

URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTERILIZAÇÃO DE LEITE UTILIZANDO CO₂ A ALTA PRESSÃO

GUSTAVO CENI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2012

ESTERILIZAÇÃO DE LEITE UTILIZANDO CO₂ A ALTA PRESSÃO

GUSTAVO CENI

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc

Orientadora

José Vladimir de Oliveira, D. Sc

Orientador

Wagner Luiz Priamo, D. Sc

Membro da banca

Rogério Luis Cansian, D. Sc

Membro da banca

Erechim 2, Março de 2012.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai
Augustinho Ângelo Ceni e minha mãe Sonia
Maria Soliman Ceni, e meu irmão Felipe Ceni,
por sacrificarem seus sonhos em favor dos meus,
e que entre tantas coisas, me ensinaram o valor
da integridade, pelas angústias e preocupações
que passaram por minha causa, pelo amor,
carinho e estímulo, dedico-lhes esta conquista
com gratidão.*

AGRADECIMENTOS

É muito difícil agradecer-se publicamente por uma ajuda recebida, quando esta ajuda se origina de muitas fontes. Posso esquecer-me de alguém ou valorizar alguns em detrimento de outros. Mas como é importante agradecer, o benefício compensa o risco de alguma omissão. Se esta houver, será involuntária e me resta pedir desculpas por ela.

A Deus por iluminar meus caminhos.

Aos orientadores José Vladimir de Oliveira e Clarissa Dalla Rosa pela compreensão, paciência, dedicação, ensinamentos e principalmente pela amizade que foi cultivada durante todos esses anos. Meus sinceros agradecimentos a vocês que jamais mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação.

Aos demais professores do programa de mestrado em Engenharia de Alimentos, Débora de Oliveira, Geciane Toniazzi, Helen Treichel, Márcio Mazutti, Eunice Valduga e Elisandra Rigo, que também contribuíram para a formação profissional.

A minha grande amiga Marceli Fernandes Silva pela paciência, dedicação e companheirismo. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas como você no meu caminho.

Ao professor Claudio Augusto Zakrzewski pela orientação extra e suporte técnico.

A todos os meus amigos dos laboratórios de Termodinâmica e Biotecnologia, pelo convívio e pela amizade. Em especial: Ieda Rottava; Claudio Valério Junior e a Ilizandra A. Fernandes (Sandy).

Aos profissionais da Central de Materiais da Engenharia de Alimentos, Vera, Rose e Douglas. E a secretária do curso Andréia de Brito.

Aos colegas de mestrado da turma de 2010-2012 pelas amizades, conversas, estudos, carinho e contribuições. Em especial aos colegas e amigos Angelise Durigon, Pablo Gustavo Oliveira, Douglas Soares, Juliana Rizzardi, Débora Demartini, Tássio Benazzi, Guilherme Balsan, Helmut Navarro, Naiane Sabenot Marcon, Rosicler Colet.

As alunas de graduação Diane Rigo e Valeria De Bortoli pela ajuda na realização dos ensaios experimentais.

A uma pessoa muito especial em minha vida Walkiria Daros minha namorada o qual passo momentos inesquecíveis e que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pelo tempo dedicado a mim e as nossas conversas de horas.

A CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

Ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim por possibilitar a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É melhor atirar-se a luta em busca de dias
melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo,
do que permanecer estático com os pobres de
espírito, que não lutam, mas também não vencem;
que não conhecer a dor da derrota, mas não ter a
glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de
espíritos, que ao final da jornada na Terra, não
agradecem a Deus por terem vivido, mas
desculpam-se ante Ele por terem simplesmente
passado pela vida.”*

(Robert nesta Marley)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ESTERILIZAÇÃO DE LEITE UTILIZANDO CO₂ A ALTA PRESSÃO

Gustavo Ceni

Março de 2012

Orientadores: **Clarissa Dalla Rosa**

José Vladimir de Oliveira

A eficácia de qualquer técnica de preservação de alimentos é avaliada com base na sua capacidade de erradicar micro-organismos patogênicos presentes e, assim, aumentar a segurança do produto, sem, contudo, produzir alterações indesejáveis no produto. A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima encontrada normalmente no leite cru. Com o processo de esterilização, a enzima é inativada definitivamente. Assim, a detecção da FAL é utilizada na verificação da ocorrência ou não de tratamento térmico do leite. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de esterilização de leite empregando dióxido de carbono (CO₂) em meio pressurizado avaliando diminuição da contagem de *Escherichia coli* ATCC 25922. Os efeitos das variáveis do processo para a inativação da fosfatase alcalina e inativação do micro-organismos foram investigados utilizando a técnica de planejamento experimental. A condição otimizada para a inativação da mesma foram de 70°C e uma relação de 5% Leite/CO₂ com um tempo de residência no reator de 30 min. Utilizando a condição otimizada para verificar a inativação da *Escherichia coli* ATCC 25922 verificou-se uma diminuição de 97% dos micro-organismos no leite tratado.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements of the Master in Food Engineering.

