

## QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU REFRIGERADO ADICIONADO DE DIÓXIDO DE CARBONO

### MICROBIOLOGICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY OF THE REFRIGERATED RAW MILK ADDED WITH CARBON DIOXIDE

*Priscila Cristina Bizam VIANNA*  
*Mirna Lúcia GIGANTE*

#### SUMÁRIO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e da temperatura de armazenamento, bem como da interação desses fatores sobre o desenvolvimento microbiano, proteólise e lipólise do leite cru refrigerado. O leite cru, adicionado ou não de  $\text{CO}_2$ , foi armazenado em garrafas de vidro a 4 e 7°C. As amostras foram avaliadas diariamente quanto à contagem padrão em placas e de psicrótrófos e a cada dois dias quanto à proteólise e lipólise, até que a contagem padrão em placas atingisse  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL. A contagem padrão aumentou para todos os tratamentos durante o armazenamento refrigerado. Entretanto, para as amostras armazenadas a 4°C o tempo necessário para que se atingisse a contagem limite foi de 14 dias para o leite adicionado de  $\text{CO}_2$  e 8 dias para as amostras sem  $\text{CO}_2$ . Para as amostras armazenadas a 7°C esses tempos foram de 8 e 5 dias, respectivamente. Independente da temperatura de armazenamento, a adição de  $\text{CO}_2$  estendeu o tempo de fase lag e de geração dos psicrótrófos e reduziu sua taxa de crescimento com maior eficiência a 4°C. O leite adicionado de  $\text{CO}_2$  apresentou menor proteólise e lipólise, possivelmente relacionada à menor contagem de psicrótrófos e à diminuição da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas nestas amostras. A adição de  $\text{CO}_2$  viabilizou a manutenção da qualidade do leite cru por maior tempo e pode ser utilizada para prevenir problemas de qualidade nos produtos processados.

**Termos para indexação:** leite cru; dióxido de carbono; micro-organismos psicrótrófos; proteólise; lipólise.

#### 1 INTRODUÇÃO

A refrigeração do leite cru é o método mais eficiente e mundialmente aceito para controlar o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, entretanto, favorece o desenvolvimento de psicrótrófos que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que prejudicam a qualidade do leite e seus derivados (MUIR, 1996; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; SAN-

TOS & FONSECA, 2001). Embora os prejuízos causados pelo desenvolvimento de psicrótrófos, especialmente quando as contagens são acima de  $10^6$  unidades formadoras de colônia por mililitro de leite (UFC/mL), não seja um problema novo para a indústria láctea, trata-se de uma situação nova para a indústria brasileira que foi inicialmente projetada para a recepção diária do leite não refrigerado. Embora a recepção de leite não refrigerado ainda exista em diferentes partes

1. Doutora em Tecnologia de Alimentos, Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Avenida Paris, 675, CEP 86041-140, Londrina, PR. e-mail: priscila.vianna@unopar.br
2. Doutora em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Caixa Postal 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP. e-mail: mirna@fea.unicamp.br

do Brasil, a legislação brasileira estabeleceu normas para coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002). Neste novo contexto, o leite cru refrigerado pode ser transportado por longas distâncias entre os centros produtores e os processadores e é perfeitamente possível que seja processado 5 a 7 dias após a ordenha, o que permite o desenvolvimento de micro-organismos que afetam negativamente sua qualidade e a de seus derivados. Este quadro é agravado no mercado "spot", ou seja, na comercialização de leite cru refrigerado entre indústrias (NOGUEIRA, 2006).

Os principais pontos de contaminação do leite por micro-organismos psicrotóxicos são latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos, utensílios de ordenha e tetos não higienizados adequadamente (COUSINS & BRAMLEY, 1981; HAYES & BOOR, 2001). Altas contagens de psicrotóxicos foram encontradas em amostras de leite coletadas de tanques coletivos e individuais, com predominância de micro-organismos Gram negativos, sendo que *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens* a espécie predominante (ARCURI et al., 2008). Segundo Sørhaug & Stepaniak (1997) o aumento da contagem de psicrotóxicos no leite cru afeta negativamente a qualidade e a vida de prateleira de produtos processados, incluindo leite UHT, pasteurizado e em pó, queijos duros, queijo cottage, manteiga e iogurte.

