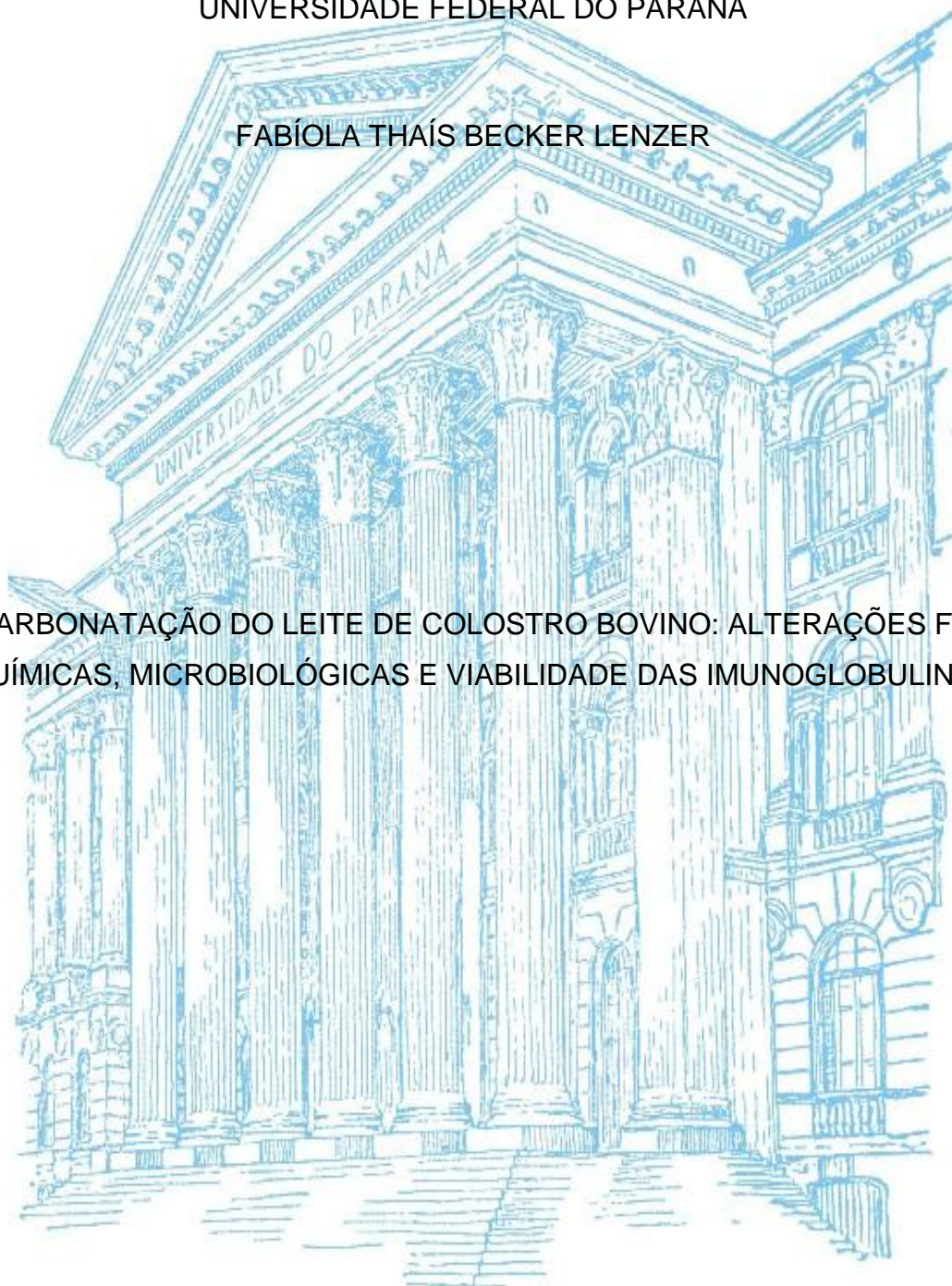


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIOLA THAÍS BECKER LENZER

CARBONATAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO: ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E VIABILIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS IgG



CURITIBA

2012

FABÍOLA THAÍS BECKER LENZER

CARBONATAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO: ALTERAÇÕES FÍSICO-
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E VIABILIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS IgG

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

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

CURITIBA

2012

Lenzer, Fabíola Thaís Becker

Carbonatação do leite de colostro bovino: alterações físico-químicas, microbiológicas e viabilidade das imunoglobulinas IgG / Fabíola Thaís Becker Lenzer – Curitiba, 2012.

75 f. il.; tabs.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Lucia Masson

Dissertação (Mestrado) – Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Inclui Bibliografia

1. Bovino de leite. 2. Colostro. 3. Imunologia. I. Masson, Maria Lucia. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 619.82

FABÍOLA THAÍS BECKER LENZER

**CARBONATAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO:
ALTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
VIABILIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS IgG..**

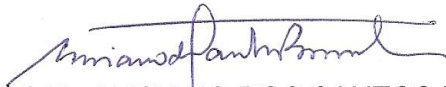
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



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



Dr. DANIEL GRANATO
Instituto Adolfo Lutz



Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR

Curitiba, 28 de agosto de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me incentivaram e acreditaram no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido por estar presente e me apoiando em todos os momentos e a minha filha que enche os meus dias de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus por fazer possível todos os meus sonhos e por me dar força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Geraldo (que ora por mim onde está) e Sirléa, que sempre foram exemplos de sabedoria, humildade e perseverança. Sem eles, nada disso seria possível.

Ao meu marido Maycon, que sempre me apoiou e me deu suporte sempre que precisei.

A minha linda filha Lívia, que fez a minha vida ser muito melhor.

Aos meus parentes que me ajudaram. Dayane e Marcos pelo auxílio nas traduções.

Aos meus amigos Ana Mery, André, Carolina, Roberta, Silvana, Kátia, Mariana, Janaína, Dayse, Milene, Bárbara, Ana Paula que me ajudaram de várias maneiras, sendo dando dicas valiosas ou desligando os equipamentos quando necessário.

A orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Masson pela sabedoria, suporte e incentivo.

Ao professor Deocy França que foi meu grande incentivador, sempre acreditando na minha capacidade e crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Welington Hartmann e a Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Beux pela participação da banca de qualificação e sugestões dadas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Bersot e Prof. Dr. Daniel Granato, pela participação na banca de defesa da dissertação.

A Lorena pela parceria no projeto e ajuda na montagem da linha de carbonatação.

A Caroline pelo grande auxílio em algumas análises e pelas trocas de informações que foram muito úteis para o meu trabalho.

A Maíke, Daniela e Paula pelo auxílio nas análises microbiológicas.

As estagiárias do CMETL Patrícia e Aline pelo auxílio no trabalho.

A UFPR e PPGEAL pela oportunidade.

Ao secretário Paulo pela competência e dedicação.

Ao técnico Marcelo e José pelo grande auxílio nas análises químicas.

Ao Prof. Dr. Papa Matar Ndiaye e a Prof^a. Dr^a. Arislete Dantas de Aquino por permitir o uso da linha de carbonatação.

A Fazenda da TUITI que concedeu as amostras do leite de colostro, especialmente a Eliane e ao Jair pela disponibilidade e boa vontade.

Ao CEPPA e ao Eriel pelo auxílio nas análises de proteína.

Ao REUNI pelo auxílio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente auxiliaram no meu trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

O leite de colostro bovino se destaca por suas propriedades nutricionais, terapêuticas e apresenta alta quantidade de imunoglobulinas, sendo uma fonte potencial de anticorpos aos humanos. O uso da carbonatação tem o intuito de inibir o crescimento microbiano do meio, com a possibilidade de aumentar o tempo útil do produto cru durante o armazenamento refrigerado. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da acidificação com CO₂ sobre as características físico-químicas como, pH, acidez titulável, densidade, gordura, proteínas, EST, ESD, cinzas, cálcio, viabilidade das imunoglobulinas IgG e contagem microbiológica de mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e *E.coli* do leite de colostro bovino após 48 horas do processo da carbonatação. O CO₂ foi adicionado ao leite de colostro bovino, em sistema aberto, sob pressão ambiente, à temperatura de 5°C até atingir os valores médios de pH 6,30 e 6,06. As análises foram realizadas em triplicata, exceto a imunodifusão radial simples e análises microbiológicas que foram realizadas em duplicata. Inicialmente os resultados foram checados quanto a Normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias entre as três amostras de leite de colostro bovino foi estudada pelo teste de Hartley. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) unifatorial e o teste de Fisher foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos. Imunoglobulinas da classe IgG, gordura, proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado, cinzas e cálcio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas após o processo de acidificação utilizado no trabalho. Os valores de pH se mostraram diferentes ($p < 0,05$) entre si, mostrando que a carbonatação foi eficiente na diminuição do pH do leite de colostro bovino. Acidez titulável teve seus valores iniciais aumentados nas amostras carbonatadas até pH extremo. Os micro-organismos mesófilos e *E.coli*, não foram afetados pelo processo da acidificação, 48 horas após o processo. Para os micro-organismos psicrotróficos e coliformes totais pesquisados as diferenças médias das contagens microbianas não foram estatisticamente significativas, porém analisando alíquotas isoladas nota-se redução na carga microbiana em diversas amostras carbonatadas até o pH extremo em comparação com as amostras *in natura* de leite de colostro.

Palavras-chave: Carbonatação, Acidificação, Leite de Colostro Bovino, Imunoglobulinas IgG, Micro-organismos.

ABSTRACT

The bovine milk colostrum stands out for its nutritional and therapeutic properties, and presents a high amount of immunoglobulins, being considered as a potential source of antibodies to human. The use of the carbonation is intended to inhibit microbial growth, with the possibility of increasing the useful life of the crude product during the refrigerated storage. This study aims to evaluate the effect of acidification with CO₂ on the physico-chemical characteristics such as pH, acidity, density, fat, protein, EST, ESD, ash, calcium, viability of IgG immunoglobulins and microbiological count of mesophilic, psychrotrophic, total coliforms and E.coli in the bovine milk colostrum after 48 hours of the carbonation process. The CO₂ was added to bovine milk colostrum in an open system under an ambient pressure, at a temperature of 5 ° C, until reach pH values of 6.30 and 6.06. Analyses were performed in triplicate, except the single radial immunodiffusion and microbiological analyzes that were performed in duplicate. Initially the results were checked as normality by the Kolmogorov-Smirnov's test and homogeneity of variances among the three milk samples from bovine colostrum was studied by Hartley's test. Statistically significant differences were evaluated by variance analysis (ANOVA) one-factor and Fisher's test was used to compare the averages between treatments. IgG immunoglobulins, fat, protein, total solids, nonfat dry, ash and calcium showed no statistically significant differences after the acidification process used at work. The pH values were different ($p < 0.05$) from each other, showing that carbonation was efficient in decreasing the pH of the milk from colostrum. Acidity had increased their initial values in the samples carbonated to pH extremes. Mesophilic microorganisms and E. coli, were not affected by the process of acidification, 48 hours after the procedure. For psychrotrophic micro-organisms and coliforms researched, the differences between average microbial counts were not statistically significant, but analyzing isolated aliquots were noted a reduction in microbial load in various carbonated samples to the extreme pH compared with fresh samples of milk colostrum.

Keywords: Carbonation, Acidification, Milk Bovine Colostrum, Immunoglobulins IgG, Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - ESTRUTURA BÁSICA EM Y DOS ANTICORPOS.....	21
FIGURA 02 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
FIGURA 03 - SISTEMA PARA CARBONATAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO COM DIÓXIDO DE CARBONO.....	36
FIGURA 04 - PICNÔMETROS COM CAPACIDADE DE 25 ML REPLETOS DE LEITE DE COLOSTRO.....	38
FIGURA 05 - BUTIRÔMETRO DE GERBER.....	39
FIGURA 06 - EQUIPAMENTO ORION 2 STAR PARA ANÁLISE DO CÁLCIO.....	41
FIGURA 07 - REAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO DILUÍDO EM PLACA MARCA VMRD.....	42
FIGURA 08 - REAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO DILUÍDO EM PLACA MARCA KENT	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - pH DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....47

TABELA 02 - ACIDEZ TITULÁVEL EM GRAUS DORNIC DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....49

TABELA 03 - DENSIDADE EM g/L DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....50

TABELA 04 - GORDURA EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....51

TABELA 05 - TEOR DE PROTEÍNA EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....52

TABELA 06 - EST EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....53

TABELA 07 - ESD EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....54

TABELA 08 - CINZAS DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....55

TABELA 09 - CÁLCIO EM g/L DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....56

TABELA 10 - IMUNOGLOBULINAS IGG EM MG/DL DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*,CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....57

TABELA 11- CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS EM LOG UFC.mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*,CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....59

TABELA 12 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS EM LOG UFC· mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*,CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....61

TABELA 13 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS COLIFORMES TOTAIS EM LOG UFC· mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*,CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....63

TABELA 14 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS *E.COLI* EM UFC/ML DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*,CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....64

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 – COMPOSIÇÃO DO LEITE E LEITE DE COLOSTRO.....19

QUADRO 02- VALORES DOS COMPONENTES DO LEITE DE COLOSTRO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....45

QUADRO 03 - VALORES DOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS EM LOG UFC.mL ENCONTRADOS NO LEITE DE COLOSTRO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06).....45