STERILIZATION OF MILK USING HIGH PRESSURE CO₂

Gustavo Ceni

Março de 2012

Advisors: **Clarissa Dalla Rosa**

José Vladimir de Oliveira

The effectiveness of any food preservation technique is assessed based on their ability to eradicate pathogenic micro-organisms present, and thus increase safety of the product, without, however, produce undesirable changes in the product. Alkaline phosphatase (FAL) is an enzyme normally found in raw milk. With the sterilization process, the enzyme is inactivated permanently. Thus, the detection of FAL is used to check the occurrence of heat treatment of milk. The objective of this study was to develop a process for sterilizing milk using carbon dioxide (CO₂) in pressurized medium evaluating count decreased *Escherichia coli* ATCC 25922. The effects of process variables for the inactivation of alkaline phosphatase and inactivation of micro-organisms were investigated using experimental design technique. The optimized conditions for the inactivation of the same were 70°C and a ratio of 5% CO₂/Milk with a residence time in the reactor for 30 min. Using the optimized condition to verify the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 there was a decrease of 97% of micro-organisms in the treated milk.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	5
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE LEITE NO RIO GRANDE DO SUL E DA REGIÃO	7
3.2 LEITE	12
3.3 ÁGUA	13
3.4 LIPÍDIOS	13
3.5 PROTEÍNAS	14
3.6 LACTOSE	14
3.7 MINERAIS.....	14
3.8 VITAMINAS	15
3.9 LEITE TRATADO TERMICAMENTE.....	16
3.10 PASTEURIZAÇÃO	17
3.11 ESTERILIZAÇÃO.....	18
3.11.1 Sistema convencional.....	20
3.11.2 Sistema de fluxo contínuo ou UHT.....	20
3.12 MÉTODO DE AQUECIMENTO INDIRETO.....	21
3.13 MÉTODOS DE AQUECIMENTO DIRETO	21
3.14 PRINCÍPIOS DA ALTA PRESSÃO APLICADA A ALIMENTOS.....	22
3.15 EFEITOS DA ALTA PRESSÃO SOBRE MICRO-ORGANISMOS.....	22
3.16 EFEITOS DA ALTA PRESSÃO NA QUALIDADE DOS ALIMENTOS	24
3.17 O USO DE DIÓXIDO DE CARBONO	24
3.18 TEMPERATURA X PRESSÃO	25
3.19 TIPOS DE MICRORGANISMOS QUE CONTAMINAM O LEITE.....	26
3.20 ENZIMAS UTILIZADAS NO CONTROLE DO GRAU DE AQUECIMENTO DO LEITE	27
3.21 FOSFATASE ALCALINA	28
3.22 PEROXIDASE.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 AMOSTRAS	30

4.2 pH	30
4.3 ACIDEZ DORNIC	30
4.4 PROTEÍNA.....	30
4.5 LACTOSE	30
4.6 MINERAIS – (CINZAS)	31
4.7 FOSFATASE	31
4.7.1 Cálculo e Expressão dos Resultados Fosfatase Alcalina	31
4.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O TRATAMENTO EMPREGADO NO LEITE	32
4.9 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	33
4.9.1 Aparato Experimental	33
4.9.2 Procedimento Experimental	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE	39
5.2 FOSFATASE ALCALINA	40
5.3 AVALIAÇÕES DA INATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES	46
6. CONCLUSÃO	50
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NAS REAÇÕES DE ESTERILIZAÇÃO. -----	34
FIGURA 2 - REATOR UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS. -----	35
FIGURA 3 - VISTA GERAL DA UNIDADE EXPERIMENTAL. -----	37
FIGURA 4 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS MANIPULADAS SOBRE A QUANTIDADE DE FOSFATASE ALCALINA OBTIDA NO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO. -----	42
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVA DE CONTOURNO PARA INATIVAÇÃO DA FOSFATASE. -----	44
FIGURA 6 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS DA DETERMINAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA NO LEITE APÓS O TRATAMENTO DO SEGUNDO PLANEJAMENTO. -----	46
FIGURA 7 - CURVA DE INATIVAÇÃO DA <i>ESCHERICHIA COLI</i> ATCC 25922 APÓS TRATAMENTO COM CO ₂ A 80 BAR E TEMPERATURA DE 50°C.-----	48

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS MICRORREGIÕES PRODUTORAS DE LEITE DO RIO GRANDE DO SUL....	9
TABELA 2 – MICRORREGIÕES DO RIO GRANDE DO SUL QUE MAIS PRODUZIRAM LEITE EM 2007.....	10
TABELA 3 - AS DEZ MICRORREGIÕES DO RS QUE TIVERAM A MAIOR EXPANSÃO E A MAIOR REDUÇÃO NA PRODUÇÃO DE LEITE DE 1990 PARA 2007.....	11
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO GERAL DO LEITE.	13
TABELA 5 - PORCENTAGEM DE ELEMENTOS MINERAIS NO LEITE.....	15
TABELA 6- QUANTIDADES DE VITAMINAS PRESENTES NO LEITE.	16
TABELA 7- VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NOS PLANEJAMENTO 1.	32
TABELA 8 - VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NOS PLANEJAMENTO 2.....	33
TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO DO LEITE.	39
TABELA 10 - CURVA PADRÃO DA FOSFATASE ALCALINA.	40
TABELA 11 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (1) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DE MG DE FENOL E A QUANTIDADE DE FOSFATASE ALCALINA EM MG/ML.	41
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA FOSFATASE ALCALINA DO LEITE.	42
TABELA 13 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2) (VALORES REAIS E CODIFICADOS) COM AS RESPOSTAS DE MG DE FENOL E A QUANTIDADE DE FOSFATASE ALCALINA EM MG/ML.	45
TABELA 14 - RESULTADOS DA CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ATCC 25922 COM VARIAÇÃO DA TAXA DE VAZÃO DO LEITE.	47

1. INTRODUÇÃO

Processos que utilizam o calor como forma de preservação tais como, esterilização, pasteurização, desidratação e defumação, diminuem o crescimento ou inativam os micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Entretanto, podem produzir alterações indesejáveis que afetam o sabor, o aroma, a textura e a cor dos alimentos processados, além de destruir nutrientes, especialmente as vitaminas (Ramos et al., 2003).

Dentre as inovações tecnológicas para preservação de alimentos, encontra-se o tratamento por alta pressão (AP), também conhecido por alta pressão hidrostática (APH) ou alta pressão isostática (API). Neste processo, os alimentos líquidos ou sólidos, com ou sem embalagem, são submetidos a pressões entre 100 e 1000 MPa (1000-10000 bar), sendo que a temperatura do processo durante o tratamento a alta pressão pode ser controlada, podendo atingir temperaturas abaixo de 0°C ou acima de 100°C. O tempo de exposição ao tratamento para produtos comerciais pode variar de pulsos de milissegundos a até mais que 20 minutos (FDA, 2000).

A idéia de utilizar alta pressão no processamento de alimentos não é nova. A primeira menção de alta pressão utilizada como um método de preservação de alimento foi feita por Hite (1899), na qual o leite conservou-se por um longo período após tratamento a 689 MPa por 1 h em temperatura ambiente, obtendo cerca de 6 reduções decimais na contagem bacteriana total.

