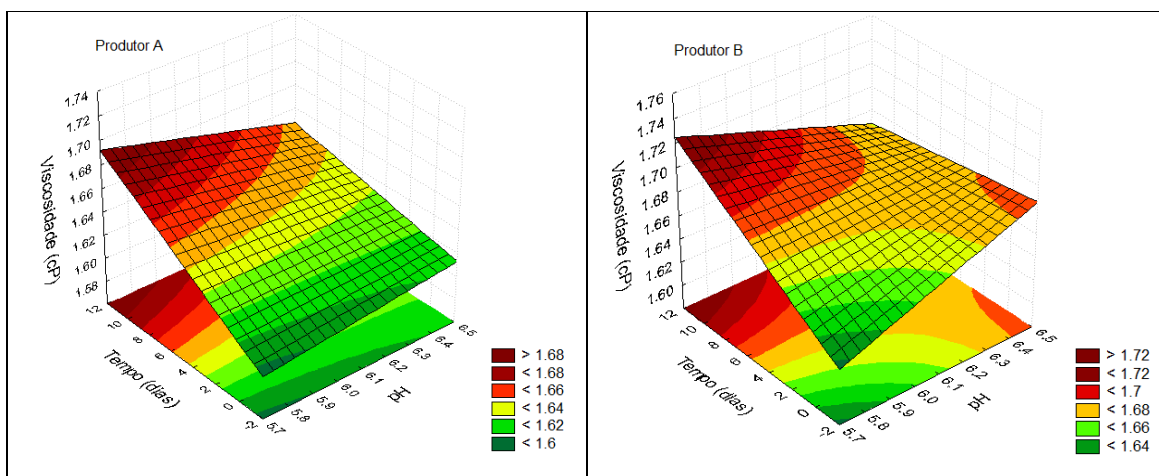


FIGURA 19- GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

Nos gráficos de superfície de resposta da viscosidade em função do pH e do tempo (FIGURA 19) verificou-se novamente tendência de resposta parecidas para os dois produtores. Valores elevados de viscosidade se concentraram em níveis de tempo elevado e pH menor. A acidificação com CO_2 não causou precipitação das proteínas, pois a viscosidade foi baixa no tempo inicial. O aumento da viscosidade durante o armazenamento refrigerado pode estar relacionado com a ação de proteases de origem psicrotrofica que atuaram sobre as frações da caseína e deram início ao processo de gelificação.

Na FIGURA 20 encontram-se os gráficos de superfície de resposta da viscosidade em função do tempo e da temperatura em pH 6,1. Pode-se verificar que

a viscosidade aumentou com o tempo e com a diminuição da temperatura. Como já constatado na TABELA 18, graficamente também foi possível observar o efeito significativo das variáveis tempo e temperatura.

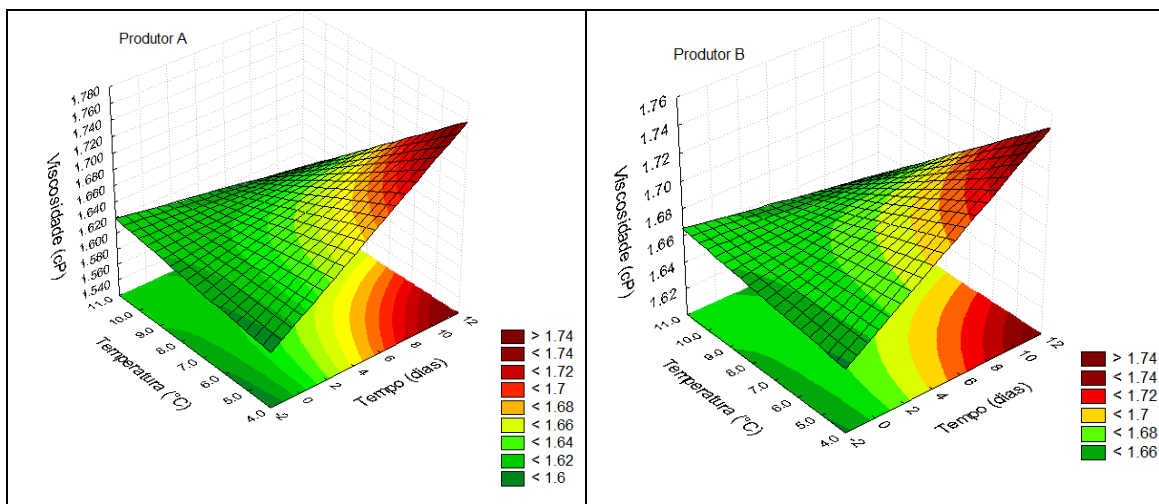


FIGURA 20– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

Poucos trabalhos discutem a variação da viscosidade em leite cru tratado com CO₂. No entanto estudos empregando o leite UHT indicam que há um aumento considerável na viscosidade durante o período de estocagem (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005; MELO JUNIOR, 2005). Estes autores enfatizam que o aumento da viscosidade é decorrente da atividade de enzimas extracelulares e termorresistentes, particularmente lipases e proteases, produzidas por bactérias psicrotróficas contaminantes do leite antes do processamento térmico. Assim sendo, pode-se considerar que a viscosidade está diretamente ligada com a contagem inicial de bactérias psicrotróficas do leite.