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂ – Gás carbônico

DBO – Demanda biológica de oxigênio

ESD – Extrato seco desengordurado

EST – Extrato seco total

EUA – Estados Unidos da América

IgA – Imunoglobulina da classe A

IgG – Imunoglobulinas da classe G

IgM – imunoglobulina da classe M

Igs- Imunoglobulinas

MG/DL – miligramas por decilitro

MG/L - Miligramas por litro

N₂ – Nitrogênio

ONU – Organização das Nações Unidas

UFC/mL- Unidades formadoras de colônias por mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 LEITE DE COLOSTRO BOVINO	18
2.2 IMUNOGLOBULINAS	20
2.3 QUALIDADE DO LEITE DE COLOSTRO.....	22
2.4 ARMAZENAMENTO E TRATAMENTO DO LEITE DE COLOSTRO	24
2.5 ACIDIFICAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO COM DIÓXIDO DE CARBONO	27
2.6 TÉCNICA IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES	28
2.7 MICRO-ORGANISMOS NO LEITE DE COLOSTRO BOVINO	29
2.7.1 Mesófilos.....	30
2.7.2 Psicrotróficos.....	30
2.7.3 Coliformes totais	31
2.7.4 <i>Escherichia coli</i>	31
2.8 CONSUMO HUMANO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 MATERIAL	33
3.1.1 Leite de Colostro Bovino	33
3.1.2 Dióxido de Carbono.....	34
3.2 MÉTODOS.....	34
3.2.1 Acidificação do leite de colostro bovino com dióxido de carbono.....	35
3.2.2 Análises Físico-Químicas.....	37
3.2.2.1 pH	37
3.2.2.2 Acidez Titulável.....	37
3.2.2.3 Densidade	38
3.2.2.4 Gordura.....	39
3.2.2.5 Extrato Seco Total (EST)	39
3.2.2.6. Extrato Seco Desengordurado (ESD).....	40
3.2.2.7 Nitrogênio Total (Proteína)	40
3.2.2.8 Cinzas	40

3.2.2.9 Cálcio	41
3.2.3 Imunodifusão Radial Simples	42
3.2.4 Análises Microbiológicas	43
3.2.4.1 Contagem total de mesófilos	43
3.2.4.2 Contagem total de psicrotróficos	43
3.2.4.3 Contagem total de coliformes totais	44
3.2.4.4 Contagem de <i>Escherichia coli</i>	44
3.3 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1.1 pH.....	46
4.1.2 Acidez titulável	48
4.1.3 Densidade.....	50
4.1.4 Gordura	51
4.1.5 Proteína.....	52
4.1.6 Extrato Seco Total (EST)	53
4.1.7 Extrato Seco Desengordurado (ESD)	53
4.1.8 Cinzas.....	54
4.1.9 Cálcio.....	55
4.1.10 Imunoglobulinas IgG	56
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	58
4.2.1 Contagem Mesófilos	58
4.2.2 Contagem Psicrotróficos	60
4.2.3 Contagem Coliformes Totais	62
4.2.4 Contagem <i>E. coli</i>	63
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Em 2010 o rebanho bovino brasileiro era constituído por 209,5 milhões de animais. Destes, 22,9 milhões eram vacas destinadas à produção de leite, que totalizaram um volume de 30,7 bilhões de leite produzidos (IBGE, 2010).

A produção brasileira de leite, em relação ao *ranking* mundial, em 2011 estava na quinta posição, atrás da União Européia, EUA, Índia e Rússia (USDA, 2011).

A produção do leite de colostro aumentou devido à expansão da bovinocultura, em particular, tecnologias empregadas para a produção acelerada de bezerros. Devido ao fato do leite de colostro não ser normalmente consumido pelos humanos, o excesso da produção é descartado.

Uma vaca da raça holandesa produz em média 15 litros de leite de colostro, na primeira ordenha após o parto, enquanto o bezerro consome em média 3 litros do alimento na primeira mamada, sobrando 12 litros que podem ser usados para outros fins (SANTOS *et al*, 2002). Para muitos produtores, o excesso era considerado “leite sujo” sendo descartado de maneira incorreta, tornando-se um potencial poluente. O impacto ambiental deste produto reflete um grande problema, pois apresenta valores estimados de DBO de 100.000 mg/L, enquanto o chorume possui 1.930 mg/L (ENEAPAI, 2005).

De acordo com a ONU (2011), a população mundial já chegou aos 7 bilhões de pessoas e em 2050 superará 9,2 bilhões. Um indicativo importante para que não haja desperdícios de alimentos e que todo e qualquer tipo de mantimento deve ser aproveitado, de maneira a suprir necessidades da população.

O leite de colostro bovino, através de estudos vem se destacando por suas propriedades nutricionais e terapêuticas, possui uma alta quantidade de imunoglobulinas, que podem se constituírem uma fonte de anticorpos aos humanos. Por esta razão e o volume crescente de descarte, vem se tornando alto potencial no desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos e farmacêutica.

Em alguns países, como Nova Zelândia, Austrália e China, o leite de colostro bovino tem sido utilizado como suplemento alimentar para seres humanos. Crianças e adultos imunocomprometidos também estão utilizando-o para o tratamento e prevenção de infecções entéricas por vírus e bactérias patogênicas (HE, *et al.* 2001).

A tecnologia proposta neste trabalho é a acidificação do leite de colostro bovino através da técnica da carbonatação, com o intuito de estabilizá-lo físico-química e microbiologicamente, mantendo a máxima atividade da imunoglobulina, tornando o produto mais eficaz em suas aplicações. O uso da carbonatação tem o intuito de inibir o crescimento microbiano do meio, com a possibilidade de aumentar o tempo útil do produto cru durante o armazenamento refrigerado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento do leite de colostro bovino após a acidificação pelo uso de dióxido de carbono sobre as características físico-químicas, microbiológicas e a viabilidade das imunoglobulinas IgG.

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar a viabilidade das imunoglobulinas IgG antes e após processo.

Realizar análises físico-química: pH, acidez titulável, densidade, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, nitrogênio total (proteína), cinzas e cálcio antes e após o processo de carbonatação.

Realizar análises microbiológicas: contagem total de mesófilos, contagem total de psicrótróficos, coliformes totais e contagem de *Escherichia coli* antes e após o processo de carbonatação.

Avaliar a influência das variáveis de pH sobre os aspectos microbiológicos e físico-químicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE DE COLOSTRO BOVINO

Leite de colostro é definido como a secreção da glândula mamária de mamíferos durante os primeiros dias após o parto. Na indústria de laticínios, leite de colostro é referido como secreções do úbere da vaca para um dia após o parto, após o segundo e terceiro dia é chamado de leite de transição (BOVINE ALLIANCE, 1998). De acordo com o artigo 479 da RIISPOA entende-se por leite de colostro o produto da ordenha obtido após o parto e enquanto estiverem presentes os elementos que o caracterizem (BRASIL, 1993).

Colostro bovino também pode se definir por ser uma secreção grossa, amarelada e cremosa, coletada do úbere da vaca logo após o nascimento do bezerro. Apenas a primeira secreção coletada após o parto, deve ser considerada leite de colostro, pois da segunda a oitava ordenha, o leite de colostro se assemelha gradualmente ao leite integral, perdendo seu valor nutritivo inicial (WATTIAUX, 1994).

Segundo Santos *et al.* (2002), o leite de colostro bovino consiste em uma mistura de secreções lácteas e constituintes do soro sanguíneo, como imunoglobulinas e outras proteínas séricas, que acumulam-se na glândula mamária durante o período final de gestação. Do ponto de vista da qualidade de anticorpos, o produto da primeira ordenha após o parto é verdadeiramente denominada de colostro.

De acordo com Wattiaux (1994), a função do leite de colostro é fornecer anticorpos aos bovinos recém nascidos, como fonte de proteção contra inúmeras doenças. A média de anticorpos encontrada no colostro bovino é de 6%, com valores que variam de 2% a 23%. No leite a concentração de anticorpos é de 0,1%, como se observa no quadro 01.

Componentes	Número da Ordenha					
	1	2	3	4	5	11
	Colostro	Leite transição				Leite Integral
Sólidos totais, %	23,9	17,9	14,1	13,9	13,6	12,5
Gordura, %	6,7	5,4	3,9	3,7	3,5	3,2
Proteína*, %	14	8,4	5,1	4,2	4,1	3,2
Anticorpos, %	6,0	4,2	2,4	0,2	0,1	0,09
Lactose, %	2,7	3,9	4,4	4,6	4,7	4,9
Minerais, %	1,11	0,95	0,87	0,82	0,81	0,74
Vitamina A, ug/dl	295		113		74	34

* Inclui percentagem de anticorpos indicados na próxima linha

QUADRO 01 – COMPOSIÇÃO DO LEITE E LEITE DE COLOSTRO

FONTE: Wattiaux, M.A. Essências em gado de leite. 1994.

O leite de colostro difere-se do leite comum em muitos aspectos. É significativamente maior nos sólidos, proteínas, gordura, vitaminas e Ig, e menor teor de lactose. Após o primeiro dia, a quantidade de sólidos decresce rapidamente, para que no quarto dia pós parto, o leite praticamente chegue a sua composição normal (BOVINE ALLIANCE, 1998).

No leite de colostro bovino pode-se encontrar certas proteínas como lactoferrina, fosfatase alcalina, lisozima, entre outras. A lactoferrina tem uma elevada afinidade pelo ferro e juntamente com o sistema lactoperoxidase do leite de colostro, contribuem na prevenção das infecções orais e digesto-intestinais do bezerro (SANTOS, 2002).

Os bezerros necessitam consumir esse alimento imediatamente após o parto. O leite de colostro é fundamental para a defesa do bezerro contra bactérias, vírus e outros patógenos, já que eles não estão presentes na circulação sanguínea do recém-nascido, pois a placenta do bovino impede a transferência de anticorpos da mãe para o feto (SILPER & COELHO, 2008).

2.2 IMUNOGLOBULINAS

Todos os vertebrados possuem um conjunto coordenado de interações entre classe de proteínas que agem contra invasores (bactérias, vírus, entre outros) conhecido como sistema imune (LEHNINGER, *et al.* 2006).

Uma variedade de leucócitos, macrófagos e linfócitos, produzidos a partir de células-tronco não diferenciadas da medula óssea, realizam a resposta imune que consiste de dois sistemas complementares, os sistemas imune celular e humoral (LEHNINGER, *et al.* 2006).

O sistema imune celular é constituído pela classe de linfócitos T que tem como função destruir as células hospedeiras infectadas por vírus, parasitas e tecido estranho. Já o sistema imune humoral direcionado às infecções bacterianas e vírus extracelulares é composto por proteínas solúveis chamadas de imunoglobulinas ou anticorpos, comumente abreviadas por Ig. Produzidos pelos linfócitos B, os anticorpos ligam-se a vírus, bactérias e corpos estranhos marcados para a destruição (LEHNINGER, *et al.* 2006).

No leite de colostro estão presentes três tipos de imunoglobulinas: IgG (70-80%), IgM (10-15%) e IgA (10-15%). A função principal do IgG é identificar e destruir possíveis patógenos. A IgM serve como defesa nos casos de infecções graves causadas por micro-organismos e a IgA protege as mucosas intestinais (TIZARD, 1998). As IgG são a classe Ig dominante no leite de colostro e possuem uma multiplicidade de funções, incluindo a opsonização, inibição da aderência de micro-organismos patogênicos, neutralização de toxinas e vírus, entre outras (MARNILA & KORHONEN, 2002).

As IgG têm peso molecular de 160.000 daltons e são constituídas de 4 cadeias de polipeptídeos (duas leves e duas pesadas). As IgM são imunoglobulinas mais pesadas (900.000 a 1.000.000 daltons) compostas de 4 cadeias, agrupadas de 5 em 5, constituindo uma molécula de 20 cadeias, com capacidade de aglutinar os glóbulos vermelhos e as bactérias. As IgA também são compostas de quatro cadeias de polipeptídeos e pesam 170.000 daltons (SANTOS, 2002).

A IgG é constituída de aproximadamente 1.328 resíduos de aminoácidos. As cadeias se ligam por ligações dissulfídicas. A molécula de IgG possui dois sítios de combinação específicos para o antígeno que induziu sua síntese (CALICH e VAZ, 2009).

As imunoglobulinas da classe G, são divididas em quatro subclasses, as quais possuem o seu ponto isoelétrico em pH: IgG₁ – 6,8 a 9,5, IgG₂ – 7,0, IgG₃ 8,2 a 9,0 e IgG₄ – 6,0 (SOUZA, 2008). De acordo com Bittar & Ferreira (2006), as imunoglobulinas IgG podem desnaturar se forem submetidas a temperaturas superiores a 60°C. As IgG se mostraram instáveis e suscetíveis à desnaturação quando incubadas a pH<4 ou >10 (CHEN & CHANG-MIN, 1998).

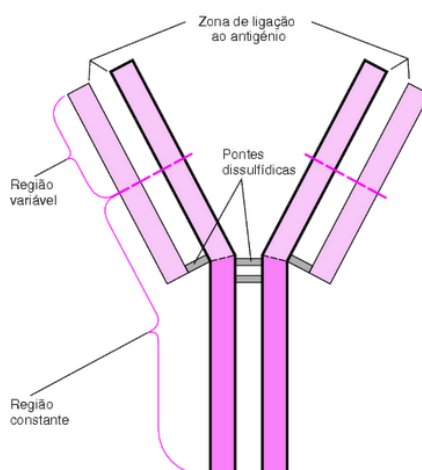


FIGURA 01 - ESTRUTURA BÁSICA EM Y DOS ANTICORPOS

FONTE: Science for Discover (2008).

Existem classes de imunoglobulinas, incluindo a IgG, que possuem uma pequena região protéica, rica em prolina e cisteína, conhecida como região de dobradiça, onde agem enzimas proteolíticas que clivam a molécula do anticorpo em fragmentos característicos. Embora os resíduos de prolina confirmem certa rigidez à molécula, a mesma não é totalmente inflexível. Ambos os braços do anticorpo podem abrir e fechar, chegando ao afastamento máximo de 180° (CALICH e VAZ, 2009).

A glândula mamária passa por diversos estágios de desenvolvimento, a mamogênese, colostrogênese, lactogênese, lactação e involução (BARRINGTON e PARRISH, 2001). Grandes quantidades de IgG sanguínea são transferidas para a glândula mamária, durante a colostrogênese, através de processo seletivo entre o lúmen alveolar e o epitélio mamário (LARSON *et al.*, 1980).

As imunoglobulinas são transportadas para o leite via sangue e vasos linfáticos do baço e linfonodos. Para o auxílio da síntese dos anticorpos no leite de colostro, linfócitos B podem se alojar na glândula mamária (SANTOS, 2006).