Em 1990, no Japão, foi lançado o primeiro alimento tratado por alta pressão (geléia de frutas). Recentemente, vários produtos estão sendo lançados, incluindo ostras nos EUA, suco de laranja na França, guacamole no México e leite pasteurizado no mercado inglês (Mertens e Deplace, 1993; Campos et al., 2003).

Leite pasteurizado é um dos alimentos mais consumidos no mundo, devido ao alto valor nutricional e características sensoriais agradáveis. Porém sua baixa vida de prateleira é um obstáculo para a sua comercialização em grandes regiões. A pasteurização do leite para destruição de micro-organismos patogênicos e redução da microbiota natural do leite, é tradicionalmente aplicada com uso do calor (72-75°C/ 15-20s). Uma das tecnologias atualmente estudadas como alternativa para o tratamento pelo aquecimento é a alta

pressão, uma alternativa que pode trazer melhores benefícios microbiológicos e ainda melhores características nutricionais e sensoriais do que a pasteurização tradicional (Hernández, 2005).

O processo que emprega alta pressão é livre de aditivos e pode operar com temperaturas elevadas ou reduzidas. Esta técnica é baseada em 2 princípios básicos da física: o primeiro, teoria de Le Chatelier, se traduz pela diminuição do volume, quando se eleva a pressão do meio ou vice-versa. Exemplo disso é a água, que diminui seu volume em 15% quando submetida a uma pressão igual a 600 MPa a temperatura constante. No segundo princípio, pressão isostática ou teoria de Pascal, a pressão é transmitida instantânea e uniformemente, independentemente do tamanho e forma do produto, diferente da transferência de calor em que o volume do produto interfere no tempo de aquecimento (Hayashi et al., 1989; Tauscher, 1995). Outro fato importante da API é a variação de temperatura que ocorre durante o período de compressão (aquecimento de até $\pm 3^{\circ}\text{C}$ para cada 100 MPa) e descompressão (resfriamento) do equipamento e do produto que está sendo tratado. Este gradiente é chamado de aquecimento ou resfriamento adiabático (Knorr, 1993).

A efetividade do tratamento pela alta pressão é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento, como o tempo de tratamento, taxa de compressão/descompressão, temperatura, número de pulsos, composição do alimento e o estado fisiológico dos micro-organismos a serem inativados, por isso, o adequado conhecimento do processo e do alimento são essenciais para a produção de alimentos com alta qualidade (Smelt et al., 2002).

Independentemente do sistema utilizado para o processamento por API, o equipamento básico é composto por 4 componentes: recipiente de pressão, sistema gerador de pressão, dispositivo para controle da temperatura e sistema operacional. A parte mais importante é o recipiente, pois é ele que suporta toda a pressão aplicada no processo. Os recipientes são fabricados a partir de um bloco de liga de aço, com capacidades de suportar diferentes pressões. O sistema gerador de pressão causa um leve aumento da temperatura do alimento, sendo este um dos motivos pelo qual se faz necessário o dispositivo de controle da temperatura. A outra função deste dispositivo é o uso de diferentes faixas de temperatura para o processo ($0-100^{\circ}\text{C}$), o qual funciona pelo bombeamento de água fria ou quente ao redor do recipiente de pressão (Mertens e Deplace, 1993).

Quanto aos modos de operação, a alta pressão pode ser dividida em 3 categorias: batelada, semicontínuo e contínuo. O processo por batelada é o mais simples: uma quantidade de produto é pressurizada por vez. Esta pressurização pode ser direta ou indireta. No processo direto (*bulk processing*), o próprio alimento é o meio pressurizante. Exemplos são os alimentos líquidos, como os sucos e o leite, que são embalados após o processamento por alta pressão em sistema asséptico. O processo semicontínuo, no qual vários recipientes de pressão são colocados em sequência, enquanto alguns estão em pressão constante, outros estão sendo pressurizados, carregados ou descarregados, reduzindo o tempo entre os processos e permitindo a recuperação de energia. No equipamento do processo semicontínuo, o pistão que gera a pressão fica livre, podendo atuar sobre vários recipientes. O processo por batelada e o semicontínuo podem ser utilizados tanto para alimentos líquidos como para sólidos. O processo contínuo é visto como um método usado a fim de garantir maior quantidade fabricada de um determinado produto durante o menor espaço de tempo possível. Um processo contínuo é coerente, constante e ininterrupto, em contraste com o processamento em lote. (Fao, 2001).

Assim, o processamento a alta pressão oferece à indústria de alimentos uma tecnologia que pode atingir as características desejáveis de segurança alimentar, como nos alimentos tratados termicamente, e ainda satisfazer a demanda dos consumidores por alimentos com características de alimento fresco. Para a seleção das condições de processamento mais adequado para um determinado produto alimentar, as características sensoriais devem ser levadas em consideração (Polydera et al., 2003). O aumento das pressões de tratamento leva a um aumento geral de inativação microbiana, mas em pressões mais elevadas também pode ocorrer um maior nível de desnaturação de proteínas e outras mudanças potencialmente prejudiciais à qualidade dos alimentos que podem afetar a aparência e a textura dos alimentos, em comparação ao produto não processado.

O efeito biocida da alta pressão empregando dióxido de carbono (CO₂) foi estudado em várias espécies de bactérias e relatado por Tarafa et. al. (2010). O uso de CO₂ como um agente esterilizante tem apresentado vários benefícios. Em primeiro lugar, o CO₂ não é inflamável e não é tóxico em baixas concentrações, não requer nenhum tratamento especial ou ventilação, e não deixa resíduos tóxicos, além de ser inerte. O CO₂ tem uma temperatura crítica baixa (31,1°C) (McHugh e Krukonis, 1993) próxima à temperatura ambiente, de modo que a degradação térmica não é um problema quando o

processo é realizado em temperaturas próximas ao ponto crítico. Devido a estes benefícios, o CO₂ tem sido utilizado para esterilização de biomateriais. Além disso, no estado supercrítico, o CO₂ tem baixa viscosidade ($3-7 \times 10^{-5} \text{ Nsm}^{-2}$) e tensão superficial igual a zero (McHugh e Krukoni, 1993), para que ele possa penetrar rapidamente em estruturas complexas e materiais porosos. Finalmente, o CO₂ é barato e facilmente disponível, o que pode viabilizar o seu emprego na esterilização, conforme ressaltado no estudo realizado por Matthews et al. (2001).