4.7.2 Superfície de resposta para turbidez

Para o leite dos dois produtores, verificou-se efeito significativo de todos os fatores, de interação de segunda e terceira ordem. Apenas para A o efeito do pH não foi significativo (TABELA 19).

TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA E ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA TURBIDEZ

| Fator | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F | p-valor | Efeitos |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------|-----------------|
| Produtor A | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 3692,1* |
| pH (1) | 3186,7 | 1 | 3186,7 | 5,4803 | 0,1440 | -39,917 |
| Tempo (2) | 208981,1 | 1 | 208981,1 | 359,394 | 0,0027* | 323,25* |
| Temperatura (3) | 66066,1 | 1 | 66066,1 | 113,616 | 0,0086* | 181,17* |
| 1 x 2 | 18721,1 | 1 | 18721,1 | 32,1956 | 0,0296* | 96,75* |
| 1 x 3 | 24901,7 | 1 | 24901,7 | 42,8245 | 0,0225* | 111,58* |
| 2 x 3 | 66066,1 | 1 | 66066,1 | 113,616 | 0,0086* | 181,75* |
| 1 x 2 x 3 | 24901,7 | 1 | 24901,7 | 42,8245 | 0,0225* | 111,58* |
| Falta de ajuste | 3680,1 | 1 | 3680,1 | 6,3288 | 0,1282 | |
| Erro puro | 1163,0 | 2 | 581,5 | | | |
| Total | 417667,6 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,9884$ |
| Produtor B | | | | | | |
| Média/Inter. | | | | | | 3740* |
| pH (1) | 501,39 | 1 | 501,39 | 135,375 | 0,0073* | -15,833* |
| Tempo (2) | 36901,39 | 1 | 36901,39 | 9963,37 | 0,0001* | 135,833* |
| Temperatura (3) | 1512,50 | 1 | 1512,50 | 408,375 | 0,0024* | 27,5* |
| 1 x 2 | 734,72 | 1 | 734,72 | 198,375 | 0,0050* | -19,167* |
| 1 x 3 | 2112,50 | 1 | 2112,50 | 570,375 | 0,0017* | 32,5* |
| 2 x 3 | 1512,50 | 1 | 1512,50 | 408,375 | 0,0024* | 27,5* |
| 1 x 2 x 3 | 2112,50 | 1 | 2112,50 | 570,375 | 0,0017* | 32,5* |
| Falta de ajuste | 31782,87 | 1 | 31782,87 | 8581,37 | 0,0001* | |
| Erro puro | 7,41 | 2 | 3,70 | | | |
| Total | 77177,78 | 10 | | | | |
| | | | | | | $R^2 = 0,58809$ |

NOTA: R^2 = coeficiente de determinação; * significativo em nível de 5% ($p < 0,05$)

A aplicação de modelos lineares de superfície de resposta foi adequada apenas para o produtor A, com 98,84% de explicação da variabilidade dos dados e falta de ajuste não significativa. A inadequação dos modelos para o produtor B se confirma pelo baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,58809$) e falta de ajuste significativo.

Na FIGURA 21 observou-se tendência de resposta semelhantes. Valores baixos de turbidez se encontraram em níveis de pH elevado e temperatura de armazenamento baixo. Este fato confirma os dados da TABELA 17, conforme

adicionou-se mais CO₂, maior foi a redução do pH e maiores os valores de turbidez obtidos. A acidificação até pH 5,9 causa dissociação de 40 – 50% dos minerais da micela. Simultaneamente, uma ligeira solubilização da caseína e diminuição na solvatação da micela são observados (JAUBERT *et al.*, 1999) e esses fatores podem estar envolvidos com a elevação da turbidez do leite acidificado.