De acordo com pesquisa realizada por Gomes (2008), foram observados valores médios de 10.780; 413,8 e 625 mg/dL de IgG, IgA e IgM no leite de colostro da primeira ordenha colhidos de vacas da raça Holandesa. O leite de colostro bovino de primeira ordenha possui maiores teores de imunoglobulinas das classes G e M, em comparação com o de segunda ordenha. Há predomínio da IgG, sobre a IgM e IgA, independentemente da ordem da ordenha.

Muller e Ellinger (1981), encontraram valores relativos de 73,7% de IgG, 18,0% de IgA e 8,3% de IgM em leite de colostro de vacas da raça Holandesa criadas na Filadélfia, EUA.

Na maioria dos mamíferos domésticos, há predominância das imunoglobulinas IgG, representando entre 50 e 75% das proteínas do soro do colostro (SANTOS, 2002).

O pico máximo da absorção intestinal das proteínas é localizado no jejuno e íleo, as últimas porções do intestino delgado. A absorvência das imunoglobulinas é realizada através de um mecanismo chamado de micropinocitose. Os anticorpos atravessam a membrana das células epiteliais e caminham em direção à base das células. Através do canal linfático, ganham a circulação sanguínea (SANTOS, 2002). O leite de colostro bovino contém inibidores de tripsina para prevenir a degradação das imunoglobulinas no trato digestivo (KUNG *et al.*, 2003)

2.3 QUALIDADE DO LEITE DE COLOSTRO

A quantidade de imunoglobulinas presente no leite de colostro depende de inúmeros fatores, como estação do ano, idade da vaca, raça e volume de leite de colostro produzido. Em razão ao maior tempo de exposição, ao maior número de vacinações e contato com agentes patogênicos, as fêmeas mais velhas produzem leite de colostro de maior qualidade em comparação as mais novas (SILPER & COELHO, 2008). De acordo com pesquisa realizada por Morrill *et al.* (2012) para caracterizar a qualidade do leite de colostro bovino em fazendas nos EUA, a concentração de IgG aumentou com a paridade (42,4, 68,6, e 95.9mg/mL de IgG, para primeira, segunda e terceira lactação, respectivamente).

Ordenha pré-parto ou vazamento de leite do úbere antes do parto pode reduzir a concentração de imunoglobulinas no leite de colostro. O volume de leite de colostro produzido também influencia na quantidade de imunoglobulinas. Leite de colostro produzido em quantidades maiores possui menor concentração de imunoglobulinas em comparação com volumes menores (BOVINE ALLIANCE, 1998).

Se a ordenha dos animais for realizada continuamente até o momento da parição, o leite de colostro não apresentará grandes alterações em sua composição, exceto para um acréscimo no teor de proteínas de soro (PEIXOTO, 2002). A quantidade no teor de gordura varia de acordo com o estado nutricional da vaca no momento do parto (PEIXOTO, 2002).

Leite de colostro proveniente de vacas com mastite, que abortaram e aqueles que são obtidos 12 horas após o parto são de qualidade duvidosa, devendo ser evitados (SANTOS, 2002).

Um leite de colostro grosso e cremoso é rico em anticorpos, já quando se apresenta um aspecto aguado, provavelmente esse leite de colostro possui menor quantidade de imunoglobulinas (WATTIAUX, 1994).

Em muitas propriedades leiteiras a avaliação da qualidade do leite de colostro é realizada com um colostrômetro, que mede a densidade e relaciona com a concentração de imunoglobulinas G (IgG). A medição também pode ser realizada pelo lactodensímetro, que avalia a densidade do leite, neste caso são utilizados os seguintes parâmetros: acima de 1.047 g/L, colostro de alta qualidade, de 1.035 a

1.046 g/L colostro intermediário e até 1.034 g/L, colostro ruim (SILPER & COELHO, 2008). De acordo com Lucci (1989), a concentração normal de imunoglobulinas presente no leite de colostro deve estar entre 2800 a 10000 mg/100ml.

Não se conhece muito a respeito dos valores de referência das classes de imunoglobulinas encontradas no leite de colostro de vacas da raça Holandesa criadas no Brasil, pois os padrões são influenciados pela idade, ordem da ordenha, manejo sanitário, fator racial, nutrição e adaptação climática no país (GOMES, 2008).

As secreções lácteas dos bovinos podem possuir anticorpos específicos aumentados através da hiperimunização dos animais, utilizando vacinas contendo material microbiano patogênico inativado, contra as quais as atividades das IgGs são desejadas. Este aumento pode ser ainda maior se o leite de colostro bovino hiperimunizado for fracionado e concentrado através de técnicas específicas, podendo ser útil em aplicações na saúde humana e animal (MEHRA, *et al.*, 2006).

2.4 ARMAZENAMENTO E TRATAMENTO DO LEITE DE COLOSTRO

O leite de colostro pode ser armazenado sob refrigeração por até uma semana, após esse período a concentração de imunoglobulinas é diminuída. Também pode ser congelado por até um ano, sem decomposição significativa de anticorpos. Estudos indicaram que leite de colostro congelado armazenado por 15 anos não obteve deterioração significativa (BOVINE ALLIANCE, 1998).

O leite de colostro pode ser preservado congelado e descongelado sem que ocorra a destruição dos anticorpos. Para o descongelamento, deve-se usar banho-maria a temperatura de 45-50°C (WATTIAUX, 1994).

Pode-se armazenar o leite de colostro congelado por um longo tempo com pouca ou nenhuma diminuição da concentração das imunoglobulinas. Podem ocorrer perdas maiores em freezers *frost-free*, devido aos ciclos automáticos de

descongelamento. O congelamento destrói as células brancas do sangue, também conhecidas como leucócitos (LEADLEY e PAM, 2004).

Arguello *et al.*, (2003) realizaram um estudo sobre a conservação do leite de colostro caprino através de vários métodos. Primeiramente resfriaram o leite de colostro sob temperatura de refrigeração (4°C) por um período de três meses, ocorrendo uma pequena redução dos níveis de anticorpos no tempo final (32,98 e 25,11 mg / ml de IgG no dia 0 e 91, respectivamente). No segundo experimento, realizaram o congelamento e descongelamento da amostra, os quais não afetaram as concentrações das imunoglobulinas, porém a repetição do congelamento e descongelamento tende a reduzir os anticorpos. Por fim, testaram a pasteurização e observaram uma redução de aproximadamente 35% de perda nas IgG.

A pasteurização do leite de colostro bovino pode reduzir ou eliminar importantes patógenos como *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, porém pode ocorrer desnaturação de anticorpos, resultando em perdas de 12 a 30% das imunoglobulinas e aumento na viscosidade, se forem utilizados o mesmo tempo e temperatura recomendados para o leite (75°C/15-20s). Quando o leite de colostro é aquecido a aproximadamente a 63°C, o calor induz a agregação das imunoglobulinas, resultando numa desnaturação devido a exposição de aminoácidos sulfurados ou hidrofóbicos. (BITTAR & FERREIRA, 2006).

Green (2003) pasteurizou leite de colostro bovino a 63°C por 30 minutos, utilizando um pasteurizador comercial de pequena escala e observou um moderado aumento na viscosidade, no qual as amostras *in natura* apresentaram médias de 68,7 (\pm 17,8)mg/mL e as amostras pasteurizadas 48,9 (\pm 15,2) mg/mL de IgG, resultando numa perda de 25,3% (\pm 26,0).

Bittar e Ferreira (2006), concluíram que a pasteurização de leite de colostro bovino a 72°C por 15 segundos, resultou numa média de 28,4% de perda de IgG, com concentrações iniciais de IgG e pós pasteurização, entre 58,5 mg/mL e 41,3 mg/mL respectivamente. Apresentando 25,3% de perdas de imunoglobulinas da classe G após o tratamento utilizado. Porém o aquecimento do leite de colostro a 60°C por 120 minutos não resultou em mudanças nas concentrações de IgG ou na viscosidade.

Elfstrand *et al.* (2002) realizaram a filtração, pasteurização e liofilização no leite de colostro bovino e observaram que as imunoglobulinas decresceram gradualmente após a remoção de gordura, caseína e lactose, sendo que estes compostos parecem ter uma função de proteção em imunoglobulinas.

Isolamento e purificação das imunoglobulinas são realizados através de membranas de separação (STOTT & LUCAS, 1989) e técnicas cromatográficas (BOTTOMLEY, 1993), nas quais é possível uma taxa de recuperação de imunoglobulinas variando de 25 a 70% do valor inicial.

Diversos autores acidificaram o leite de colostro bovino com o intuito de permitir a armazenagem à temperatura ambiente e em longo prazo, sem que haja excessivo crescimento bacteriano. Os ácidos orgânicos mais utilizados para este fim são o ácido acético, adípico, benzoico, cítrico, fórmico, fumárico, málico e propiônico, porém para valores de pH próximos a 5,5 não se nota nenhum efeito nas contagens microbianas (SILVESTRE, 2009). De acordo com Rindsig *et al.* (1976) a adição de ácido propiônico a 1 e a 1,5% a 37°C no leite de colostro bovino inibiu o crescimento microbiano proteolítico até o sétimo dia de armazenamento e também conclui que é possível manter um pH constante, conservar o odor, a consistência física e o desenvolvimento de coliformes por até 4 semanas.

Silvestre (2009) acidificou leite de colostro bovino com peróxido de hidrogênio a 0,42 e 0,5% e verificou um efeito bacteriostático maior do que se tratado com 0,14 e 0,28%, porém é aconselhável a remoção total do peróxido de hidrogênio, a fim de evitar danos à saúde. O mesmo autor também tratou o leite de colostro bovino com água eletrolisada neutra, obtida por um processo eletroquímico através da transmissão de corrente elétrica, como por exemplo o hipoclorito de sódio e cloreto de sódio, que são desinfetantes e tem o intuito de penetrar nas membranas celulares dos micro-organismos e provocar a lise da célula, porém em razão da elevada carga de matéria orgânica presente nas amostras, não foi notório nenhum efeito bactericida sobre a contagem dos micro-organismos pesquisados.

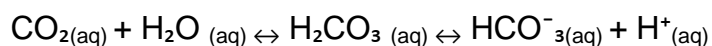
Mbuthia *et al.* (1997), testaram a acidificação com ácido fórmico e formaldeído sobre as imunoglobulinas do leite de colostro e constataram um efeito negativo sobre estas. Sendo a classe das imunoglobulinas IgG mais afetada em comparação com as IgM e IgA.

2.5 ACIDIFICAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO COM DIÓXIDO DE CARBONO

O dióxido de carbono, um composto químico constituído de dois átomos de oxigênio e um átomo de carbono, representado pela sigla CO₂, é essencial aos seres vivos, porém em alta quantidade se torna limitante no crescimento destes. Em razão disso, tem sido utilizado como conservador de alimentos inibindo o crescimento de bactérias aeróbias e retardando o crescimento de fungos, leveduras e bactérias aeróbias psicrófilas das superfícies dos alimentos por concentração de dióxido de carbono (EVANGELISTA, 2008).

O dióxido de carbono é um componente natural do leite, mas possui pequena quantidade dissolvida, que entre as etapas de ordenha, armazenamento e transporte é expressivamente diminuída em razão da exposição do leite ao ar, ao mesmo tempo em que aumentam as concentrações de oxigênio e nitrogênio dissolvido no leite. Acredita-se que com o leite de colostro ocorra da mesma maneira. O dióxido de carbono dissolvido pode estar presente tanto na forma ácida (ácido carbônico) como carbonato, contribuindo para a diminuição do pH do leite (HOTCHKISS, *et al.* 2006).

Segundo Hotchkiss *et al.* (2006), o resultado da diluição de dióxido de carbono em água é a formação do ácido carbônico (H₂CO₃). O CO₂ é instável, conservando um equilíbrio:



O CO₂ desloca o oxigênio do meio, substituindo-o. Desta maneira, ocorre uma limitação aos micro-organismos, deixando-os expostos a uma atmosfera anaeróbia ou microaeróbica. Quando o estudo foi realizado com N₂, o resultado não foi satisfatório (DANIELS *et al.*, 1985).

A carbonatação baseia-se na injeção de CO₂ sob pressão controlada para acidificar a amostra em questão. O leite, após degaseificação a vácuo, regressa ao seu pH inicial (RAOUCHE *et al.*, 2008)

Shirai (2010), demonstrou que ajustando o pH do leite bovino, através da carbonatação, em aproximadamente 6,0 melhorou substancialmente a estabilidade térmica quanto aos micro-organismos psicrotróficos.

De acordo com diversos autores, a carbonatação não altera a estabilidade das vitaminas, minerais, nem causam mudanças permanentes nas micelas, composição e tamanho médio das proteínas (RUAS, et al., 1998; GEVAUDAN, et al., 1996; GUILHAUME et al., 2004). Essa mudanças podem possuir diferentes magnitudes mais ou menos reversíveis de acordo com o pH utilizado na carbonatação (RAOUCHE et al., 2007)

O calor e extremos de pH podem desnaturar a proteína, fazendo-a perder sua função. Isso acontece, pois ocorre a perda de sua estrutura tridimensional. Solventes orgânicos miscíveis e certos solutos alteram a carga líquida das proteínas, ocasionando repulsão eletrostática e ruptura de algumas pontes de hidrogênio (LEHNINGER, *et al.* 2006).

Já a carbonatação do leite a baixa pressão, diminui o crescimento microbiano, sem provocar a precipitação da proteína (RAJAGOPAL et al., 2005)

2.6 TÉCNICA IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES

Trata-se de reações de precipitação em meio gelificado, muito sensível e de larga aplicação na quantificação de componentes protéicos de fluídos biológicos (CALICH e VAZ, 2009).

O gel é distribuído em uma lâmina ou placa de Petri onde é incorporado o anticorpo específico para determinado antígeno. São cavados pequenos poços, sendo alguns preenchidos com o antígeno de concentração conhecida e outros com concentração desconhecida. Ocorre a difusão radial a partir do poço, podendo-se verificar a opacificação circular ao redor do mesmo (CALICH e VAZ, 2009).

Para cada antígeno são utilizadas, no mínimo, três soluções padrão de alta pureza com concentrações diferentes. Após o término da difusão, a leitura é

realizada medindo os halos de precipitação dos padrões e dos desconhecidos. Uma reta é traçada ordenando as concentrações dos padrões contra o quadrado dos diâmetros dos halos de precipitação (CALICH e VAZ, 2009).