Levando-se em conta a baixa temperatura e ausência de resíduos tóxicos, a esterilização utilizando CO₂ pode ser melhor que a esterilização empregando vapor a óxido de etileno para certas aplicações. A técnica de esterilização utilizando CO₂ é apontada por Zhang et al. (2006) como uma opção para a esterilização de biomateriais para a área médica.

2. OBJETIVO

Avaliar o uso de CO₂ a alta pressão para a esterilização de leite cru visando minimizar os efeitos das altas temperaturas empregadas no tratamento convencional.

2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de um sistema reacional para esterilização do produto.
- Testes no reator de esterilização e avaliações dos parâmetros pertinentes ao processo.
- Otimização do processo de esterilização em sistema desenvolvido na etapa anterior.
- Caracterização e desenvolvimento de técnicas analíticas para avaliação e acompanhar as alterações do produto (leite) ao longo do processo.
- Acompanhamento das alterações físico-químicas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Induzida pelo desenvolvimento de um novo ambiente competitivo internacional, resultante da adoção de políticas econômicas mais liberais, a economia brasileira passou por profundas mudanças desde o início dos anos de mil novecentos e noventa. No setor de laticínios ocorreu também a desregulamentação do mercado, a qual alterou as regras para os produtores e o restante do sistema (Filho et al, 2011).

A desregulamentação serviu de incentivo à entrada de novas empresas no setor, já que permitiu aos produtores atuarem com maior liberdade, pois o tabelamento de preços do leite e de seus derivados agia como um desestímulo à criação de produtos de maior valor agregado, visto que o preço era determinado pelo governo. Assim, com a liberalização dos preços, as agroindústrias incentivaram e passaram a fazer pagamentos diferenciados pela matéria-prima, observando as características do produto (Carvalho, 2002).

Guimarães (2008) comenta que a determinação governamental de abrir o mercado levou o Brasil a despertar para o tema competitividade. Vivendo anteriormente num aspecto competitivo basicamente restrito ao território nacional, as cooperativas brasileiras de leite, de capital nacional, se viram obrigadas a se reestruturar sob a ameaça de desaparecerem. A indústria de laticínios expandiu após a década de 1990, apresentando empresas gigantes, concentradoras e com a capacidade de atender a todo o mercado nacional e até mesmo exportar, fato até então raro no setor.

A formação do Mercosul também contribuiu para o surgimento de mudanças importantes no setor, uma vez que trouxe a extinção de tarifas diferenciadas para os países e a implantação do Real em 1994 gerou uma forte valorização da moeda brasileira. Com isso, o país passou a importar leite, especialmente dos países vizinhos, Uruguai e Argentina. Em 1999, ocorreu uma forte desvalorização da moeda brasileira e o produto gerado internamente voltou a ser competitivo. Diante da nova situação, Carvalho (2002) afirma que o produtor de matéria-prima teve que realizar investimentos para aumentar a produtividade e/ou a produção em face das exigências da indústria, sob pena de ser excluído da cadeia produtiva.

Ainda que os preços pagos ao produtor possam afetar negativamente o seu ânimo e a sua autoestima, a produção de leite pode ser considerada uma atividade estratégica para o desenvolvimento, principalmente quando se trata das regiões coloniais do Estado do Rio Grande do Sul. A produção de leite, portanto, tem um lugar assegurado em agriculturas capitalizadas e produtivas, podendo-se levantar como hipótese que isso só não é uma realidade também no Brasil por não se ter dispensado um tratamento adequado ao setor (Silva Neto; Frantz, 2003).

É interessante observar também que países mais competitivos, como a Nova Zelândia e a Austrália, desenvolveram um modelo próprio de produção de leite, com características diferentes do modelo desenvolvido e preconizado pelos norte-americanos e canadenses, tendo este último historicamente maior prestígio e influência entre os pesquisadores e difusores da pecuária leiteira no Brasil. Pelas suas condições ecológicas e socioeconômicas, o Rio Grande do Sul possui condições excepcionais para desenvolver um modelo de produção de leite específico e altamente competitivo (Basso et al, 2002).

As afirmações de Carvalho (2002) e de Guimarães (2008) sobre mudanças no sistema agroindustrial do leite (SAG) servem para todos os sistemas dispersos no território nacional. O SAG do Rio Grande do Sul, como aponta Silveira e Pedrazzi (2009), também não ficou imune ao processo, e isto abre uma importante agenda para estudos regulares e sistemáticos, já que a importância social deste sistema não pode ser ignorada.

3.1 Capacidade de Produção de Leite no Rio Grande do Sul e da Região

No Rio Grande do Sul, as agroindústrias processadoras de leite fluído reestruturaram-se e focaram a produção para a venda do leite longa vida, adaptando-se ao novo cenário brasileiro. Finamore e Maroso (2004) constataram que no período de 1990 a 2003 houve aumento na produtividade e na produção de leite no Estado, decorrente do melhoramento genético, da nutrição animal e de avanços tecnológicos, com estabilização do rebanho de vacas ordenhadas.

Em 2005, 74.118 famílias gaúchas tinham o leite como sua base de renda mensal, sendo o Rio Grande do Sul o terceiro maior produtor do Brasil, com sete milhões de litros por dia. A indústria gaúcha possui 232 empresas, exporta leite para 25 países e gera 686.904 empregos diretos e indiretos Suzigan et al, (2003).