Vários métodos podem retardar o desenvolvimento de psicrotóxicos no leite cru, tais como a produção com melhor qualidade higiênica, menor temperatura de armazenamento e transporte, a termização e a adição de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (ESPIE & MADDEN, 1997). Estudos têm mostrado que o  $\text{CO}_2$ , quando dissolvido no leite, retarda principalmente o desenvolvimento de psicrotóxicos (KING & MABBITT, 1982; DANIELS et al., 1985; ROBERTS & TORREY, 1988; ESPIE & MADDEN, 1997; LOSS & HOTCHKISS, 2000; HOTCHKISS et al. 2006) e os principais mecanismos de ação do  $\text{CO}_2$  para sua inibição foram resumidos por Loss

& Hotchkiss (2000) e Hotchkiss et al. (2006) e incluem: 1) substituição do oxigênio pelo  $\text{CO}_2$ ; 2) diminuição do pH do meio devido à dissolução do  $\text{CO}_2$  e formação de ácido carbônico; 3) efeito direto no metabolismo. Desta forma, a ação do  $\text{CO}_2$  prolonga a fase lag e aumenta o tempo de geração dos micro-organismos retardando o seu desenvolvimento e estendendo a vida de prateleira dos produtos.

A adição de  $\text{CO}_2$  altera o pH do leite e pode resultar na diminuição do ponto de congelamento e em alterações organolépticas, entretanto essas mudanças são reversíveis após a degaseificação do produto. Componentes do leite como caseínas, proteínas do soro e vitaminas não são afetados pelo tratamento com  $\text{CO}_2$  (RUAS-MADIEDO et al., 1996; RUAS-MADIEDO et al., 1998). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de  $\text{CO}_2$  e da temperatura de armazenamento bem como da interação desses fatores sobre o desenvolvimento microbiano, a proteólise e a lipólise no leite cru refrigerado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Leite cru e tratamentos

O leite cru utilizado nos experimentos foi adquirido de um produtor de leite Tipo A. Após a ordenha mecânica, o leite cru foi resfriado em trocador de calor a placas (4 °C), acondicionado em latão devidamente higienizado e transportado para a planta piloto de processamento.

Imediatamente após a recepção, o leite cru (30 litros) foi dividido em duas porções: uma porção foi considerada como leite controle (sem adição de  $\text{CO}_2$ ) e a outra foi adicionada de  $\text{CO}_2$ . O  $\text{CO}_2$  (Grau USP, White Martins, Brasil) foi borbulhado diretamente ao leite a 4 °C até que se atingisse o pH 6,20 ± 0,05. As amostras de leite, adicionadas ou não de  $\text{CO}_2$ , foram acondicionadas em garrafas de vidro transparentes de 300 mL, hermeticamente fechadas com tampas metálicas e armazenadas em câmara BOD a 4 °C e 7 °C. As condições de armazenamento escolhidas levaram em consideração a tempera-

tura máxima para conservação do leite cru na propriedade rural (7°C) segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002) e a temperatura reconhecidamente aceita como adequada para conservação do leite cru (4°C). Durante o armazenamento refrigerado uma garrafa de cada amostra foi aleatoriamente escolhida para a realização das análises microbiológicas e físico-químicas.

#### Determinações analíticas

Após a recepção uma amostra de leite cru foi coletada e avaliada quanto ao pH, acidez titulável, sólidos totais, nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 24% (AOAC, 1995), gordura e lactose (LANARA, 1981), conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) (SHIPE et al., 1980, modificado por MA et al., 2003) e concentração de CO<sub>2</sub> (MA et al., 2001). O leite cru também foi avaliado quanto à contagem padrão em placas e contagem de psicotróficos (APHA, 2001).