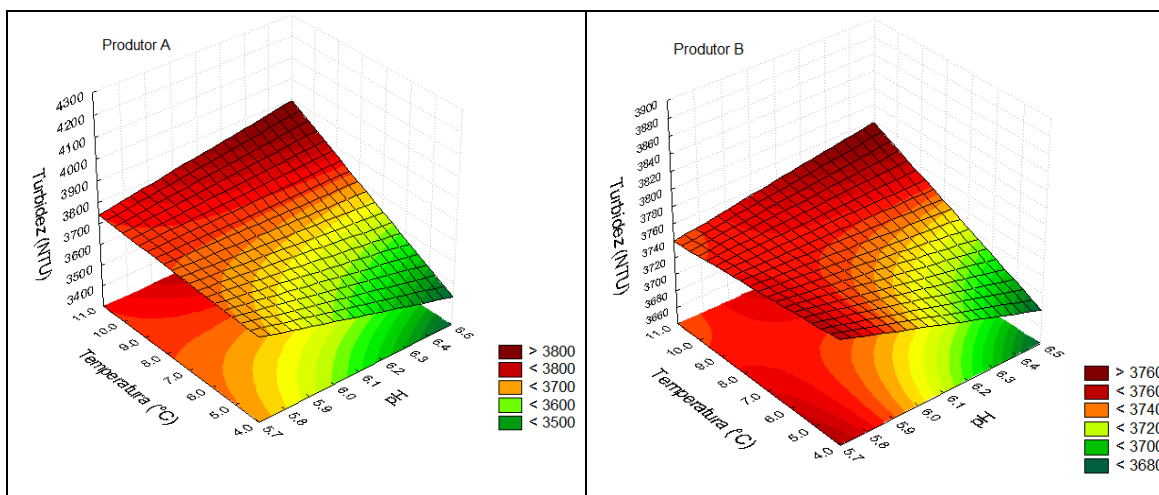


FIGURA 21– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO pH E TEMPERATURA EM TEMPO DE 5 DIAS

Ao plotar a turbidez em função do pH e do tempo (FIGURA 22) observou-se que a turbidez aumentou consideravelmente no decorrer do armazenamento. Para o produtor B não constatou-se influência do pH na região de baixa turbidez.

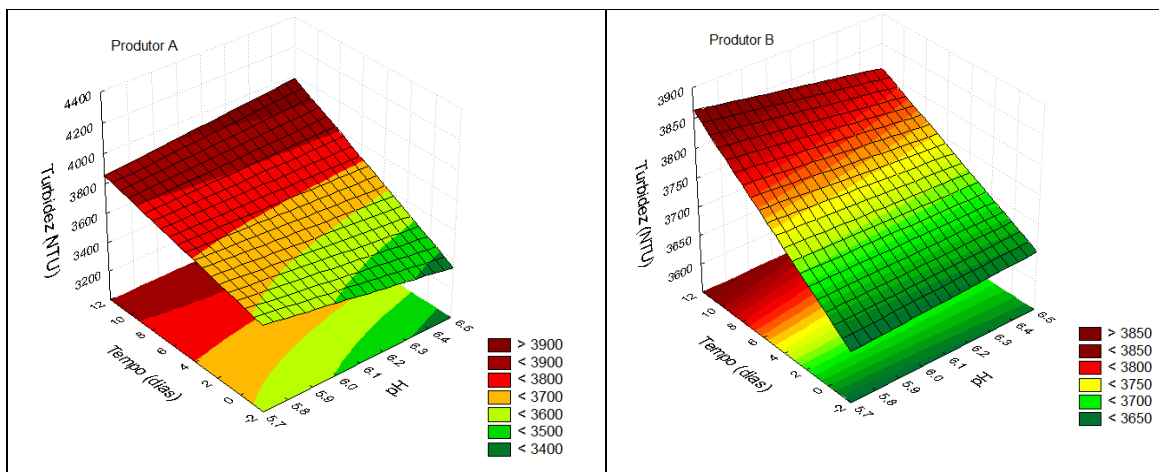


FIGURA 22– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO EM TEMPERATURA DE 7,5°C

Na FIGURA 23 foi possível observar o efeito significativo, no sentido de aumentar a turbidez, da variável tempo. Para o produtor A verificou-se claramente o efeito de interação entre as duas variáveis, no entanto para o produtor B a temperatura começou a ter efeito a partir o quarto dia. O aumento da turbidez ocorreu devido ao processo de agregação das micelas de caseína (KRUIF, 1993)