Segundo dados do IBGE (2009), a produção de leite no Brasil vem crescendo continuamente e, no período de 1990 a 2007, aumentou 80,45%. As regiões Sudeste e Sul do país continuam sendo as mais importantes na geração do produto e, juntas, responderam por, aproximadamente, dois terços da produção nacional de leite de 2007. Entretanto, no período de 1990 a 2007, a expansão da produção no Sul foi superior a ocorrida no Sudeste, 130,22% contra 41,60%, respectivamente. Esse desempenho diferenciado das regiões fez com que o Sul aumentasse a sua participação no total nacional do produto de 22,52% em 1990 para 28,73% em 2007 e a sudeste perdesse participação de 47,80% para 37,51%.

Dentro da região Sul, o desempenho dos estados na produção de leite foi diferente no período (1999 – 2007), sendo o de Santa Catarina o melhor (186,83%), seguido por Paraná (132,83%) e Rio Grande do Sul (102,76%). Mesmo com crescimento maior na produção, em 2007 Santa Catarina teve a menor participação na produção da região (24,84%), com Paraná em segundo (35,96%) e o Rio Grande do Sul em primeiro (39,20%). Quanto à produtividade por vaca ordenhada, os estados do Sul têm as três maiores do Brasil, sendo a maior em Santa Catarina (2.321 litros), seguida pelo Rio Grande do Sul (2.221 litros) e em terceiro o Paraná, com 1.997 litros. O Brasil como um todo teve uma produção de 1.237 litros por vaca em 2007.

A crescente produção de leite destes últimos anos no Rio Grande do Sul vêm ocorrendo de forma desigual, mudando o mapa regional na geração do produto. A microrregião de Passo Fundo tornou-se a região mais especializada, e vem acompanhada, em ordem decrescente de importância, pelas regiões de Ijuí, Santa Rosa, Não-Me-Toque, Três Passos, Sananduva e Cerro Largo. Estas regiões são de especialização recente, já que atingiram o coeficiente 2 nos anos de 2000 e/ou 2005 (Tabela 1). Por outro lado, Lajeado–Estrela, Gramado–Canela e Vacaria se tornaram não especializadas.

Tabela 1 – Principais microrregiões produtoras de leite do Rio Grande do Sul.

Microrregião	1990	1996	2000	2005
Passo Fundo	0,91	1,01	1,58	3,07
Ijuí	1,22	1,67	2,02	2,77
Santa Rosa	1,48	1,73	2,79	2,71
Não-Me-Toque	0,81	1,90	2,46	2,40
Três Passos	0,92	1,59	1,89	2,21
Sananduva	1,02	0,91	1,22	2,21
Cerro Largo	1,20	1,95	2,02	2,03
Lajeado-Estrela	2,41	1,86	1,75	1,53
Gramado-Canela	2,15	2,18	1,67	1,47
Vacaria	2,77	0,86	0,69	0,48

Fonte: Elaborada por (Filho et al. 2011) com dados a partir do IBGE (2009) e da FEE (2009).

As microrregiões especializadas na produção de leite em 2005 são próximas e se localizam na mesorregião Noroeste do Rio Grande do Sul. A produção de leite vem crescendo continuamente no Estado desde 1990 e atingiu em 2007 a produção de 2.943.684 bilhões de litros, um crescimento de 102,76%. No mesmo período, a produção por vaca ordenhada aumentou 79,58%, passou de 1.237 litros em 1990 para 2.221 litros em 2007, e o número de vacas ordenhadas cresceu 12,91%. A pesquisa também revelou que em 19 das 35 microrregiões o número de vacas ordenhadas em 2007 é menor do que o de 1990, e que as regiões de Restinga Seca, Santa Cruz do Sul, Cachoeira do Sul, São Jerônimo e Osório tiveram queda na produtividade.

Passo Fundo é a microrregião mais importante, pois, produziu 325.626 mil litros de leite em 2007 e teve uma expansão da atividade no período 1990/2007 igual a 430,44%. Além disso, teve a maior produtividade em 2007 e o maior incremento da mesma no período, respectivamente, 3,982 litros por vaca ordenhada e 198,17%. Estes dados mostram que a região é especializada e que a atividade vem se expandindo, corroborando com os resultados obtidos pelo quociente locacional IBGE (2009).

As microrregiões de Não-Me-Toque, Guaporé e Cruz Alta também ultrapassaram a produção de três mil litros de leite por vaca ordenhada em 2007 e apresentaram um

aumento importante de produtividade: Não-Me-Toque (3.938 litros; 123,45% de crescimento); Guaporé (3.346 litros; 144,27%) e Cruz Alta (3.190 litros; 133,47%).

Em termos de volume produzido, as dez microrregiões com maior produção de leite em 2007 são: Passo Fundo, Lajeado-Estrela, Três Passos, Erechim, Guaporé, Santa Rosa, Frederico Westphalen, Ijuí, Cruz Alta e Caxias do Sul (Tabela 2). Estas regiões produziram juntas 61,96% do leite gerado no Estado, e fazem parte das mesorregiões Noroeste e Nordeste, exceto a microrregião de Lajeado – Estrela, que faz parte da mesorregião Centro Oriental.

Tabela 2 – Microrregiões do Rio Grande do Sul que mais produziram leite em 2007.

Microrregião	Mil litros	Microrregião	Mil litros
Passo Fundo	325.626	Santa Rosa	172.725
Lajeado – Estrela	216.844	Frederico Westphalen	159.953
Três Passos	188.249	Ijuí	144.414
Erechim	184.929	Cruz Alta	129.232
Guaporé	178.038	Caxias do Sul	123.962

Fonte: Elaborada por (Filho et al. 2011), com dados do IBGE (2009).

Portanto, a microrregião de Passo Fundo possui o maior volume produzido e a maior produtividade por vaca ordenhada em 2007, e a maior taxa de crescimento da produtividade e da produção de 1990 para 2007 (ver Tabela 3). Além disso, tem quatro municípios entre os vinte de maior produção do Estado, sendo Marau o maior de todos. Os demais municípios são: Casca, Ibiraiaras e Vila Maria. Também chama atenção a taxa de crescimento da produção de leite nestes municípios, pois, nos últimos cinco anos (2002/2007), Casca aumentou a produção em 78,66%, Ibiraiaras em 139,73%, Marau em 45,97% e Vila Maria gerou 83,52% a mais de leite.