Durante o armazenamento refrigerado (4 ou 7°C), as amostras de leite (adicionada ou não de CO<sub>2</sub>) foram avaliadas diariamente quanto à contagem padrão em placas e contagem de psicotróficos e a cada dois dias quanto ao pH, concentração de CO<sub>2</sub>, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNP), nitrogênio solúvel em TCA 24% (NNC) e ácidos graxos livres (AGL) de acordo com as metodologias citadas anteriormente. As determinações analíticas foram conduzidas até que a contagem padrão atingisse 7,5x10<sup>5</sup> UFC/mL, que corresponde ao padrão microbiológico para leite cru refrigerado estabelecido pelo Anexo IV da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002). Os resultados de nitrogênio foram expressos como proteína usando o fator de conversão de 6,38. Proteína (P) e caseína (CN) foram calculadas por (NT-NNP) x 6,38 e (NT-NNC) x 6,38, respectivamente. O decréscimo da relação (CN/P) x 100 foi utilizado como índice de proteólise e o aumento da concentração de ácidos graxos livres (AGL), expresso como meq. de ácido palmítico/kg de leite, como índice de lipólise.

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, com exceção da concentração de CO<sub>2</sub> e do conteúdo de ácidos graxos livres que foram realizadas em duplicata. As avaliações microbiológicas também foram realizadas em duplicata.

#### Delimitação experimental e análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de sub-sub-parcelas divididas (*split-split-plot*) e o experimento completo foi repetido 2 vezes. O fator principal foi a adição de CO<sub>2</sub> com dois níveis de variação (com e sem CO<sub>2</sub>); o fator secundário foi a temperatura de armazenamento com dois níveis de variação (4±1 e 7±1°C) e o terceiro fator foi o tempo de armazenamento do leite, cujos níveis de variação foram dependentes do tempo que as amostras levaram para atingir a contagem padrão em placas de 7,5x10<sup>5</sup> UFC/mL. O efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento microbiano, a proteólise e lipólise foi avaliado por análise de variância multivariada e pelo teste de comparação entre médias de Tukey. A análise de regressão linear foi utilizada para comparar o efeito dos tratamentos (adição ou não de CO<sub>2</sub>) sobre o desenvolvimento da proteólise e lipólise e também para avaliar a existência de correlação entre o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos e o aumento da proteólise e da lipólise no leite cru, independente dos tratamentos aplicados às amostras. Para todas as avaliações estatísticas considerou-se o nível de 5% de significância.

O desenvolvimento dos psicotróficos foi avaliado utilizando-se o modelo matemático de Gompertz descrito na Equação 1, segundo Martin et al. (2003).

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

Onde  $Y(t)$ : log da contagem de micro-organismos no tempo  $t$ ;  $Y_0$ : log da contagem de micro-organismos no tempo zero;  $t$ : tempo (dias);  $a_1$ ,  $a_2$ : parâmetros do modelo de

Gompertz. Os parâmetros avaliados foram: tempo da fase lag [ $t_l(1-a_2)$ ], taxa de crescimento ( $a_1 a_2 / e$ ) e tempo de geração [ $\ln(2) / e$ ].

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

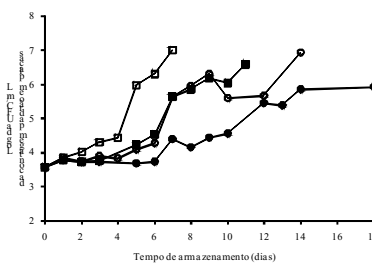
#### Caracterização do leite cru

O leite cru utilizado nos processamentos apresentou  $12,6 \pm 0,1\%$  de extrato seco total,  $4,2 \pm 0,3\%$  de gordura,  $3,0 \pm 0,1\%$  de proteína total,  $2,8 \pm 0,1\%$  de proteína verdadeira,  $2,30 \pm 0,06\%$  de caseína,  $82 \pm 1\%$  de caseína como porcentagem da proteína verdadeira,  $5,01 \pm 0,08\%$  de lactose, pH  $6,8 \pm 0,01$  e acidez de  $0,146 \pm 0,005\%$  de ácido láctico. A contagem padrão em placas e de psicotróficos foi  $3,7 \times 10^3$  e  $1,7 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente. Os resultados mostraram que o leite utilizado nos experimentos atende aos padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela IN nº 51 (BRASIL, 2002) que são: acidez  $0,14-0,18\%$  de ácido láctico, mínimo de  $3,0\%$  de gordura,  $2,9\%$  de proteína total,  $8,4\%$  de extrato seco desengordurado e contagem padrão em placas menor que  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL. Essas características indicam que o leite utilizado foi higienicamente obtido e adequadamente conservado. O leite cru adicionado de  $\text{CO}_2$  apresentou concentração média de  $1194 \pm 153$  ppm de  $\text{CO}_2$ . Esta concentração manteve-se praticamente constante e ao final as concentrações médias de  $\text{CO}_2$  foram de  $1153 \pm 137$  e  $1142 \pm 153$  ppm para os leites armazenados a 4 e 7 °C, respectivamente. O pH das amostras não variou significativamente ao longo do tempo e foi, em média,  $6,82 \pm 0,03$  para o leite controle e  $6,32 \pm 0,06$  para o leite adicionado de  $\text{CO}_2$ , independente da temperatura de conservação.