Soares *et al.* (2001), utilizaram a técnica de imunodifusão radial para determinar a concentração de imunoglobulinas da classe G no leite de colostro bovino de primeira ordenha de vacas holandesas e obtiveram resultados no valor de 154,83 mg/ml.

Gomes (2008), obteve valores da concentração de IgG no leite de colostro colhido antes da primeira e segunda ordenha, sendo respectivamente 10.078,0 e 6.591,0 mg/dL através da técnica de imunodifusão radial.

A maturidade linfocitária e a quantidade de imunoglobulinas produzida e liberada no leite de colostro são influenciadas pelo fator etário (DEVERY-PONCIUS e LARSON, 1983). A raça do animal também é um importante fator fisiológico relacionado à quantidade de anticorpos no leite de colostro (MULLER e ELLINGER, 1981)

2.7 MICRO-ORGANISMOS NO LEITE DE COLOSTRO BOVINO

O leite de colostro bovino, assim como o leite, pode se tornar um excelente meio de cultura para muitos micro-organismos, principalmente por conter nutrientes, umidade e pH próximo da neutralidade. As bactérias consomem a lactose e produzem o ácido lático. Higiene na ordenha e limpeza correta dos utensílios e equipamentos estão diretamente ligados com este tipo de contaminação (SANTOS, 2006).

De acordo com Hanson (2002), podem estar presentes no leite de colostro fresco cerca de 20.000 UFC/ml bactérias, incluindo a *E.coli*. A cada 20 minutos a contagem inicial dobra no leite de colostro morno. Se não for resfriado imediatamente, em duas horas a contagem pode chegar a 1,2 milhões de bactérias.

Em estudo realizado por Azevedo *et al.* (2009) com leite de colostro bovino fermentado, 96 placas foram incubadas com diversos meios de cultura, 51 apresentaram crescimento microbiano, nas quais estavam presentes *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.

2.7.1 Mesófilos

Amplamente estudados por serem responsáveis por processos de deterioração de alimentos e/ou por toxinfecções de origem alimentar.

Micro-organismos que se desenvolvem em aerobiose quando incubados a 35°C. Os tipos de bactérias não são diferenciados, avaliando apenas o aspecto bacteriológico da amostra, tornando a análise como indicativa da qualidade dos alimentos (LABORCLIN, 2010).

Refrigeração imediata após a coleta do leite inviabiliza o crescimento deste tipo de micro-organismo (SANTOS, 2006).

2.7.2 Psicotróficos

A microbiota psicotrófica é composta de diversas bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, entre outras e bactérias Gram positivas dos gêneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, etc. (PINTO *et al.*, 2006).

A contaminação do leite por bactérias psicotróficas pode ser decorrente de água contaminada, procedimentos de higiene inadequados e mastite (PINTO *et al.*, 2006).

Essas bactérias são termolábeis, entretanto pode ocorrer produção de enzimas termorresistentes, como as proteases e as lipases, que causam reações de deterioração, bem como prejudicam a qualidade sensorial do leite (SANTOS, 2006).

2.7.3 Coliformes totais

No grupo dos coliformes totais estão inclusas as bactérias na forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram negativos, não originam esporos, com capacidade de fermentar a lactose e produzir gás, período de incubação em 24 a 48 horas a 35°C. O grupo inclui mais de 20 espécies que podem ser provenientes do trato gastrointestinal ou não, como por exemplo, a *Serratia* e *Aeromonas* (SILVA *et al.*, 1997).

Podem estar presentes na lama, barro, esterco e em outros locais no ambiente. Desta forma quase sempre estão presentes no leite cru, não sendo muito diferente a situação do leite de colostro (SANTOS, 2006).

2.7.4 *Escherichia coli*

A *E.coli* faz parte do subgrupo dos coliformes termotolerantes, que fermentam a lactose a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ em 24 horas (CASTANHEIRA, 2010).

Dentro do grupo de coliformes fecais, a *Escherichia coli* é a bactéria mais conhecida e mais diferenciável dos membros não fecais, em razão disso é o melhor indicador de contaminação fecal até o instante (SILVA *et al.*, 1997).

2.8 CONSUMO HUMANO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO

O leite de colostro bovino é seguro para o consumo humano, exceto nos casos de intolerância à lactose ou outros componentes (URUAKPA *et al.*, 2002).

Produtos comerciais são preparados a partir de imunoglobulinas de leite de colostro bovino de vacas não vacinadas ou imunizadas, que depois de coletado é desengordurado, tratado e secado. Muitos produtos são pulverizados e liofilizados, tornando-se comprimidos ou na forma de pó, enquanto outros são transformados em xaropes. O primeiro líquido potável proveniente do leite de colostro bovino foi lançado na Finlândia (MEHRA, *et al.* 2006). Em Taiwan está sendo comercializado creme dental contendo imunoglobulinas, enquanto no Egito foi lançado um tipo de alimento para bebês enriquecido com leite de colostro bovino para crianças acima de seis meses de idade (ARCHIBALD, 2005).

Imunoglobulinas do leite de colostro bovino estão servindo como base para suplementos, utilizados no tratamento e prevenção de doenças diarréicas em humanos (HE *et al.*, 2001).

De acordo com Antonio *et al.* (2001), a suplementação com leite de colostro bovino em combinação com treinamento adequado pode aumentar a massa muscular magra de homens e mulheres ativas.

O leite de colostro bovino pode ser utilizado para o tratamento e prevenção de infecções do trato gastrointestinal dos humanos. Além de fornecer suporte imunológico, apresenta reparos nos tecidos músculo-esquelético de atletas, promovendo a cicatrização de feridas (URUAKPA *et al.*, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada (LACTA), nas instalações do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, localizados no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, na cidade de Curitiba-PR e no CMETL-PR, localizado na Fazenda Experimental do Canguiri/ UFPR em Pinhais-PR, no período de maio de 2011 a junho de 2012.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Leite de Colostro Bovino

O leite de colostro bovino foi coletado e posteriormente congelado na Fazenda Experimental Tuiuti Taquaral Queimado, localizada na região de São José dos Pinhais – PR.

Foram selecionados 15 animais sem histórico de doenças e mastite, todos da raça Holandesa. As vacas eram separadas e ordenhadas na ordenhadeira mecânica marca Westfalia. Antes de cada coleta foi realizada a limpeza dos tetos, pré-dipping com solução antisséptica, secagem dos tetos e pós-dipping para evitar maiores contaminações microbiológicas no leite de colostro.

A coleta do material foi realizada em frascos esterilizados, sendo 1,5 litros de leite de colostro de cada uma das 15 vacas. As amostras individuais foram mantidas em congelador com temperatura inferior a -20°C .

O transporte das amostras até o laboratório foi realizada sob refrigeração em caixas de isopor e os frascos foram cobertos com gelo.

3.1.2 Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono utilizado para acidificar o leite de colostro bovino foi adquirido da empresa White Martins, acondicionado na forma liquefeita em cilindro de aço, tipo G, com capacidade para 4,5 kg e pressão de vapor de 58,3 kgf cm⁻² a 21°C. O grau analítico de pureza deste gás foi de 99,99 % na fase líquida.

3.2 MÉTODOS

Após o descongelamento das amostras através do banho-maria (45-50°C), o material foi homogeneizado e retirada uma alíquota de 500 mL para a realização dos testes físico-químicos, microbiológicos e imunodifusão radial na amostra *in natura*.

O restante foi separado em duas amostras, contendo 500 mL cada e acidificada com dióxido de carbono chegando a dois valores de pH distintos, um o extremo (considerado pH C) e outro pH foi o intermediário (considerado pH B) . Após o processo, as amostras foram identificadas e submetidas às mesmas análises da amostra *in natura*, sempre mantidas sob refrigeração em temperaturas menores que 5°C. como observado na figura 02.

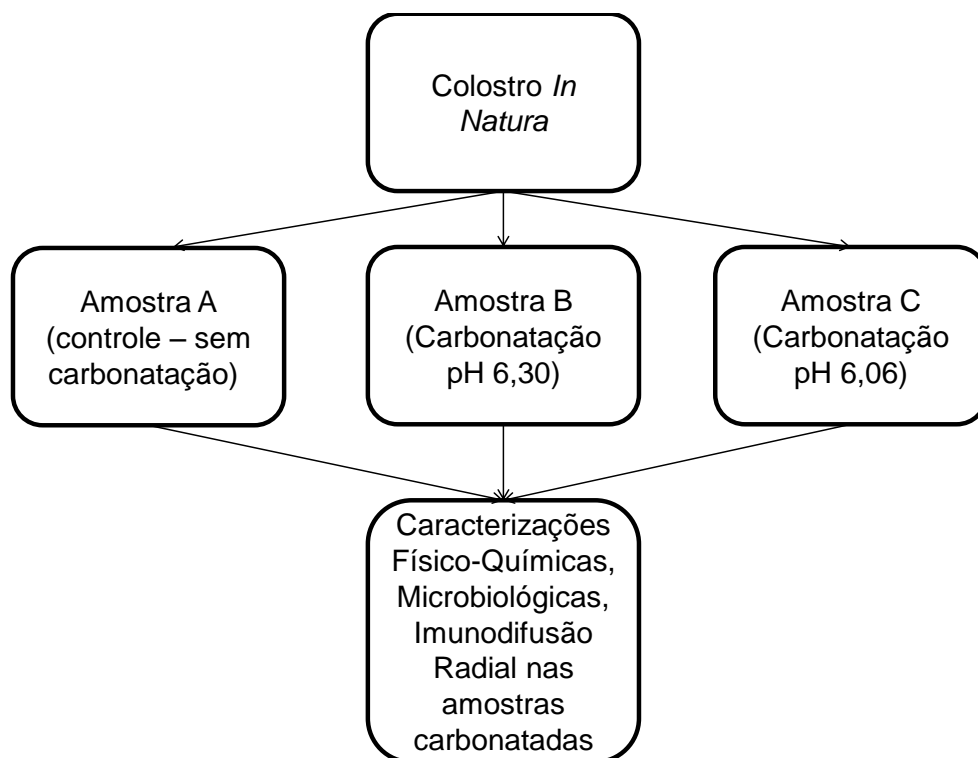


FIGURA 02- FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

FONTE: A autora (2012)

3.2.1 Acidificação do leite de colostro bovino com dióxido de carbono

Os 1.500 mL de leite de colostro de cada animal, foi dividido em três alíquotas de 500 ml cada. Sendo identificadas como amostra A - leite de colostro *in natura*, amostra B – leite de colostro pH intermediário e amostra C – leite de colostro pH extremo.

Foi utilizado o sistema empregado no trabalho de Hamerski (2009) para acidificação das amostras.

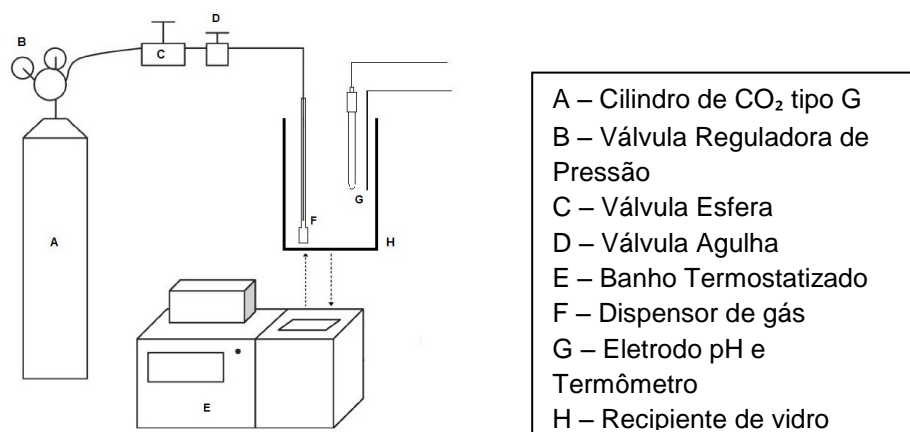


FIGURA 03 – SISTEMA PARA CARBONATAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO COM DIÓXIDO DE CARBONO

FONTE: Adaptado de HAMERSKI (2009).

O leite de colostro identificado como amostra C foi transferido para um recipiente de vidro com capacidade de 1.000 mL e imerso em um banho termostatizado (marca Tecnal, modelo TE 184) com temperatura de 5°C, escolhida por permitir maior solubilidade do gás no meio líquido e conservar a baixa contagem microbológica. A amostra C foi borbulhada através do dispensador de gás constituído na extremidade inferior de placa porosa com diâmetro médio de cada porosidade de 35 µm, aumentando o contato das bolhas de gás com a amostra, sempre com controle de pH verificado através do pHmetro portátil digital (marca Thermo Scientific, modelo Orion 2 Star), por aproximadamente 20 minutos, até alcançar o seu extremo de pH, quando não se observava mais nenhuma alteração no mesmo. Os valores mínimos de pH variaram de amostra para amostra, dependentes do seu pH inicial que também oscilaram de alíquota para alíquota.

Após a carbonatação da amostra C, procedia ao borbulhamento de gás carbônico na amostra B, até atingir o valor do pH intermediário, situado entre o pH inicial e o pH extremo alcançado.

As amostras *in natura* e carbonatadas foram acondicionadas em frascos autoclavados e foram mantidas sob refrigeração em temperatura média de 5°C.

A carbonatação ocorreu em sistema aberto, à pressão ambiente e as amostras não foram degaseificadas, com o intuito de estender a permanência do CO₂ na amostra.

3.2.2 Análises Físico-Químicas

3.2.2.1 pH

Medição eletrométrica da atividade iônica do hidrogênio (H⁺) em meio aquoso, utilizando o eletrodo padrão. O eletrodo mede a diferença de potencial entre ele e a solução testada, sendo a diferença convertida em unidade de pH (CASTANHEIRA, 2010).

A medição da concentração dos íons de hidrogênio das amostras foi realizada através de um pHmetro digital portátil modelo Orion 2 Star da marca Thermo Scientific devidamente calibrado com tampões pH 4,0 e 7,0.