Na Tabela 3 é visível a expansão apresentada na produção de leite por regiões menos especializadas na geração do produto, mas que em breve possivelmente estarão entre as mais especializadas, como é o caso de Carazinho e Guaporé.

Tabela 3 - As dez microrregiões do RS que tiveram a maior expansão e a maior redução na produção de leite de 1990 para 2007.

Microrregião	%	Microrregião	%
Passo Fundo	430,44	Osório	-62,83
Carazinho	404,52	Cachoeira do Sul	-48,50
Sananduva	320,67	Camaquã	-45,76
Não-Me-Toque	273,72	São Jerônimo	-32,77
Guaporé	269,80	Porto Alegre	-30,13
Três Passos	211,45	Santa Cruz do Sul	-28,68
Soledade	208,90	Campanha Central	-26,52
Santiago	189,12	Restinga Seca	-23,29
Frederico Westphalen	166,86	Santa Maria	-20,10
Ijuí	164,63	Serras de Sudeste	-18,36

Fonte: Elaborada por (Filho et al. 2011) com dados do IBGE (2009).

Entre as regiões de maior redução na produção de leite do Estado estão Osório, Cachoeira do Sul e Camaquã, todas com mais de 45%. Portanto, verifica-se que algumas regiões apresentam uma importante expansão na produção de leite e outras uma forte contração, o que também contribui para explicar a especialização na produção verificada no Rio Grande do Sul (Filho et al. 2011).

O principal argumento em defesa do estímulo à produção de leite como estratégia para a promoção do desenvolvimento em algumas regiões do Estado se fundamenta no fato de ela se constituir numa atividade imprescindível para a construção de uma sociedade economicamente mais produtiva, socialmente mais justa e territorialmente mais equilibrada (Frantz e Silva Neto 2005).

A cadeia produtiva de leite no Rio Grande do Sul, onde este produto se mostra com principal fonte de renda é representada por um grande numero de médios e grandes produtores (Basso et al., 2002).

3.2 Leite

O leite produzido pelo animal varia quanto ao volume e quanto à relação entre os seus diversos componentes. As variações quanto à composição do leite dependem dos fatores: espécie animal, raça, individualidade animal, intervalo entre ordenhas, variação durante a ordenha, diferenças entre os quartos, período de lactação, influência das estações, alimentação, temperatura, doenças, idade do animal e condições climáticas (Pinheiro & Mosquim, 1991).

Defeitos na qualidade de produtos lácteos têm sido atribuídos a altas contagens bacterianas no leite cru e a produção de leite de alta qualidade deve ser a prioridade para estabelecer um forte mercado para o leite e derivados, uma vez que, a qualidade do leite cru determina a qualidade dos produtos lácteos (Santos; Bergmann, 2003a).

O perfil microbiológico do leite cru está relacionado com a vida útil dos produtos lácteos, com o desenvolvimento de sabores indesejáveis no leite e derivados e em menor escala, com a diminuição no rendimento industrial (Hoffmann et al., 1999). Santana et al. (2001) comentam que no Brasil, o leite “in natura” em geral, apresenta altas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento (Xavier et al., 2000). Sendo o leite praticamente o único alimento de origem animal costumeiramente ingerido sem aquecimento, e está em contato íntimo com muitas pessoas durante os processos de produção e distribuição, as oportunidades para a introdução de micro-organismos patogênicos são numerosas (Silva, 1999).

Entretanto, pela sua riqueza em nutrientes, constitui-se em importante fonte alimentar para o homem e excelentes meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos e esta qualidade e a conservação deste alimento estão diretamente relacionados com a sua carga microbiana (Timm et al., 2003).

O leite é uma emulsão de glóbulos graxos, estabilizado por substâncias albuminóides num soro que contém em solução: um açúcar - a lactose, matérias protéicas, sais minerais e orgânicos e pequenas quantidades de vários produtos, tais como: lecitina,

uréia, aminoácidos, ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, álcool, lactocromo, vitaminas, enzimas, e outros (Behmer, 1984).

A composição do leite é muito equilibrada, tanto qualitativa como quantitativamente, sendo o alimento biológico por excelência entre outras como mostra a tabela 4 (Santos; Bergmann, 2003b).

Tabela 4 - Composição geral do leite.

Composição	Média (%)	Variação (%)
Água	87	85,5 - 89,5
Lipídios	3,8	2,5 - 6,1
Proteínas	3,5	2,6 – 5
Lactose	5	3,6 – 5,5
Minerais	0,7	0,6 – 0,9

Fonte: Behmer, 1984.

3.3 Água

A água constitui, em volume, o principal componente do leite. Entra em média na percentagem de 87,5%, influenciando sensivelmente na densidade do leite. Como causa da variação da percentagem de água na composição do leite salientam-se os seguintes fatores: a raça do gado e o tempo de lactação (Behmer, 1984).

3.4 Lipídios

Os lipídios são constituídos por uma mistura de substâncias relativamente diversas, quanto à estrutura química, apresentando, como característica comum, a solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Os lipídios constituem qualitativa e quantitativamente a fração mais variável do leite e pode modificar-se durante a ordenha, sendo que o primeiro leite é relativamente magro (0,7%), enquanto que o último ordenhado é muito gordo (11%) (Pinheiro & Mosquim, 1991).

A matéria gorda do leite é formada de glóbulos de diversos tamanhos, que se encontram em suspensão no líquido, dando-lhe aspecto emulsivo e opaco. Tem o peso específico de 0,93 a 15°C, funde-se a 33°C e solidifica-se entre 20 a 25°C. Por ser menos

densa a matéria gorda flutua quando o leite está em repouso, constituindo em grande parte o que se chama nata-creme (Behmer, 1984).

A presença da gordura é um fator importante para determinar a palatabilidade dos alimentos. A gordura láctea é particularmente importante neste aspecto, porque contém um número alto de lipídios de tamanho molecular pequeno, de ácidos gordurosos de cadeia curta e seus derivados que contribuem ao sabor, aroma e no caso dos lipídios para a sensação na boca (Varnam & Sutherland, 1995).