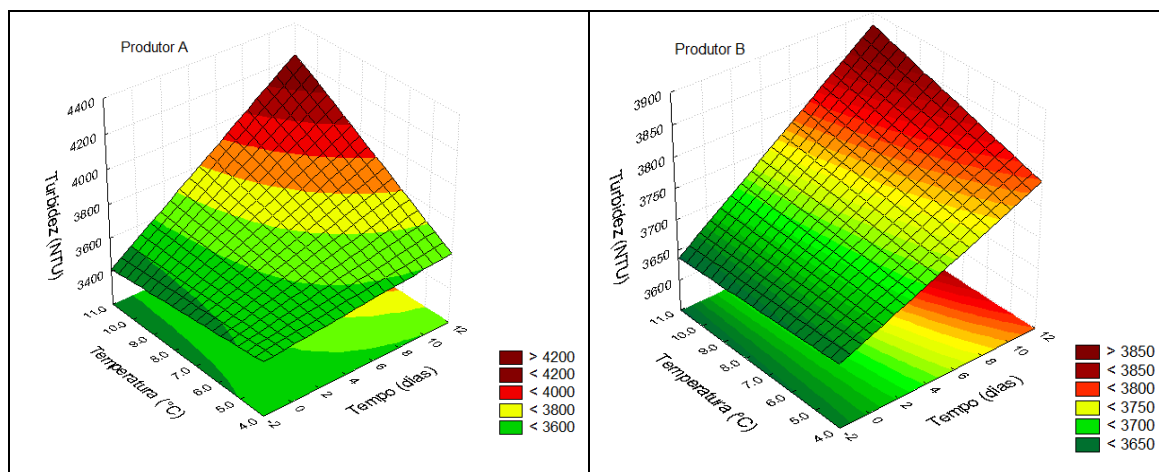


FIGURA 23– GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA TURBIDEZ EM FUNÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA EM pH 6,1

5 CONCLUSÕES

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

- A caracterização físico-química do leite variou de produtor para produtor, com exceção da densidade;
- Para todos os microrganismos pesquisados, o CO₂ não mostrou efeito inibitório logo ao ser adicionado ao leite;
- Após 10 dias de armazenamento, as condições experimentais com pH 5,8 e temperatura de armazenamento de 5°C foram mais eficientes na inibição do crescimento de todos os microrganismos avaliados neste trabalho;
- A viscosidade do leite acidificado com CO₂ aumentou durante a estocagem refrigerada e a alteração pode estar relacionada com a presença de psicotróficos e produção de proteases;
- A acidificação com CO₂ influenciou na turbidez no sentido de aumentá-la e constatou-se também a sua elevação no decorrer do armazenamento refrigerado;
- A utilização da acidificação do leite cru com CO₂, em escala laboratorial, foi eficiente na inibição do crescimento dos microrganismos estudados.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As condições empregadas neste trabalho mostraram que a acidificação com CO_2 é uma tecnologia eficiente para inibir o crescimento de microrganismos, principalmente os psicrotróficos presentes no leite cru. Muitas pesquisas ainda podem ser feitas no sentido de melhorar a viabilidade deste processo e para finalizar este trabalho deixam-se algumas sugestões:

- Avaliar outros parâmetros a fim de buscar a otimização do processo;
- Buscar um melhor controle da vazão de CO_2 e medir a quantidade de CO_2 que é solubilizado no leite;
- Analisar a viabilidade deste processo em escala piloto e industrial;
- Trabalhar em altas pressões e em sistema fechado para evitar a perda excessiva de CO_2 e aumentar a solubilidade do gás;
- Pesquisar a influência sobre outros microrganismos e componentes físico-químicos do leite
- Verificar o efeito da acidificação sobre a produção de derivados lácteos;
- Realizar a análise sensorial do leite e derivados para verificar se há sabor residual.

REFERÊNCIAS

AAKU, E. N.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A.; MPUCHANE, S. Microbiological quality of milk from two processing plants in Botswana. **Food Control**, v. 15, p. 181-186, 2004.

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw milk with CO₂. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 200, p. 293-296, 1995.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing line. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 3, p. 509-519, 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3 ed., Campinas: Unicamp, 2007.

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 I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle do leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 8, 14 dez. 2006. Seção I.

BRUM, J. V. F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba – PR**. 129 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o *Statística***. Rio de Janeiro: E-papers, 2003.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 43 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A.; GRIFFITHS, 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.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIET, D. **Proteínas Alimentarias: Bioquímica-Propriedades funcionales - Valor nutritivo - Modificaciones químicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989, 346p.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganism. **Journal Dairy Research**, v. 64, p. 157-160, 1981.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganism in milk and dairy products: A review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 532-537, 1982.

CRAVEN, H.M.; MAC CAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage I: identification of types. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.47, p. 38-45, 1992.

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

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Protease of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research** v. 53, p. 139-177, 1986.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M.R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.568-572, 2006

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

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998.