3.2.2.2 Acidez Titulável

Avaliação do teor de compostos de caráter ácido, sob o ponto de vista quantitativo.

Determinação da acidez através da titulação da amostra por uma solução alcalina, utilizando a fenolftaleína como indicador.

A acidez foi determinada através do método analítico oficial, para controle de leite e derivados (BRASIL, 2006)

3.2.2.3 Densidade

Verificação da relação massa (g)/ volume(L) do leite de colostro, através da utilização de picnômetros com capacidade para 25 mL de amostra. As amostras eram mantidas sob 20°C e monitoradas com termômetro de mercúrio.

A densidade foi determinada através da metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz para mensurar a densidade de líquidos a 20°C (IAL, 2008).



FIGURA 04- PICNÔMETROS COM CAPACIDADE DE 25 ML REPLETOS DE LEITE DE COLOSTRO
FONTE: A autora (2012)

3.2.2.4 Gordura

Determinada através do método butirométrico, técnica de Gerber, no qual a leitura é realizada na escala do butirômetro, após a centrifugação e imersão em banho-maria (BRASIL, 2006).



FIGURA 05 - BUTIRÔMETRO DE GERBER

FONTE: A autora (2012)

3.2.2.5 Extrato Seco Total (EST)

A utilização de fórmulas apropriadas permite determinar o teor de EST por meio dos valores de densidade e teor de gordura (CASTANHEIRA, 2010).

Determinado através do método indireto com o uso de Fórmula de Fleishmann:

$$\%EST = 1,2G + 2,665 [(100D-100)/D]$$

Em que:

D= densidade em g/ml

G = % gordura

3.2.2.6. Extrato Seco Desengordurado (ESD)

Obtém-se o ESD subtraindo-se da porcentagem de extrato seco total a porcentagem de gordura da amostra (CASTANHEIRA, 2010).

$$\%ESD = \%EST - \%G$$

Em que:

EST = extrato seco total

G = gordura

3.2.2.7 Nitrogênio Total (Proteína)

Baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico, e posterior destilação, com liberação de amônia, fixada em solução ácida e titulada (CASTANHEIRA, 2010).

A proteína foi determinada através do método de Kjeldahl descrito nos métodos oficiais na Instrução Normativa n. 68 (BRASIL, 2006).

3.2.2.8 Cinzas

Fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica à temperatura de 550°C, obtendo-se o resíduo mineral fixo.

As amostras foram pesadas e carbonizadas em chapa aquecedora por 2 horas, para evitar o extravasamento da mesma no forno mufla.

Após incineração da amostra em mufla a 550°C durante 5 horas, as cinzas foram pesadas e o resultado foi obtido por gravimetria (BRASIL, 2006).

3.2.2.9 Cálcio

A medição da concentração de cálcio das amostras foi realizada através de um equipamento digital portátil modelo Orion 2 Star da marca Thermo Scientific, com eletrodo específico para mensuração do cálcio devidamente calibrado.



FIGURA 06 – EQUIPAMENTO ORION 2 STAR PARA ANÁLISE DO CÁLCIO

FONTE: A autora (2012)

3.2.3 Imunodifusão Radial Simples

Determinação das taxas de imunoglobulinas da classe IgG do leite de colostro bovino através do método de imunodifusão radial simples utilizando o Kit Comercial VMRD Bovine IgG Rid Kit, 400-3200mg/dL e o Kit Comercial Kent Triple J Farms Radial Immunodiffusion Test for Bovine IgG, 196- 2748 mg/dL (MANCINI *et al.*, 1965).

Para o Kit VMRD, um volume de 3 μ L e para o Kit Kent um volume de 5 μ L de colostro diluído em solução PBS (1:10) foi pipetado nos poços das placas específicas para a determinação quantitativa da IgG bovina. Em seguida, as placas foram incubadas a 20°C por 24 horas. A intensidade da reação das amostras geraram halos em volta dos poços e a quantificação das imunoglobulinas foi realizada comparando com aqueles halos obtidos a partir dos padrões pré-estabelecidos contidos nos próprios kits. Os resultados (diâmetros dos anéis) foram lidos com auxílio de um comparador (Finescale Comparator) onde foi estabelecida uma curva padrão em gráfico semi-log.

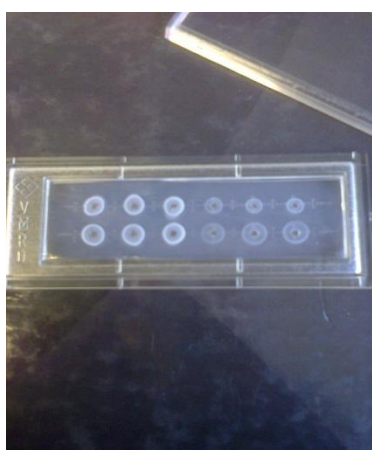


FIGURA 07 e 08 - REAÇÃO DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO DILUÍDO EM PLACA MARCA VMRD E KENT, RESPECTIVAMENTE.

FONTE: A autora (2012)

3.2.4 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras *in natura* e nas carbonatadas mantidas em temperaturas de 5-7°C após 48 horas do processo de carbonatação. As amostras foram homogeneizadas e diluídas em água peptonada 0,1%.

3.2.4.1 Contagem total de mesófilos

Foram realizadas pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando PCA - Ágar Padrão para Contagem da marca Himedia, placas invertidas, com incubação a 35°C por 48 horas (SILVA *et al.*, 1997). Resultados expressos em \log_{10} UFC/ml.

3.2.4.2 Contagem total de psicotróficos

Contagem total de psicotróficos realizada pelo método de plaqueamento em superfície em Agar Padrão para Contagem (PCA), marca Himedia, incubados por 10 dias a 7°C, placas invertidas (SILVA *et al.*, 1997). Resultados expressos em \log_{10} UFC/ml.

3.2.4.3 Contagem total de coliformes totais

Determinado através de placas Petrifilm da marca 3M, incubadas por 24 horas a 35°C. Os coliformes totais são caracterizados como colônias vermelhas com bolhas de gás (SILVA *et al.*, 1997). Resultados expressos em \log_{10} UFC/ml.

3.2.4.4 Contagem de *Escherichia coli*

Determinado através de placas Petrifilm da marca 3M, incubadas por 24 horas a 35°C. As colônias de *E.Coli* são diferenciadas como colônias azuis com formação de gás (SILVA *et al.*, 1997). Resultados expressos em \log_{10} UFC/ml.

3.3 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata, exceto a imunodifusão radial simples e análises microbiológicas que foram realizadas em duplicata. Inicialmente os resultados foram checados quanto a Normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias entre as três amostras de leite de colostro bovino foi estudada pelo teste de Hartley. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) unifatorial e o teste de Fisher foi utilizado para comparar as médias entre os tratamentos. Valores de probabilidade (p-valor) abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O programa Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) foi usado para todas as análises estatísticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas, imunoglobulinas IgG e das análises microbiológicas encontram-se nos quadros 02 e 03.

	In Natura (controle)	Colostro B	Colostro C	p- valor ¹	p-valor ²
pH (H°)	6,56 ± 0,009 a	6,30 ± 0,009 b	6,06 ± 0,008 c	0,01	0,01
Acidez (°D)	49,38 ± 1,39 b	56,77 ± 1,23 ab	64,51 ± 1,192 a	0,10	0,01
Densidade (g/L)	1056,20 ± 1,14	1055,74 ± 1,22	1054,19 ± 1,86	0,64	0,61
Gordura (%)	5,95 ± 0,03	5,95 ± 0,01	5,95 ± 0,04	0,99	1,00
Proteína (%)	13,60 ± 0,26	13,64 ± 0,27	13,59 ± 0,29	0,99	1,00
EST (%)	21,30 ± 0,30	21,18 ± 0,28	20,81 ± 0,49	0,91	0,87
ESD (%)	15,35 ± 0,29	15,23 ± 0,28	14,86 ± 0,45	0,85	0,63
Cinzas (%)	1,00 ± 0,002	1,00 ± 0,002	1,00 ± 0,003	0,45	0,96
Cálcio (g/L)	0,113 ± 0,004	0,112 ± 0,003	0,119 ± 0,004	0,92	0,88
IgG (mg/dL)	9728,57 ± 686,20	9638,89 ± 580,09	9404,38 ± 762,91	0,89	0,97

Nota: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; 1 Valor de probabilidade em termos de homogeneidade das variâncias (F-max), obtido por meio do teste de Hartley; 2 Valor de probabilidade obtido por ANOVA unifatorial; Letras diferentes na linha representam resultados estatisticamente diferentes (p <0,05) de acordo com o teste de Fisher.

QUADRO 02- VALORES DOS COMPONENTES DO LEITE DE COLOSTRO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Contagem microbiológica (log UFC.mL)	In Natura (controle)	Colostro B	Colostro C	p- valor ¹	p-valor ²
Mesófilos	6,11 ± 0,11	6,24 ± 0,14	6,11 ± 0,18	0,94	0,94
Psicrotróficos	5,82 ± 0,10	5,87 ± 0,06	5,73 ± 0,06	0,76	0,96
Coliformes Totais	3,48 ± 0,08	3,50 ± 0,06	3,20 ± 0,06	0,83	0,73
<i>E. coli</i>	2,08 ± 0,04	2,32 ± 0,05	2,10 ± 0,03	0,93	0,77

Nota: Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; 1 Valor da probabilidade em termos de homogeneidade das variâncias (F-max), obtido por meio do teste de Hartley; 2 Valor de probabilidade obtido por ANOVA unifatorial.

QUADRO 03 - VALORES DOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS EM LOG UFC.mL ENCONTRADOS NO LEITE DE COLOSTRO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E IMUNOGLOBULINAS IGG

4.1.1 pH

De acordo com Silva (2000), um dos principais fatores que influenciam o crescimento, sobrevivência ou destruição dos micro-organismos presentes em alimentos é a concentração hidrogeniônica, que determina o pH.

Como esperado, após a acidificação do leite de colostro bovino com gás carbônico, o pH baixou instantaneamente, pois o CO₂ adicionado ao leite de colostro bovino provocou reações químicas no qual o hidrogênio da água presente na amostra ficou livre no meio, aumentando o teor de H⁺ perceptíveis ao eletrodo de medição do pH, como visto na reação abaixo de acordo com Hotchkiss *et al.* (2006).



Pela tabela 01 observa-se os valores extremos de pH alcançados no experimento, denominados de pH C, bem como os valores intermediários de pH, denominados pH B. Estatisticamente os valores de pH se mostraram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre si, mostrando que a carbonatação foi eficiente na diminuição do pH do leite de colostro bovino.

O leite de colostro bovino possui um grande poder tamponante, pois dependendo da amostra, não conseguiu-se reduzir o pH a 2%, enquanto outras alíquotas foi reduzido até 12% o valor inicial do pH em relação as amostras carbonatadas.

TABELA 01 - pH DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

pH Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	6,67 ± 0,011	6,21 ± 0,01	5,91 ± 0,01
2	6,94 ± 0,01	6,76 ± 0,005	6,58 ± 0,005
3	6,48 ± 0,05	6,18 ± 0,015	5,85 ± 0,01
4	6,42 ± 0,015	6,12 ± 0,015	5,81 ± 0,00
5	6,53 ± 0,005	6,47 ± 0,01	6,43 ± 0,01
6	6,30 ± 0,011	6,11 ± 0,005	6,02 ± 0,11
7	6,81 ± 0,01	6,41 ± 0,017	6,10 ± 0,006
8	6,35 ± 0,006	6,15 ± 0,006	5,96 ± 0,006
9	6,59 ± 0,006	6,24 ± 0,01	5,93 ± 0,011
10	6,27 ± 0,01	6,07 ± 0,006	5,89 ± 0,006
11	6,77 ± 0,00	6,39 ± 0,01	6,02 ± 0,006
12	6,55 ± 0,015	6,4 ± 0,01	6,25 ± 0,01
13	6,62 ± 0,015	6,34 ± 0,006	6,17 ± 0,015
14	6,72 ± 0,015	6,43 ± 0,006	6,10 ± 0,006
15	6,45 ± 0,006	6,15 ± 0,01	5,87 ± 0,01
Média	6,56 ± 0,009 a	6,30 ± 0,009 b	6,06 ± 0,008 c

NOTA: valores médios com letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher com 95% de confiança.

De acordo com Couto *et al.* (2010), foram analisados colostro de duas diferentes raças bovinas e o pH encontrado foi de 6,72 para leite de colostro *in natura* de vacas da raça Jersey e 6,34 para vacas da raça Holandesa. Foley *et al.* (1978), encontrou valores médios de 6,32 para pH em leite de colostro de primeira ordenha. Silvestre (2009), observou valores médios de 6,42 ± 0,26 em leite de colostro, sendo o valor mínimo de 6,18 e o máximo de 6,75, após a acidificação com ácidos orgânicos alcançou pH 4,5 nas amostras tratadas. Otterby *et al.* (1976) chegou ao pH 4,2 após acidificar leite de colostro com ácido propiônico a 1,5% em volume.

Jenny *et al.* (1984), tratou o leite de colostro bovino com diversos conservantes e após adicioná-los as amostras observou que o pH do leite de colostro naturalmente fermentado era de 4,9, enquanto os adicionados de benzoato de sódio foi de 5,5, ácido propiônico alcançou pH 4,8 e com o formaldeído observou-se

valores entre 5,1. Otterby (1980) acidificou leite de colostro com ácido propiônico e alcançou valores de pH de até 3,98.

A literatura não aponta dados de leite de colostro carbonatado, porém em leite comercializável, Shirai (2010) pesquisou dois produtores de leite diferentes e encontrou valores médios de pH para o leite *in natura* de $6,86 \pm 0,015$, chegando ao pH 5,8 após o processo de carbonatação, reduzindo em 15% os valores iniciais de pH em relação as amostras acidificadas.

O pH do leite fresco apresenta reação ligeiramente ácida, variando entre 6,6 e 6,8 (BRASIL, 2002).

4.1.2 Acidez titulável

Os valores medianos obtidos de acidez titulável das amostras analisadas para o leite de colostro *in natura* (pH 6,56), carbonatado com pH intermediário (pH B - 6,30) e carbonatado com pH extremo (pH C - 6,06) foram respectivamente 49,38 °D, 56,76 °D e 64,50 °D.