3.5 Proteínas

As proteínas do leite vêm despertando interesse, cada vez maior, sob o ponto de vista econômico e nutricional. A demanda crescente de derivados lácteos providos de teores elevados deste componente, a exemplo de queijos e outros produtos alimentícios, demonstra uma maior conscientização do povo quanto ao uso de proteínas balanceadas, de sabor agradável e a baixo custo (Pinheiro & Mosquim, 1991).

O leite contém aproximadamente, 3,5% de proteínas, das quais 85% são constituídas pelas caseínas e 15% pelas proteínas do soro (Pinheiro & Mosquim, 1991).

3.6 Lactose

A lactose é um dissacarídeo característico do leite, sendo considerado quase que exclusivo deste produto. Este carboidrato é obtido pela reação (ligação covalente) de alfa ou da beta-glucose com a beta-galactose. A sua concentração, embora relativamente constante, varia de 4,4 a 5,2% (média 5,0%), depende do teor de sais no leite com os quais mantém a pressão osmótica igual à do sangue (Pinheiro & Mosquim, 1991).

A lactose é uma importante fonte de energia na dieta e pode facilitar a absorção do cálcio. Porém, o uso de lactose como fonte de energia está limitado pela porcentagem relativamente alta de pessoas intolerantes a lactose (Varnam & Sutherland, 1995).

3.7 Minerais

O leite contém, em níveis elevados de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio, magnésio e (macroelementos) e, em pequenas concentrações (microelementos) o alumínio, bromo, zinco, manganês e ferro, de modo geral, associados às proteínas do produto (Pinheiro & Mosquim, 1991).

Tabela 5 - Porcentagem de elementos minerais no leite.

Elemento	%
Cálcio	0,13
Fósforo	0,10
Potássio	0,15
Magnésio	0,012
Cloro	0,10
Sódio	0,05
Cobre	0,00002
Ferro	0,00005
Enxofre	0,03

Fonte: Pinheiro & Mosquim, 1991.

As características de qualidade dos produtos lácteos, um dos principais itens da dieta de crianças, devido à qualidade de suas proteínas, e de seu teor elevado em cálcio, magnésio e fósforo, embora pobres em cobre e ferro, dependem muito da relação entre os seus diversos sais (Pinheiro & Mosquim, 1991).

3.8 Vitaminas

O leite é uma fonte de vitaminas lipossolúveis, A, D e E, e de vitaminas hidrossolúveis C, B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, biotina e ácido fólico. Contém a variedade mais completa de vitaminas, porém estas se encontram em pequenas quantidades (Veisseyre, 1988).

O leite contribui significativamente para atender as necessidades de vitamina A do homem e possui quantidades relativamente grandes de vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina B1 e B2, enquanto outras pouco contribuem para atender as necessidades do homem, a exemplo da C e do ácido nicotínico (Pinheiro & Mosquim, 1991).

Tabela 6- Quantidades de vitaminas presentes no leite.

Vitaminas	mg/l de leite
Vitamina A	0,38
Vitamina B ₁	0,44
Vitamina B ₂	1,70
Vitamina B ₆	0,50
Vitamina B ₁₂	0,004
Vitamina C	15,00
Vitamina D	0,04
Vitamina E	0,98
Ácido pantotênico	0,30
Niacina	0,94
Biotina	0,035
Ac. Fólico	0,003

Fonte: Pinheiro & Mosquim, 1991.

3.9 Leite Tratado Termicamente

A maioria dos alimentos que são consumidos pelo homem, tanto os de origem animal como de origem vegetal, contêm micro-organismos que poderão ser incorporados a esses alimentos, durante qualquer uma das etapas de sua produção (Silva, 2000).

Os métodos de conservação, que utilizam o calor, visam principalmente à eliminação dos micro-organismos indesejáveis, que se encontram no alimento. A aplicação dos processos de conservação pelo calor está condicionada ao grau adequado de temperatura, ao tempo de sua exposição, às diferentes características dos produtos a serem submetidos aos tratamentos, como também a resistência térmica dos micro-organismos a serem destruídos. A intensidade e o tempo de exposição ao calor, além de sua vigorosa ação sobre os micro-organismos, poderão alterar também o valor nutritivo e modificar a natureza histológica, física e química do alimento, reduzindo as suas qualidades sensoriais e nutricionais, tornando-o inadequado ao consumo humano e conseqüentemente, reduzindo o seu valor comercial. Portanto, a aplicação do calor como método de conservação

necessita de um rigoroso controle, sob pena de destruir o alimento, ao invés de contribuir para a sua conservação (Silva, 2000).

Segundo o grau de tratamento térmico, que permite aumentar o tempo de conservação, se distinguem dois tipos de leite, o leite pasteurizado e o leite esterilizado, (Amiot, 1991).

3.10 Pasteurização

A pasteurização é um tratamento térmico que persegue duplo objetivo: obter um leite saudável e prolongar sua vida útil. O processo de pasteurização consiste na aplicação de um tratamento térmico no leite, com a finalidade de destruir os micro-organismos patogênicos e parte da flora banal do leite, evitando a disseminação de doenças, preservando as características físico-químicas pela destruição quase total de sua microbiota normal ou saprófita conjuntamente com a inativação de algumas enzimas (Pinheiro & Mosquim, 1991).

É um tratamento térmico que destrói parte, mas não todas as células vegetativas dos micro-organismos presentes no alimento. Este tratamento é usado quando processos mais rigorosos poderiam afetar as suas propriedades sensoriais e nutricionais. É utilizado para destruir micro-organismos patogênicos ou deterioradores de baixa resistência ao calor (Amiot, 1991; Silva, 2000).

A pasteurização é um tratamento térmico relativamente suave (temperaturas geralmente inferiores a 100°C), que é utilizado para prolongar a vida útil dos alimentos durante vários dias ou vários meses. Este método, que conserva os alimentos por inativação de suas enzimas e destruição dos micro-organismos termossensíveis (por exemplo: bactérias não esporuladas, leveduras e mofos), provoca mudanças mínimas no valor nutritivo e nas características sensoriais do alimento em questão (Silva, 2000).