#### Desenvolvimento microbiano no leite cru

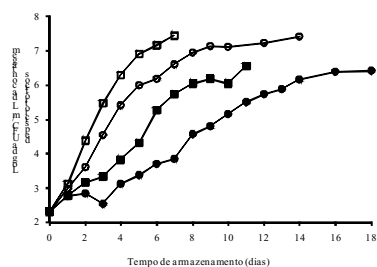
A adição de  $\text{CO}_2$ , a temperatura e o tempo de armazenamento afetaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) o tempo de conservação do leite cru e durante o armazenamento refrigerado a contagem padrão em placas aumentou para todos os tratamentos. Entre-

tanto, observa-se na Figura 1 que o tempo necessário para que se atingisse a contagem limite ( $7,5 \times 10^5$  UFC/mL) foi maior para a amostra adicionada de  $\text{CO}_2$  e armazenada a 4°C. Partindo-se da contagem padrão inicial de  $3,7 \times 10^3$  UFC/mL, o leite adicionado de  $\text{CO}_2$  e armazenado a 4°C levou aproximadamente 14 dias para atingir a contagem limite enquanto que o leite não adicionado de  $\text{CO}_2$  armazenado na mesma temperatura levou 8 dias. Observa-se ainda que este tempo foi de 8 e 5 dias para o leite armazenado a 7°C, adicionado ou não de  $\text{CO}_2$ , respectivamente (Figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Ma et al. (2003), que observaram que o leite armazenado a 4°C adicionado de 1500 ppm de  $\text{CO}_2$  levou aproximadamente 14 dias para atingir a contagem padrão de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL, partindo de uma contagem inicial de  $10^4$  UFC/mL. Observa-se ainda na Figura 1 que as amostras armazenadas a 4°C sem adição de  $\text{CO}_2$  e a 7°C adicionada de  $\text{CO}_2$  apresentaram aproximadamente o mesmo tempo de conservação (8 dias), sugerindo que a adição de  $\text{CO}_2$  no leite cru a 7°C tem efeito equivalente à sua conservação a 4°C sem adição de  $\text{CO}_2$ . Desta forma, mantendo-se a temperatura atualmente permitida para armazenamento do leite pela legislação brasileira, a adição de  $\text{CO}_2$  poderia contribuir para preservar a qualidade do leite cru recebido pelas indústrias brasileiras para processamento.



**Figura 1.** Log da UFC/mL da contagem padrão em placas do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (○) 4°C com  $\text{CO}_2$ ; (□) 4°C sem  $\text{CO}_2$ ; (△) 7°C com  $\text{CO}_2$ ; (●) 7°C sem  $\text{CO}_2$ ; (---) contagem padrão máxima permitida pela legislação brasileira ( $7,5 \times 10^5$  UFC/mL).