Em estudo de Couto *et al.* (2010), encontram-se valores de acidez para o leite de colostro bovino *in natura* próximos a 50,5 °D para animais da raça Jersey e 46,5°D para animais da raça Holandesa.

As substâncias responsáveis pela acidez aparente são os minerais, as proteínas e o gás carbônico dissolvido. Diferentemente da acidez real ou verdadeira que é produzida pela transformação da lactose em ácido láctico por meio do crescimento dos micro-organismos presente na amostra (BRITO *et al.*, 2005).

No entanto, como as amostras de leite de colostro bovino são heterogêneas, não possuem a mesma capacidade tamponante, conseqüentemente não existe uma relação perfeita entre acidez titulável e pH. Por isso, pode-se afirmar que as

diferenças em acidez titulável, são resultados de diferenças da capacidade tamponante das amostras e em menor escala no nível de pH (CAMPOS, 2012).

As amostras carbonatadas apresentaram um alto valor de acidez em virtude da quantidade de gás carbônico dissolvido no leite de colostro bovino, como observado na tabela 02.

TABELA 02 - ACIDEZ TITULÁVEL EM GRAUS DORNIC DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Acidez (°D)	Leite de Colostro		
	Amostra	In Natura	Carbonatado B
1	34,70 ± 1,15	38,70 ± 1,15	53,39 ± 1,15
2	23,36 ± 1,15	29,36 ± 1,15	35,37 ± 1,15
3	34,03 ± 0,00	38,04 ± 0,00	42,71 ± 1,15
4	72,74 ± 1,15	68,73 ± 1,15	72,74 ± 1,15
5	130,13 ± 2,00	130,80 ± 1,15	106,11 ± 2,00
6	42,71 ± 1,15	45,38 ± 1,15	47,38 ± 1,15
7	32,03 ± 2,00	40,71 ± 1,15	52,05 ± 2,00
8	51,38 ± 1,15	52,72 ± 1,15	55,39 ± 1,15
9	24,69 ± 1,15	36,70 ± 1,15	50,72 ± 1,15
10	60,73 ± 3,05	70,07 ± 0,00	81,42 ± 1,15
11	39,37 ± 1,15	46,71 ± 1,15	61,39 ± 1,15
12	52,05 ± 2,00	62,73 ± 1,15	82,75 ± 1,15
13	48,71 ± 1,15	56,72 ± 1,15	69,40 ± 1,15
14	38,70 ± 1,15	56,72 ± 1,15	72,072 ± 0,00
15	55,39 ± 1,15	77,41 ± 1,15	84,75 ± 1,15
Média	49,38 ± 1,39 b	56,77 ± 1,23 ab	64, 51 ± 1,19 a

NOTA: valores médios com letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Fisher com 95% de confiança.

4.1.3 Densidade

A densidade das amostras com maior teor de CO₂ não foi estatisticamente diferenciada em relação às outras amostras. Tomando valores médios de 1056,20g/L amostra *in natura*, 1055,74 g/L amostra pH B (6,30) e 1054,19 amostra pH C (6,06), como demonstrado na tabela 03.

TABELA 03 - DENSIDADE EM g/L DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Densidade Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	1050,23 ± 0,79	1050,44 ± 1,10	1050,99 ± 0,79
2	1051,52 ± 1,956	1051,25 ± 0,75	1051,35 ± 0,64
3	1040,06 ± 0,31	1038,85 ± 0,72	1038,42 ± 0,46
4	1051,14 ± 0,87	1049,84 ± 0,72	1049,84 ± 0,91
5	1066,43 ± 3,62	1066,17 ± 3,13	1067,19 ± 2,95
6	1053,16 ± 2,97	1052,29 ± 3,44	1047,91 ± 3,44
7	1047,41 ± 0,64	1046,31 ± 1,43	1047,26 ± 0,27
8	1052,66 ± 0,73	1053,42 ± 0,32	1039,13 ± 9,72
9	1043,72 ± 0,51	1041,64 ± 1,43	1039,68 ± 2,22
10	1068,34 ± 0,65	1068,13 ± 0,65	1064,65 ± 1,50
11	1064,33 ± 1,08	1065,68 ± 0,47	1066,18 ± 0,40
12	1065,68 ± 0,47	1066,18 ± 0,40	1068,97 ± 0,58
13	1067,31 ± 1,83	1066,35 ± 3,10	1065,95 ± 1,49
14	1053,11 ± 0,75	1053,26 ± 1,49	1053,68 ± 0,58
15	1065,99 ± 0,16	1065,81 ± 0,26	1064,73 ± 0,16
Média	1056,20 ± 1,14	1055,74 ± 1,22	1054,19 ± 1,86

De acordo com Rocha & Bouda (2000), um leite de colostro de boa qualidade deve possuir densidade maior que 1050,0 g/l, pois existe uma relação direta entre a densidade do colostro e a concentração de imunoglobulinas. Foley *et al.* (1978) realizou a composição centesimal do leite de colostro bovino e também encontrou valores médios para a densidade de 1,056 g/l para a primeira ordenha.

No leite a densidade é, em média, 1,032 g/mL, podendo variar entre 1,023 e 1,040 g/mL (BRITO *et al.*, 2005).

4.1.4 Gordura

Como esperado a carbonatação não influenciou a porcentagem de gordura encontrada nas amostras *in natura*, como demonstrado na tabela 04.

Wattiux (1994) e Foley *et al.* (1978) encontraram valores médios de 6,7% de gordura em leite de colostro bovino *in natura* de primeira ordenha. Já Silvestre (2009), obteve resultados no valor de 9,90% para o mesmo tipo de leite de colostro.

TABELA 04 - GORDURA EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Gordura (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	2,0 ± 0	2,0 ± 0	2,17 ± 0,28
2	6,0 ± 0	6,0 ± 0	6,0 ± 0
3	2,0 ± 0	2,1 ± 0,11	2,1 ± 0,11
4	3,2 ± 0	3,2 ± 0	3,2 ± 0
5	7,9 ± 0,11	7,8 ± 0	7,7 ± 0,11
6	7,6 ± 0	7,6 ± 0	7,6 ± 0
7	7,4 ± 0	7,4 ± 0	7,4 ± 0
8	12,3 ± 0,11	12,4 ± 0	12,4 ± 0
9	4,8 ± 0	4,8 ± 0	4,8 ± 0
10	4,6 ± 0	4,6 ± 0	4,6 ± 0
11	3,8 ± 0	3,8 ± 0	3,8 ± 0
12	8,2 ± 0	8,2 ± 0	8,2 ± 0
13	6,7 ± 0,11	6,6 ± 0	6,5 ± 0
14	10,6 ± 0	10,6 ± 0	10,6 ± 0
15	2,1 ± 0,11	2,1 ± 0,11	2,2 ± 0
Média	5,95 ± 0,03	5,95 ± 0,01	5,95 ± 0,04

4.1.5 Proteína

Os valores das médias encontradas nas amostras analisadas foram de 13,61 \pm 0,27, bem próximas quando comparadas as encontradas por Wattiaux (1994) e Foley *et al.* (1978), que detectaram 14,0% para leite de colostro de primeira ordenha. Silvestre (2009) obteve resultados médios de 10,14% de proteína para o leite de colostro bovino.

A acidificação também não influenciou os teores de proteínas encontradas nas amostras tratadas, como demonstra a tabela 05.

TABELA 05 - TEOR DE PROTEÍNA EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Proteína (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	11,43 \pm 0,09	11,61 \pm 0,09	11,79 \pm 0,11
2	14,93 \pm 0,28	15,21 \pm 0,06	15,31 \pm 0,29
3	6,36 \pm 0,04	6,32 \pm 0,09	6,25 \pm 0,08
4	11,19 \pm 0,40	11,53 \pm 0,17	11,34 \pm 0,05
5	21,16 \pm 1,23	21,00 \pm 0,50	21,75 \pm 0,04
6	15,67 \pm 0,08	15,45 \pm 0,22	15,58 \pm 0,17
7	8,45 \pm 0,14	8,59 \pm 0,22	8,38 \pm 0,05
8	14,02 \pm 0,09	13,79 \pm 0,27	13,40 \pm 0,65
9	7,54 \pm 0,13	7,22 \pm 0,42	7,43 \pm 0,07
10	16,66 \pm 0,37	17,01 \pm 0,59	16,55 \pm 0,44
11	15,76 \pm 0,38	15,16 \pm 0,22	15,20 \pm 0,64
12	17,59 \pm 0,32	18,06 \pm 0,60	17,50 \pm 0,32
13	12,57 \pm 0,18	16,08 \pm 0,07	15,90 \pm 0,20
14	15,93 \pm 0,10	12,82 \pm 0,17	13,09 \pm 0,44
15	14,69 \pm 0,08	14,12 \pm 0,32	13,79 \pm 0,82
Média	13,60 \pm 0,26	13,64 \pm 0,27	13,59 \pm 0,29

4.1.6 Extrato Seco Total (EST)

Os valores encontrados para EST no leite de colostro *in natura*, carbonatado pH B (6,30) e carbonatado pH C (6,06), foi de $21,30 \pm 0,29$, $21,18 \pm 0,28$ e $20,81 \pm 0,49$, respectivamente, não sendo considerados estatisticamente diferentes entre si.

TABELA 06 - EST EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

EST (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	15,15 ± 0,19	15,19 ± 0,26	15,52 ± 0,48
2	20,25 ± 0,47	20,19 ± 0,17	20,21 ± 0,15
3	12,67 ± 0,07	12,44 ± 0,10	12,34 ± 0,24
4	16,80 ± 0,20	16,49 ± 0,18	16,49 ± 0,21
5	26,04 ± 0,93	25,90 ± 0,74	26,06 ± 0,81
6	22,57 ± 0,72	22,35 ± 0,70	21,30 ± 0,00
7	20,94 ± 0,15	20,67 ± 0,34	20,91 ± 0,07
8	28,13 ± 0,28	28,39 ± 0,07	24,89 ± 2,38
9	16,92 ± 0,12	16,40 ± 0,35	15,92 ± 0,54
10	22,56 ± 0,29	22,51 ± 0,14	21,71 ± 0,36
11	20,67 ± 0,25	20,98 ± 0,11	21,09 ± 0,09
12	27,03 ± 0,13	26,64 ± 0,42	26,41 ± 0,72
13	24,48 ± 0,23	24,33 ± 0,12	24,22 ± 0,27
14	26,16 ± 0,18	26,19 ± 0,36	26,29 ± 0,14
15	19,06 ± 0,17	19,01 ± 0,10	18,84 ± 0,04
Média	21,30 ± 0,29	21,18 ± 0,28	20,81 ± 0,49

4.1.7 Extrato Seco Desengordurado (ESD)

O extrato seco desengordurado é obtido subtraindo a gordura do extrato seco total. Como não houve diferença entre os valores de gordura das amostras analisadas, o valor do ESD tende a seguir os mesmos parâmetros do EST, como demonstra a tabela 07, tomando valores de $15,35 \pm 0,28$ para leite de colostro *in*

natura, $15,23 \pm 0,28$ para carbonatação em pH intermediário e $14,86 \pm 0,45$ para carbonatação em pH extremo.

Silvestre (2009) encontrou valores médios de $8,89 \pm 0,29$ de ESD em leite de colostro *in natura*.

TABELA 07 - ESD EM % DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

ESD (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	13,1 ± 0,19	13,2 ± 0,26	13,4 ± 0,22
2	14,3 ± 0,47	14,2 ± 0,17	14,2 ± 0,15
3	10,7 ± 0,07	10,4 ± 0,16	10,3 ± 0,13
4	13,6 ± 0,20	13,3 ± 0,18	13,3 ± 0,21
5	18,2 ± 0,87	18,1 ± 0,74	18,3 ± 0,71
6	15,0 ± 0,72	14,8 ± 0,70	13,7 ± 0,83
7	13,5 ± 0,15	13,3 ± 0,34	13,5 ± 0,07
8	15,8 ± 0,19	16,0 ± 0,07	12,5 ± 2,38
9	12,1 ± 0,12	11,6 ± 0,35	11,1 ± 0,54
10	18,0 ± 0,29	17,9 ± 0,14	17,1 ± 0,36
11	16,9 ± 0,25	17,2 ± 0,11	17,3 ± 0,09
12	18,8 ± 0,13	18,4 ± 0,42	18,2 ± 0,72
13	17,8 ± 0,33	17,7 ± 0,12	17,7 ± 0,16
14	15,6 ± 0,18	15,6 ± 0,36	15,7 ± 0,14
15	16,9 ± 0,06	16,9 ± 0,05	16,6 ± 0,04
Média	15,35 ± 0,29	15,23 ± 0,28	14,86 ± 0,45

4.1.8 Cinzas

Para os teores de cinzas foram encontrados valores de $1,00 \pm 0,002\%$, $1,00 \pm 0,002\%$ e $1,00 \pm 0,003\%$ para as amostras *in natura*, carbonatadas com pH intermediário e com pH extremo, respectivamente, como demonstra a tabela 08. Nota-se que os teores de resíduo mineral não foram afetados pelo processo de carbonatação. A partir das análises realizadas, foram encontrados valores bem

próximos aos encontrados por Wattiaux em 1994, 1,11% para leite de colostro de primeira ordenha e 0,95% para segunda ordenha.