FOX, P. F. The major constituents of milk. In: SMIT, G. **Dairy processing – Improving quality**. Boca Raton: CRC Press, p. 5-38, 2000

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: RICHARDSON, G.H. **Standards methods for the examination of dairy products**. 16 ed., p. 189-201, 1992.

FRANK, J.F. Milk and dairy products. In: DOYLE, P.; BEUCHAT, R.; MONTVILLE, J. **Food microbiology – Fundamentals and frontiers**, Washington, p.101-116, 1997.

GEVAUDAN, S.; LAGAUE, 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.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289-303, 1981.

GUILHAUME, C.; GASTALDI, E.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Rennet-induced gelation of calcium and phosphate supplemented skim milk subjected to CO₂ treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3209 – 3216, 2004.

GUIZANI, N. Postharvest handling of milk In: RAHMAN, M. S. **Handbook of food preservation**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 203-211.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 1260–1266, 2001.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. 148 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes***. 88 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2009.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; DEETH, H. C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n.1, p. 15-20, 2003.

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, p. 158–168, 2006.

HUHN, S; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J. M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar a plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 209, p.3-8, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4 ed, 2008. 1020 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal**. v. 34, 2006

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisas Trimestrais do Abate de Animais, do Leite, do Couro e da Produção de Ovos de Galinha**. versão internet. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1402&id_pagina=1>. Acesso em: 30/6/2009.

IZIDORO, T. B. **Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

JAUBERT, A.; DURIER, Ch.; KOBILINSKY, A.; MARTIN, P. Structural organization of the goat casein micelle: effect of the physico-chemical environment (pH, temperature, ion strength) on its mineral and protein composition. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 369-370, 1999.

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.

KRUIF, C. G. The turbidity of renneted skim milk. **Journal of colloid and interface science**, v. 156, p. 38-42, 1993.

KOHLMAN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of protease by psychrotrophic microorganism, **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 3275-3283, 1991.

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 45, p. 573-583, 1979.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 264-274, 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. Effect of temperature of CO₂ injection on the pH and freezing point of milks and creams. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1578-1589, 2003.

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.

MAPA. **O setor produtivo de leite e derivados**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 11/11/2009.

MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R.T. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk inoculated with selected *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, v.51, n. 4, p. 227-282, 1998.

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.

MATTOS, M. R. **Qualidade do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra Salmonella enteritidis e Staphylococcus aureus**. 52 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, 2008.

MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicrótróficos na sedimentação e gelificação do leite UHT**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, 2005.

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, 1996.

MOURA, A. C. S. **Caracterização da qualidade do leite cru refrigerado produzido em municípios do estado de Alagoas**, Brasil. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

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

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6628-6634, 2002.

NÖRNBERG, M. 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.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artimed, 2005.

PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic Pseudomonas. **Journal of Food Protection**, v.46, p.90-94, 1983.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA Jr., L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de fora: EPAMIG, 2001, 234 p.

PINTO, C. L. 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.

RAJAGOPAL, M.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Low pressure CO₂ storage of raw milk: microbiological effects. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3130-3138, 2005.

RAOUCHE, S.; DOBENESQUE, M.; BOT, A.; LAGAUDE, A.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Stability of casein micelle subjected to CO₂ reversible acidification: Impact of holding time and chilled storage. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 873–880, 2007.

RAOUCHE, S.; DOBENESQUE, M.; BOT, A.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Stability of casein micelles subjected to CO₂ reversible acidification: Impact of carbonation temperature and chilled storage time. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 221-227, 2008

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.

RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005

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.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; DELLANO, D. G.; REYES-GAVILÁN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study, **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 502–508, 1996.

RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A. F.; BADA-GANCEDO, J.; REYES-GAVILÁN, C. G. 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.; FONSECA, L. F. L. 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.; FONSECA, L. F. L. Composição e propriedades físico-químicas do leite. **Curso on-line sobre monitoramento da qualidade do leite**, módulo 1. Instituto Fernando Costa – Milkpoint, 2002.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v.19, p. 12-15, 2003.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**. v.49, p. 432–437, 1994.

SIERRA, I.; PRODONAV, M.; CALVO, M.; OLANO, A.; VIDAL-VALVERDE, C. Vitamin stability and growth of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk acidified with carbon dioxide, **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 12, p.1305–1310, 1996.

SILVA, P. D. L. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 3 ed, 2007. 552p.

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.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2008. 206p.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.698-704, 2005.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley and sons, 1984.

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

ZOCAL, R.; GOMES, A. T. Zoneamento da produção de leite no Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 53., Ribeirão Preto, 2005.