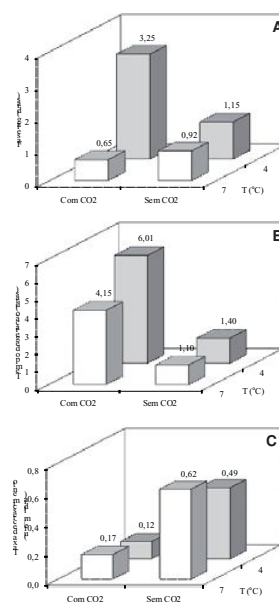
A adição de CO<sub>2</sub> a temperatura e o tempo de armazenamento também afetaram significativamente (p<0,0001) o desenvolvimento de psicotróficos, cujas contagens aumentaram ao longo do tempo para todos os tratamentos (Figura 2). Embora a legislação brasileira não estabeleça uma contagem limite de psicotróficos para leite cru, segundo diversos autores (MUIR, 1996; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; SANTOS & FONSECA, 2001) a qualidade dos produtos lácteos processados pode ser prejudicada se essa contagem for superior a 10<sup>6</sup> UFC/mL. Os resultados mostraram que a adição de CO<sub>2</sub> teve um efeito mais importante do que a temperatura de armazenamento no controle do desenvolvimento de psicotróficos. A amostra não adicionada de CO<sub>2</sub> armazenada a 4°C levou 5 dias para atingir a contagem de psicotróficos considerada crítica para o processamento, enquanto que para o leite armazenado a 7°C este tempo foi de 3-4 dias. Por outro lado, na presença de CO<sub>2</sub>, esses tempos se estenderam para 13 e 8 dias para as amostras armazenadas a 4 e 7°C, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Log da UFC/mL da contagem de psicotróficos do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (○) 4°C com CO<sub>2</sub>; (□) 4°C sem CO<sub>2</sub>; (△) 7°C com CO<sub>2</sub>; (▭) 7°C sem CO<sub>2</sub>; (---) contagem de psicotróficos considerada crítica para o processamento do leite.

A adição de CO<sub>2</sub> afetou o tempo de fase lag, o tempo de geração e a taxa de crescimento dos psicotróficos. Observa-se na Figura 3A que na presença de CO<sub>2</sub> o tempo de fase lag dos psicotróficos aumentou em 400% quando o leite foi armazenado a 4°C

e em 140% no leite a 7°C. Simultaneamente, a 4°C na presença do CO<sub>2</sub> o tempo de geração de psicotróficos aumentou em 132% e a taxa de crescimento reduziu em 57%, quando comparado ao leite não adicionado de CO<sub>2</sub> (Figuras 3B e 3C). Esses valores foram de 122% e 55% para o leite cru armazenado a 7°C (Figura 3B e 3C). Este comportamento evidencia a eficiência do CO<sub>2</sub> em retardar o desenvolvimento de psicotróficos especialmente a 4°C. Segundo Arcuri et al. (2008) a maioria dos micro-organismos isolados do leite no Brasil apresentou atividade proteolítica e/ou proteolítica a temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C. Portanto, o CO<sub>2</sub> poderia melhorar a qualidade do leite processado no país. A inibição do desenvolvimento de psicotróficos evitaria defeitos de qualidade nos produtos lácteos processados, causados por enzimas produzidas por esses micro-organismos.



**Figura 3.** (A) Fase lag, (B) tempo de geração e (C) taxa de crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru com e sem adição de CO<sub>2</sub>, armazenados a 4 e 7°C.

### Desenvolvimento da proteólise e lipólise no leite cru

A Tabela 1 apresenta o efeito da adição de CO<sub>2</sub>, da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como da interação entre esses fatores sobre a proteólise e lipólise do leite cru. A adição de CO<sub>2</sub> não afetou significativamente a proteólise do leite cru. O teor médio de caseína como porcentagem da proteína (CN/P) foi de 81,0% e 81,5% para as amostras adicionadas de CO<sub>2</sub> e armazenadas a 4°C e 7°C, respectivamente. Para as amostras sem adição de CO<sub>2</sub> esses valores foram de 80,6% e 81,5%, respectivamente. No entanto, a adição de CO<sub>2</sub> afetou significativamente a lipólise do leite cru, e foi, em média, maior para as amostras sem adição de CO<sub>2</sub>. O tempo de armazenamento influenciou tanto a proteólise como a lipólise, sendo que ambas aumentaram significativamente ao longo do tempo de armazenamento. Entretanto, considerando-se que a interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento foi significativa (p=0,0002), utilizou-se a análise de regressão linear para avaliar tal interação.