TABELA 08 - CINZAS DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Cinzas (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	0,89 ± 0,02	0,88 ± 0,01	0,88 ± 0,02
2	1,00 ± 0,01	1,02 ± 0,02	1,05 ± 0,04
3	0,89 ± 0,02	0,89 ± 0,03	0,85 ± 0,01
4	0,91 ± 0,01	0,90 ± 0,02	0,94 ± 0,01
5	0,99 ± 0,02	1,01 ± 0,00	0,99 ± 0,00
6	0,91 ± 0,00	0,91 ± 0,02	0,90 ± 0,01
7	1,17 ± 0,05	1,10 ± 0,00	1,18 ± 0,10
8	1,15 ± 0,05	1,13 ± 0,04	1,12 ± 0,02
9	0,83 ± 0,01	0,91 ± 0,03	0,88 ± 0,03
10	0,96 ± 0,03	0,99 ± 0,03	0,99 ± 0,02
11	1,00 ± 0,12	1,06 ± 0,08	0,93 ± 0,02
12	1,07 ± 0,02	1,09 ± 0,00	1,06 ± 0,01
13	1,09 ± 0,06	0,95 ± 0,01	1,03 ± 0,01
14	0,95 ± 0,02	1,02 ± 0,04	0,97 ± 0,00
15	1,17 ± 0,03	1,15 ± 0,00	1,13 ± 0,04
Média	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,03

4.1.9 Cálcio

As amostras *in natura* e acidificadas com pH intermediários obtiveram valores de $0,113 \pm 0,004$ g/L e $0,112 \pm 0,003$ g/L respectivamente, enquanto nas amostras que receberam maior grau de carbonatação, obtiveram valores de $0,119 \pm 0,004$ g/L, não apresentando diferenças estatisticamente significativas, como demonstra a tabela 09.

TABELA 09 - CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO EM g/L DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Cálcio (%) Amostra	Leite de Colostro		
	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	0,073 ± 0,009	0,084 ± 0,008	0,092 ± 0,003
2	0,044 ± 0,001	0,047 ± 0,004	0,052 ± 0,002
3	0,206 ± 0,012	0,200 ± 0,006	0,201 ± 0,013
4	0,232 ± 0,003	0,255 ± 0,007	0,249 ± 0,006
5	0,183 ± 0,003	0,186 ± 0,002	0,189 ± 0,002
6	0,154 ± 0,001	0,149 ± 0,002	0,153 ± 0,004
7	0,045 ± 0,006	0,040 ± 0,002	0,039 ± 0,001
8	0,176 ± 0,008	0,161 ± 0,003	0,211 ± 0,011
9	0,062 ± 0,004	0,062 ± 0,001	0,060 ± 0,003
10	0,114 ± 0,008	0,117 ± 0,003	0,117 ± 0,008
11	0,100 ± 0,005	0,063 ± 0,001	0,078 ± 0,002
12	0,028 ± 0,001	0,030 ± 0,002	0,028 ± 0,002
13	0,159 ± 0,003	0,157 ± 0,002	0,164 ± 0,005
14	0,045 ± 0,001	0,047 ± 0,001	0,051 ± 0,003
15	0,081 ± 0,003	0,085 ± 0,002	0,098 ± 0,002
Média	0,113 ± 0,004	0,112 ± 0,002	0,119 ± 0,004

4.1.10 Imunoglobulinas IgG

As imunoglobulinas da classe IgG não apresentaram diferenças estatísticas significativas após os tratamentos aplicados. Os valores médios encontrados no leite de colostro *in natura*, carbonatados pH 6,30 e carbonatadas pH 6,06, foram 9728,57 ± 686,20 mg/dL, 9638,89 ± 580,09mg/dL e 9404,38 ± 762,91 mg/dL respectivamente, como demonstra a tabela 10.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS IGG EM MG/DL DO LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

IgG (mg/dL)		Leite de Colostro	
Amostra	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1	7101,65 ± 1347,25	6149,0 ± 0,0	6466,55 ± 449,08
2	13770,2 ± 1347,25	12341,23 ± 1571,79	16945,7 ± 4490,83
3	1862,07 ± 224,54	2020,85 ± 449,08	1703,3 ± 0,0
4	12023,68 ± 224,54	11388,58 ± 224,54	8689,4 ± 898,17
5	12817,55 ± 449,08	12976,33 ± 224,54	13135,1 ± 898,17
6	16628,15 ± 1347,25	15993,05 ± 1347,25	16310,6 ± 1796,33
7	7736,75 ± 449,08	6149,0 ± 0,0	5831,45 ± 449,084
8	17898,35 ± 449,08	19486 ± 898,17	20121,2 ± 0,0
9	3157,38 ± 468,95	2494,19 ± 468,95	2162,6 ± 0,0
10	9457,69 ± 937,89	14100,02 ± 0,0	10120,88 ± 0,0
11	15592,2 ± 1641,31	13271,03 ± 2110,26	11944,65 ± 703,42
12	2162,6 ± 0,0	2328,40 ± 234,47	2162,6 ± 0,0
13	13105,24 ± 468,95	12276,25 ± 234,47	12193,35 ± 351,71
14	3654,78 ± 703,42	4981,16 ± 703,42	3820,57 ± 468,95
15	8960,30 ± 234,47	8628,70 ± 234,47	9457,69 ± 937,89
Média	9728,57 ± 686,20	9638,9 ± 580,09	9404,38 ± 762,91

As amostras analisadas foram consideradas de boa qualidade, pois as concentrações de anticorpos encontrados foram similares a outros valores encontrados como no trabalho de Gomes (2008), que obteve valores médios de IgG 10.078,0 ± 3462 mg/dL de leite de colostro de primeira ordenha e 6.591,0 ± 3364 mg/dL de leite de colostro de segunda ordenha. Bamn (2001), encontrou média de IgG no leite de colostro de vacas Holstein de 48 g/L, com um intervalo de 20 a 100 g/L e de vacas Jersey com média de 66 g/L de IgG, com intervalo de 28 a 115g/L.

Mbuthia (1997) acidificou leite de colostro bovino com formaldeído (0,1 e 0,05%) e ácido fórmico (0,5 e 0,1%), armazenados a 28°C e através da técnica de imunodifusão radial simples e notou que as imunoglobulinas do leite de colostro tratado com formaldeído, onde alcançou pH 4,8, permaneceram constantes, enquanto que no tratamento com ácido fórmico no qual o pH encontrou-se abaixo de 4,8, houve queda significativa de IgG em comparação com a amostra controle.

A acidificação por carbonatação não alterou a atividade das imunoglobulinas da classe G, o que não acontece através da acidificação com ácidos orgânicos, pois esse tipo de tratamento acarreta numa redução muito brusca do pH, alcançando níveis menores que 4,5. As imunoglobulinas são proteínas que se desnaturam quando incubadas a pH <4 ou >10 (CHEN & CHANG-MIN, 1998) ou quando são termicamente tratadas à temperatura >60°C (BITTAR & FERREIRA, 2006). Sendo a pasteurização realizada com temperaturas maiores que 60°C não indicada para amostras que pretende-se preservar as imunoglobulinas.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.2.1 Contagem Mesófilos

As amostras carbonatadas não apresentaram um valor reduzido na contagem de mesófilos após 48 horas do processo de carbonatação, como pode ser observado na tabela 11.

TABELA 11- CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS EM LOG UFC.mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Mesófilos (log UFC.mL)	Leite de Colostro		
	Amostra	In Natura	Carbonatado B
1	> 6,00 ± 0,00	> 6,00 ± 0,00	6,08 ± 0,05
2	> 6,00 ± 0,00	> 6,00 ± 0,00	> 6,00 ± 0,00
3	7,78 ± 0,01	8,17 ± 0,01	7,76 ± 0,02
4	6,92 ± 0,03	7,94 ± 0,01	7,80 ± 0,03
5	8,91 ± 0,00	8,50 ± 0,00	8,72 ± 0,03
6	6,60 ± 0,03	7,20 ± 0,08	6,54 ± 0,09
7	< 3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	< 3,00 ± 0,00
8	7,12 ± 0,12	7,14 ± 0,09	7,57 ± 0,11
9	4,89 ± 0,83	5,22 ± 0,15	4,95 ± 0,67
10	4,45 ± 0,21	4,48 ± 0,67	6,02 ± 0,52
11	7,14 ± 0,09	7,92 ± 0,42	6,37 ± 0,19
12	7,93 ± 0,23	7,74 ± 0,01	7,41 ± 0,01
13	6,24 ± 0,09	6,15 ± 0,21	6,00 ± 0,21
14	< 3,00 ± 0,00	< 3,00 ± 0,00	< 3,00 ± 0,00
15	5,61 ± 0,06	5,15 ± 0,35	4,50 ± 0,71
Média	6,11 ± 0,11	6,24 ± 0,14	6,11 ± 0,18

Muller *et al.* (1977) obtiveram em leite de colostro bovino *in natura*, valores de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL de micro-organismos mesófilos, enquanto Foley *et al.* (1978) encontraram valores bem próximos de $1,58 \times 10^6$ UFC/mL para os mesmos micro-organismos. Silvestre (2009) caracterizou em seu trabalho o leite de colostro e encontrou uma contagem de $1,51 \times 10^6$ UFC/mL para mesófilos, após a acidificação com ácidos orgânicos não notou nenhum efeito na contagem bacteriana nos tratamentos que utilizaram pH 5,5 e 5,0, apenas observou uma redução nos micro-organismos nos tratamentos em que foi utilizada pH 4,5.

Em estudo com leite cru, Shirai (2010) demonstrou que a combinação da temperatura de 5°C e pH 5,8 depois de 10 dias após o processo foi mais eficiente na inibição do crescimento de mesófilos em comparação a acidificação em pH 6,4.

Ruas *et al.* (1996), após acidificarem o leite com gás carbônico, observaram uma redução de 1 a 1,5 logaritmos no crescimento dos mesófilos.

Dependendo do micro-organismo, do meio em que estão em suspensão e da fase de crescimento pode ocorrer resistência microbiana ao gás carbônico, especialmente em sistemas ricos em proteínas (WEI,1991).

A presença de mesófilos em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção inadequada de superfícies, condições inadequadas de armazenamento, entre outros (SIQUEIRA, 1995).

4.2.2 Contagem Psicotróficos

Como observado na tabela 12, 48 horas após o gás carbônico ser adicionado no leite de colostro não houve uma diminuição estatisticamente significativa na contagem média dos micro-organismos psicotróficos. Porém nas amostras 1, 10, 11 e 12 houve um decréscimo maior de um log UFC .mL nas alíquotas acidificadas até o seu pH extremo.

TABELA 12 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS EM LOG UFC·mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Psicrotróficos (log UFC. ml)	Leite de Colostro			
	Amostra	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1		5,83 ± 0,18	5,10 ± 0,14	4,72 ± 0,03
2		5,45 ± 0,04	5,30 ± 0,06	5,50 ± 0,04
3		7,57 ± 0,03	7,94 ± 0,01	7,62 ± 0,02
4		8,40 ± 0,10	8,67 ± 0,01	8,49 ± 0,00
5		7,00 ± 0,00	8,93 ± 0,00	8,80 ± 0,00
6		6,37 ± 0,01	6,98 ± 0,01	5,81 ± 0,02
7		3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
8		8,13 ± 0,07	7,72 ± 0,15	8,34 ± 0,06
9		4,69 ± 0,55	4,60 ± 0,00	7,80 ± 0,14
10		7,00 ± 0,00	5,47 ± 0,04	5,15 ± 0,21
11		6,77 ± 0,10	7,29 ± 0,05	5,19 ± 0,06
12		5,05 ± 0,14	5,60 ± 0,43	4,00 ± 0,00
13		6,05 ± 0,29	5,39 ± 0,01	5,57 ± 0,38
14		3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
15		3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
Média		5,82 ± 0,10	5,87 ± 0,06	5,73 ± 0,06

Shirai (2010), obteve resultados satisfatórios frente à inibição dos psicrotróficos após 10 dias do processo de carbonatação realizado no leite cru.

Dagostin (2011) utilizou o processo de carbonatação no leite destinado à elaboração de queijo minas frescal e concluiu que a acidificação a pH 6,0 foi mais eficaz contra os micro-organismos psicrotróficos em geral nos primeiros dias de armazenamento, porém 20 dias após o tratamento houve um aumento na ordem de $8,08 \pm 0,07$ log UFC.g⁻¹ na contagem dos mesmos

Não existem padrões oficiais para um número máximo aceitável de micro-organismos psicrotróficos no leite, porém alguns autores, como Champagne et al. (1994), afirmam que é necessário que exista uma contaminação maior que 10^6 UFC/mL de micro-organismos psicrotróficos para que se torne perceptível uma alteração no aroma e sabor do leite.

Sendo assim, tomando o leite como comparativo, os valores encontrados nas amostras de leite de colostro bovino estudadas, encontram-se dentro de um limite aceitável.

4.2.3 Contagem Coliformes Totais

Os valores médios das amostras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, porém em algumas amostras com maior nível de acidificação, nota-se uma redução na contagem dos micro-organismos denominados como coliformes totais, como observa-se na tabela 13. Nas amostras 1, 6 e 13 ocorreu diminuição de 13,56%, 17,79% e 18.54%, respectivamente, na contagem dos coliformes totais após 48 horas da carbonatação. Nas alíquotas 9 e 12 houve redução de um log UFC.mL nas que foram acidificadas até o seu pH extremo, pois a magnitude de inibição foi aumentada, em razão de maiores quantidades de gás carbônico dissolvidos (ESPIE & MADDEN, 1997).

TABELA 13 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS COLIFORMES TOTAIS EM LOG UFC/mL DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

Coliformes totais (log UFC. mL)	Leite de Colostro			
	Amostra	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1		5,38 ± 0,05	5,06 ± 0,01	4,65 ± 0,03
2		4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
3		2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
4		5,20 ± 0,08	5,07 ± 0,10	5,32 ± 0,03
5		5,81 ± 0,04	5,55 ± 0,07	5,46 ± 0,02
6		5,17 ± 0,08	5,00 ± 0,00	4,25 ± 0,03
7		2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
8		3,66 ± 0,26	3,00 ± 0,00	3,95 ± 0,00
9		2,00 ± 0,00	2,54 ± 0,34	1,00 ± 0,00
10		1,00 ± 0,00	2,54 ± 0,34	1,00 ± 0,00
11		5,73 ± 0,11	6,16 ± 0,02	5,55 ± 0,06
12		5,54 ± 0,34	5,50 ± 0,04	4,54 ± 0,34
13		2,75 ± 0,21	2,00 ± 0,00	2,24 ± 0,34
14		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
15		1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Média		3,48 ± 0,08	3,50 ± 0,06	3,20 ± 0,06

Foley *et al.* (1978) encontrou valores de $1,00 \times 10^2$ UFC/mL e Muller *et al.* (1977) valores de $6,00 \times 10^4$ UFC/mL para coliformes em leite de colostro bovino *in natura*.