Observa-se nas Figuras 4A e 4B que a proteólise e a lipólise aumentaram, respectivamente, 2,2 e 2,7 vezes mais rápido no leite cru sem adição de CO<sub>2</sub> do que no leite adicionado de CO<sub>2</sub>. Maior ação proteolítica

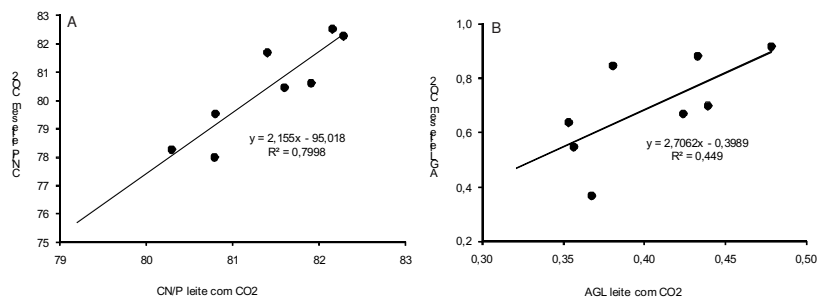
e lipolítica também foi observada por Ma et al. (2003) em leite cru refrigerado sem adição de CO<sub>2</sub> quando comparado ao adicionado de 1500 ppm de CO<sub>2</sub>. A proteólise e a lipólise podem ser causadas tanto por enzimas naturais do leite cru como a plasmina e a lipase lipoprotéica, quanto por enzimas termorresistentes produzidas por psicotróficos (FOX & MCSWEENEY, 1998). A atividade de plasmina não foi avaliada neste experimento, entretanto, a análise de regressão linear mostrou que existe uma correlação significativa (p<0,0001) entre a contagem de psicotróficos e o aumento da proteólise (Figura 5A), representada pelo decréscimo do teor de caseína como porcentagem da proteína (CN/P). Da mesma forma, o aumento da contagem de psicotróficos resultou no aumento significativo (p=0,0007) da lipólise (Figura 5B), representada pelo aumento da concentração de ácidos graxos livres.

As menores taxas de proteólise e lipólise observadas para o leite com adição de CO<sub>2</sub> estão relacionadas à menor contagem de psicotróficos devido à ação antimicrobiana do CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, à redução da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas. As alterações de pH, ponto de congelamento e organolépticas do leite cru causadas pela adição de CO<sub>2</sub> são reversíveis após a dega-

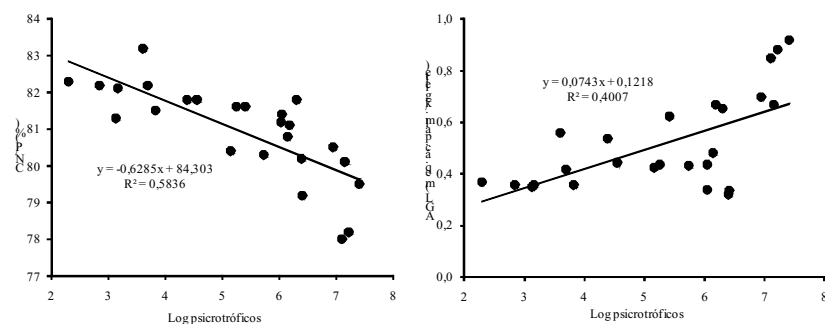
**Tabela 1.** Resultado da avaliação estatística do efeito da adição de CO<sub>2</sub> sobre a proteólise e lipólise do leite cru refrigerado (n=2).

Fontes de variação	Valor de p <sup>1</sup>	
	CN/P <sup>2</sup>	AGL <sup>3</sup>
Tratamento <sup>4</sup>	0,1437	<0,0001
Temperatura de armazenamento <sup>5</sup>	0,1985	0,7023
Tempo de armazenamento	<0,0001	<0,0001
Tratamento x temperatura	1	0,8925
Tratamento x tempo	0,0002	0,0002
Temperatura x tempo	0,3977	0,9495
Tratamento x temperatura x tempo	0,9850	0,9903

<sup>1</sup>p<0,05; <sup>2</sup>CN/P: caseína como porcentagem da proteína; <sup>3</sup>AGL: ácidos graxos livres; <sup>4</sup>Tratamento: leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub>; <sup>5</sup>4°C ou 7°C



**Figura 4.** (A) Correlação entre CN/P do leite com e sem adição de CO<sub>2</sub> (Intervalo de confiança [-0,206; -0,099] com nível de significância de 95%) e (B) Correlação entre AGL do leite com e sem adição de CO<sub>2</sub> (Intervalo de confiança [-0,004; +0,011] com nível de significância de 95%).



**Figura 5.** (A) Correlação entre a CN/P (%) e a contagem de psicotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [-0,857; -0,399] com nível de significância de 95%) e (B) Correlação entre a concentração de AGL (meq. ác. palmítico/kg de leite) e a contagem de psicotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [0,035; 0,113] com nível de significância de 95%).

seificação. Este processo pode ser realizado através da aplicação de vácuo ou pela simples agitação e aquecimento brando (~40-50°C) do leite antes de qualquer processamento (LOSS & HOTCHKISS, 2000).

#### 4 CONCLUSÕES

A adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru retardou o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos e psicotróficos, reduziu a proteólise e a lipólise durante o armazenamento e favoreceu a manutenção da sua qualidade microbiológica e físico-química tanto a 4°C como a 7°C, com maior eficiência a 4°C. Desta forma, a adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru, associada às condições adequadas de higiene, armaze-

namento e transporte viabilizaria a manutenção da qualidade do leite e, conseqüentemente, o recebimento de uma matéria prima de melhor qualidade pelas indústrias brasileiras.

#### SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) addition and storage temperature as well as interactions of these factors on microbial growth, proteolysis and lipolysis of refrigerated raw milk. Raw milk, with and without CO<sub>2</sub> addition was stored in glass bottles at 4 and 7°C. Samples were daily analyzed to standard plate count and psychrotrophic count and every other

day to CO<sub>2</sub> concentration, proteolysis and lipolysis, until standard plate count reached 7,5x10<sup>5</sup> CFU/mL. The standard plate count increased during refrigerated storage time for all treatments. However, to samples stored at 4°C the time required to reach the limit count was 14 days to raw milk with CO<sub>2</sub> addition and 8 days to raw milk without CO<sub>2</sub> addition. For samples at 7°C this time was 8 and 5 days, respectively. Independent of the storage temperature, CO<sub>2</sub> addition extended psychrotrophic lag phase and generation time and decreased growth rate in raw milk, with higher efficiency at 4°C. Milk with CO<sub>2</sub> addition presented lower proteolysis and lipolysis, possibly related to lower psychrotrophic count and reduction of proteinases and lipases production in these samples. CO<sub>2</sub> addition enabled the maintenance of raw milk quality for a longer time and can be used to prevent quality problems in processed products.

**Index Terms:** raw milk; carbon dioxide; psychrotrophic bacteria; proteolysis; lipolysis

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Processo 2008/51431-3). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2001.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of AOAC international. Washington, DC, USA, 1995. v.1-2.

BRASIL (2002). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e o Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel: aprovado pela Instrução Normativa N° 51 de 18/09/2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 08/02/2010.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p.119-163. DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A review of carbon dioxide effects on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v.48, n.6, p.532-537, 1985.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v.52, n.5, p.249-252, 1997.

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

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L., **Applied Dairy Microbiology**. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, p.59-75.

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

KING J. S.; MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide.

**Journal of Dairy Research**, v.49, n.3, p.439-447, 1982.

LANARA. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II - Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. In: SMIT, G. **Dairy Processing: Improving Quality**. Boca Raton: CRC Press, 2000, p.391-416.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO<sub>2</sub> addition to milk on selected analytical testing methods. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.9, p.1959-1968, 2001.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1616-1631, 2003.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.6, p.1932-1940, 2003.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.44-48, 1996.

NOGUEIRA, M. P. (2006) Comissão Técnica de Bovinocultura de Leite. **2005: O ano**

**da reviravolta para o leite**. Disponível em: <<http://www.faep.com.br/comissoes/leite/130206.asp>>. Acesso em: 20/01/2010.

ROBERTS, R. F.; TORREY, G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.1, p.52-60, 1988. RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A.F.; BADA-GANCEDO, J.C.; REYES-GAVILÁN, C.G. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.4, p.1552-1555, 1998.

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

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

SHIPE, W. F.; SENYK, G. F.; FOUNTAIN, K. B. Modified copper soap solvent extraction method for measuring free fatty acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.2, p.193-198, 1980.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.2, p.35-40, 1997.