Shirai (2010), após 10 dias do armazenamento de amostras de leite acidificados com CO₂, observou uma redução significativa de 1,45 logaritmos para amostras de um determinado produtor.

4.2.4 Contagem *E. coli*

O desenvolvimento de *E. coli*, não sofreram influência em razão da acidificação, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa nas

amostras analisadas após 48 horas do processo de carbonatação, como observa-se na tabela 14.

TABELA 14 - CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS *E.COLI* EM UFC/ML DE LEITE DE COLOSTRO BOVINO *IN NATURA*, CARBONATADO pH B (6,30) E CARBONATADO pH C (6,06)

<i>E.coli</i> (log UFC. mL)	Leite de Colostro			
	Amostra	In Natura	Carbonatado B	Carbonatado C
1		4,10 ± 0,14	5,45 ± 0,21	4,32 ± 0,06
2		4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
3		< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00
4		4,83 ± 0,18	4,75 ± 0,21	4,24 ± 0,34
5		< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00
6		< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00
7		< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00
8		< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00
9		< 1,00 ± 0,00	< 2,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
10		< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
11		2,24 ± 0,34	2,54 ± 0,34	3,00 ± 0,00
12		< 1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
13		< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
14		< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
15		< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00	< 1,00 ± 0,00
	Média	2,08 ± 0,04	2,32 ± 0,05	2,10 ± 0,03

Neste trabalho a pressão do gás no leite de colostro bovino ocorreu à pressão ambiente, podendo ser um indicativo da dificuldade do gás carbônico penetrar no meio intracelular destes tipos de micro-organismos. O que não acontece quando o dióxido de carbono é inserido no meio sob pressão específica (HASS et al., 1989).

5 CONCLUSÕES

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

- Imunoglobulinas da classe IgG, gordura, proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado, cinzas e cálcio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas após o processo de acidificação utilizado no trabalho.
- Estatisticamente os valores de pH se mostraram diferentes ($p < 0,05$) entre si, mostrando que a carbonatação foi eficiente na diminuição do pH do leite de colostro bovino.
- Acidez titulável teve seus valores iniciais aumentados nas amostras carbonatadas até pH extremo.
- Os micro-organismos mesófilos e *E.coli*, não foram afetados pelo processo da acidificação, 48 horas após o processo. Para os micro-organismos psicrótróficos e coliformes totais pesquisados as diferenças médias das contagens microbianas não foram estatisticamente significativas, porém analisando alíquotas isoladas nota-se redução na carga microbiana de várias amostras carbonatadas até o pH extremo em comparação com as amostras *in natura*.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Medir a solubilização e vazão da quantidade de CO₂ solubilizado nas amostras;
- Pesquisar diferentes tempos após o processo de carbonatação, correlacionando com a carga microbiana encontrada;
- Realizar análises relacionadas à detecção dos aromas dos compostos voláteis do leite de colostro bovino antes e após o processo de carbonatação.

6 REFERÊNCIAS

ANTONIO, J.; SANDERS, M.S.; VAN, G.D. The effects of bovine colostrum supplementation on body composition and exercise performance in active men and women. **Nutrition**, n.17, p. 243-247. University of Delaware. USA. Março 2001.

ARCHIBALD, A. **Progressive protein practices**. Nutra solutions, Prerared Foods. N. 3. 2005.

ARGUELLO, A.; CASTRO, N.; CAPOTE, J.; GINÉS, R.; ACOSTA, F.; LÓPEZ, J.L. Effects of refrigeration, freezing-thawing and pasteurization on IgG goat colostrum preservation. **Small Ruminant Research**, v.48, n.2, p.135-139, 2003.

AZEVEDO, R.A.; ALMEIDA, P.N.M.; VIEGAS, C.R.; DUARTE, E.R.; GERASEEV, L.C., FERREIRA, L.C. **Curva de pH e caracterização microbiológica de colostro bovino fermentado**. Zootec – Águas de Lindóia – SP. FZEA/USP-ABZ. 2009.

BARRINGTON, G.M.; PARRISH, S.M. Bovine Neonatal Immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.17, n.03, p.463-477, 2001.

BAWN, J. **A guide to colostrums and colostrums management for dairy calves**. Aphis. USDA. 2001.

BITTAR, C.M.M.; FERREIRA, L.S. **A que temperatura devemos descongelar colostro?** Radar Técnico. Animais Jovens. Milkpoint.. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 14 de dezembro de 2006. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.172, 20 de setembro de 2002. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Título VIII. Inspeção Industrial e Sanitária de Leite e Derivados. Capítulo I. Leite em Natureza. Art. 479. Decreto n. 3748. 12 de julho de 1993.

BRITO, M.A.; BRITO, J.R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Acidez Titulável / Densidade Relativa**. Agência de Informação Embrapa. Agronegócio do Leite. Embrapa. 2005.

BOTTOMLEY, R.C. **Isolation of immunoglobulin rich fraction from whey**. US Patent n. 5194591. 1993.

BOVINE ALLIANCE UM MANAGEMENT AND NUTRITION. **A guide to colostrum and colostrum management for dairy calves**. Washington, Animal and Plant Health Inspection Service, 17 Dez. 1998.

CALICH, V.L.G.C.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. Revinter. p. 59-79, 282- 287. Rio de Janeiro – RJ. 2009.

CAMPOS, F.M. **Química e Bioquímica do Leite**. Universidade Federal de Lavras. 101 f. Lavras-MG. 2012.

CASTANHEIRA, A.C.G. **Manual Básico de Controle de Qualidade de Leite e Derivados**. Cap-Lab. 270 p. São Paulo. 2010.

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.

CHEN, C.C. CHANG-MIN,H. Effect of Thermal Protectants on the Stability of Bovine Milk Immunoglobulin G. **Journal Agriculture Food Chemistral**. 46 (9), pp 3570-3576. 1998.

COUTO, S.V.; FREITA, D.Z.; SAALFELD, M.H.; GANDRA, E.A.; GULARTE, M.A. **Avaliação da acidez e ph de colostro *in natura* e de silagem de colostro**. Universidade Federal de Pelotas. XIX CIC / XII ENPOS. 2010.

DAGOSTIN, J.L.A. **Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo minas frescal elaborado a partir de leite carbonatado**. 79f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

DANIELS, J.A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S.D.H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v.48, p.532-537, 1985.

DEVERY-POCUS, J.E.; LARSON, B.L. Age and previous as factor in the amount of bovine colostrum immunoglobulins. **Journal Dairy Science**, v.66, p. 221-226, 1983.

ELFSTRAND, L.; MANSSON, H.L.; PAULSSON M.; NYBERG, L., AKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrums and the effects of processing. **International Dairy Journal**. N.12, p. 879-887. 2002.

ENEAPAI. **Estratégia Nacional para os Efluentes Agropecuários e Agroindustriais**. Despacho Conjunto SEA e SEAAP 1098/2005 de 28 de dezembro de 2005.

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

EVANGELISTA, JOSÉ. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 652p.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment, composition and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, n.08, p. 1033-1060, 1978.

GEVAUDAN, S.; LAGAUDE, 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.

GOMES, V.; **Componentes Imunológicos do Colostrum Bovino Células, Teores de Imunoglobulinas e Atividade Bactericida dos Fagócitos para a Escherichia Coli Enterotoxigênica (ECET)**. Universidade de São Paulo - USP, 2008.

GREEN, L. **Pasteurization of Non-saleable Milk and Colostrum in Comercial On-Farm Pasteurizers**. MS Thesis. Janeiro, 2003.

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.

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.

HANSON, M. Is your colostrum a health serum or bacterial soup? **Dairy Herd Management**. (50) p. 38-49. Setembro. 2002.

HAAS, G. J., PRESCOTT, J. R.; DUDLEY, E.; DIK, R.; HINTLIAN, C.; KEANE L. Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. **Journal of Food Safety**, v. 9, p. 253–265, 1989.

HE, F.; TUOMOLA, E.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum. **Elsevier Science B.V.**Federation of European Microbiological Societies 31. 93-96. 2001.

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.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal** **2010**. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1. Acesso em 14/07/12.

KUNG, L. The importance of colostrums for calves. **Animal and Food Sciences**. University of Delaware. College of Agriculture & Natural Resources. 2003.

JENNY, B.F.; HODGE, S.E.; ODELL, G.D.; ELLERS, J.E. Influence of Colostrum Preservation and Sodium Bicarbonate on Performance of Dairy Calves. *Journal Dairy Science*. 67: 313-318. 1984.

LABORCLIN. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica**. Laborclin – Produtos para Laboratórios. Rev.07/2010

LARSON, B.L.; LEARY, H.L.; DEVERY, J.E. Immunoglobulin production by the mamary gland. *Journal Dairy Science*, v.63, p. 665, 1980.

LEADLEY, S.; PAM, S. **Pro`s and Con`s of Feeding Frozen Colostrum**. Calving Ease. Attica Veterinary Associates. United States. Jul. 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LUCCI, C. **Bovinos Leiteiros Jovens**. São Paulo: Nobel/Edusp, 1989, p. 110-145.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, v.2, p. 235, 1965.

MARNILA, P.; KORHONEN, H. Immunoglobulins. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. P. 1950-1956. London, 2002.

MBUTHIA, E.W.; KLOBASA, F. GACHUIRI, C.K. ABATE, A. Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin content of stored bovine colostrums. *Animal Feed Science Technology*. 67. Pg 291-298. 1997.

MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H. Milk immunoglobulins for health promotion. *International Dairy Journal*. N.16, p. 1262-1271. 2006.

MORRIL, K.M.; CONRAD, E.; LAGO, A.; CAMPBELL, J.; QUIGLEY, J.; TYLER, H. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science* Volume 95, Issue 7 , Pages 3997-4005, July 2012.

MULLER, L.D.; ELLINGER, D.K. Colostral immunoglobulin concentration among breeds of dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.64, p. 1727-1730, 1981.

ONU (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS). **População Mundial 2011**. Disponível em: <http://www.onu.org.br/populacao-mundial-chegara-a-sete-bilhoes-em-31-de-outubro>. Acesso 14/07/12.

OTTERBY, D.E.; DUTTON, R.E. FOLEY, J.A. Comparative Fermentation of Bovine Colostral Milk. **Journal of Dairy Science**. Vol.60. n.01. 1976.

OTTERBY, D.E.; JOHNSON, D.G.; FOLEY, J.A.; TOMSCHE, D.S., LUNDQUIST, R.G.; HANSON, P.J. Fermented or chemically-treated colostrums and nonsaleable milk in feeding programs for calves. **Journal of Dairy Science**. 63: 951-958. 1980.

PEIXOTO, A.M. Leite. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**. Vol 4, I-M. Edusp. 2002.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicrófilas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 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.; LAGAUE, 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.

RINDSIG, R.B.; JANECKE, J.G.; BODOH, G.W. Influence of Formaldehyde e Propionic Acid on Composition and Microflora of Colostrum. **Journal of Dairy Science**. Vol.60.n.1. 1976.

ROCHA, G.F.Q; BOUDA, J. **Transferência de Imunidade Passiva ao Terneiro e Avaliação da Qualidade do Colostro. Uso de Provas de Campo e Laboratório Clínico em Doenças Metabólicas e Ruminais dos Bovinos** .UFRGS. Porto Alegre- RS . P.51-60, 2000.

RUAS M.P.; BADA-GANCEDO, J.; FERNANDEZ, E.G.; DELLANO, D.G.; REYES, G.C. 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 M.P.; BASCARÁN, V.; RAÑA, A. F.; BADA-GANCEDO, J.; REYESGAVILÁN, C. G. Influence of Carbon Dioxide addition to raw milk on microbial levels 74 and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1552-1555, 1998.

SANTOS, G.T.; DAMASCENO, J.C.; MASSUDA, E.M.; CAVALIERI, F.L.B. **Importância do Manejo e Considerações Econômicas na Criação de Bezerras e Novilhas**. Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. 212P. – Toledo – PR, 29 e 30/08/2002. Págs. 239-267. 2002.

SANTOS, M.V. **Qualidade de leite e manejo de ordenha – conceitos atualizados**. Curso Online Agripoint Consultoria Ltda. Setembro, 2006.

SCIENCE FOR DISCOVER. **Sistema Imunitário**. Maio de 2008. Disponível em: <http://sciencefordiscover.blogspot.com/>. Acesso em 03 de junho de 2011.

SHIRAI, M.A.; **Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono**. 90f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILPER, B.F; COELHO, S.G. **Colostro – quanto fornecer aos seus bezerras? (09/12/2008)**. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1811>. Acesso em 24 nov.2010.

SILVA, J. A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SILVESTRE, J.M.D. **Leites não comercializáveis, caracterização, tratamento químico e inserção em programas alimentares de vitelos**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal). Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro- RJ. 159 p. 1995.

SOARES, P.M.F.; BELÉM, P.A.D.; RIBEIRO, J.I.J.; SALCEDO, J.H.P. Concentrações de imunoglobulinas G em colostro de vacas mestiças Holandês-Zebu. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p. 1033-1037, 2001.

SOUZA, A.H.J. **Líquido Cefalorraquidiano, Líquidos Serosos, Aspectos Laboratoriais**. 6º Simpósio Regional de Biomedicina. 3º Workshop da Genética. Goiânia. Novembro de 2008.

STOTT, G.H.; LUCAS, D.O. **Immunologically active whey fraction and recovery process**. US Patent n. 4834974, 1989.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo, Roca, 1998.

URUAKPA, F.O.; ISMONDA, M.A.H.; AKOBUNDUA, E.N.T. Colostrum and its benefits: a review. **Nutrition Research**, n.22, pg. 755-767, jun.2002.

USDA, United States Department of Agriculture. **World Markets and Trad.** Dez.2010. Disponível em :
http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundial.htm. Acesso em 14/07/12.

WATTIAUX, M.A. **Essências em gado de leite**. University of Wisconsin-Madison. Capítulo 28. Do nascimento a desmama, 1994.

WEI, C. I.; BALABAN, M. O.; FERNANDO, S. Y.; PELOW, A. J. Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 189–193, 1991.