A temperatura e o tempo empregados na pasteurização dependem de vários fatores como: pH do alimento, sua composição química, resistência térmica de enzimas e de micro-organismos a serem destruídos, a resistência do próprio alimento a altas temperaturas e a vida-de-prateleira que se deseja para o produto depois da pasteurização (Silva, 2000).

As "temperaturas e tempos" dos diversos processos de aquecimento do leite foram organizados para serem suficientes para a destruição da *Coxiella burnetti*, que é dos germes patogênicos um dos mais resistentes, sem, contudo modificar os componentes do leite (Behmer, 1984).

Com relação ao tempo e a temperatura a ser utilizado, o processo pode ser realizado de duas maneiras. A pasteurização lenta a baixas temperaturas, denominado LTLT (Low Temperature Long Time) processo realizado em temperaturas próximas de 63°C por 30 minutos e a pasteurização rápida a altas temperaturas, esse processo é denominado HTST (High Temperature Short Time) realizado a 72°C por 15 segundos (Silva, 2000; Varnam & Sutherland, 1995).

A pasteurização lenta é um processo de pouca utilização industrial, continua sendo empregada a nível laboratorial e pelos pequenos produtores rurais, na pasteurização do leite (Silva, 2000).

A pasteurização rápida tem sido largamente utilizada nas grandes indústrias, principalmente nas que operam com grandes volumes como as usinas de laticínios. Essa operação é realizada em trocadores de calor de placas ou de tubos, sob alta pressão e resfriamento, logo depois do tratamento térmico, sendo que, toda a operação é realizada no mesmo equipamento (Silva, 2000).

Imediatamente após a pasteurização, o produto deve ser acondicionado em embalagens apropriadas, de acordo com o produto e com o mercado a que se destina para evitar a sua recontaminação. Como a pasteurização não elimina todos os micro-organismos presentes, o alimento deve ser mantido sob refrigeração, até sua utilização final (Silva, 2000).

3.11 Esterilização

A esterilização pelo calor é a operação unitária na qual os alimentos são aquecidos a uma temperatura suficientemente elevada, durante minutos ou até mesmo segundos, para destruir micro-organismos e inativar enzimas capazes de deteriorar o produto durante o armazenamento. Os alimentos estabilizados por este sistema possuem uma vida útil superior a seis meses. As melhoras nos processos tecnológicos de esterilização têm a

finalidade de reduzir efeitos não desejados sobre os componentes nutritivos e as características sensoriais dos alimentos, diminuindo o tempo de tratamento dos produtos envasados ou esterilizados a granel em sistemas assépticos (Fellows, 1994).

A esterilização dos alimentos envasados provoca modificações tanto no seu valor nutritivo como nas suas características sensoriais. Os melhores processos são aqueles capazes de promover a eliminação de micro-organismos patogênicos e deterioradores e a inativação de enzimas, contudo provocar modificações indesejáveis nas características gerais das matérias-primas submetidas ao tratamento (Silva, 2000).

Para definir o tempo de tratamento que deverá ser aplicado a um alimento, faz-se necessário conhecer a resistência térmica, tanto dos micro-organismos como das enzimas presentes. É necessário ainda conhecer a velocidade de penetração de calor, que é uma função de diversos parâmetros assim como o estado físico do alimento. É importante conhecer também as propriedades térmicas do alimento, do material de envase e o tamanho do recipiente (Silva, 2000).

A temperatura de esterilização é aquela suficiente para conseguir a morte térmica dos micro-organismos. Nos processos de esterilização de alimentos, os esporos, principalmente os bacterianos, oferecem uma resistência adicional à perda de suas funções reprodutivas, portanto, a esterilização não elimina totalmente a flora microbiana, restando, porém os micro-organismos termorresistentes e, conseqüentemente, os seus esporos, por este motivo, o processo tem sido chamado de esterilização comercial (Silva, 2000).

O termo “esterilização comercial” indica que o alimento é microbiologicamente estável, visto que os micro-organismos que sobreviveram à esterilização são espécies termófilas e só conseguem se desenvolver em temperaturas superiores a 45°C e, portanto, não são capazes de se desenvolver nas condições normais de armazenamento do leite (Silva, 2000).

É conveniente que a esterilização venha precedida por uma pasteurização a alta temperatura, a pré-esterilização, destinada a eliminar a maioria dos germes em condições térmicas mais toleráveis. É sabido que a intensidade e a duração média de aquecimento a que tem sido submetido o leite para sua esterilização depende em certa medida, de sua população microbiana e, especialmente, do número de esporos (Varnam & Sutherland, 1995; Veisseyre, 1988). Há pelo menos dois sistemas básicos de esterilização, o sistema

convencional e o sistema de fluxo contínuo ou UHT (Ultra High Temperature) (Pinheiro & Mosquim, 1991).

3.11.1 Sistema convencional

No sistema convencional, o leite é devidamente embalado em um recipiente hermeticamente fechado, impermeável aos líquidos e aos micro-organismos e esterilizado depois de envasado por meio do calor, que deve destruir as enzimas e os micro-organismos patógenos. A esterilização se realiza a uma temperatura de 109 a 120°C por um período de 15 a 40 minutos. Este método é pouco utilizado nas indústrias (Pinheiro & Mosquim, 1991).

A esterilização convencional propicia o escurecimento do produto, devido à reação de *Maillard* que envolve a condensação dos grupos amino dos aminoácidos das proteínas com o grupo hemi-acetal da lactose, resultando em sabor de cozido ou de caramelo, devido à decomposição dos polímeros resultantes da reação (Pinheiro & Mosquim, 1991).

3.11.2 Sistema de fluxo contínuo ou UHT

O leite UHT começou a ser fabricado para cobrir a demanda de um leite que permaneceria estável durante um longo período de tempo armazenado a temperatura ambiente e que ademais não apresentaria o desagradável gosto do leite esterilizado em garrafas (Varnam & Sutherland, 1995).

O leite UHT é definido como leite homogeneizado, submetido durante 2 a 4 segundos a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, sendo imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C, e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 1996).

Por esse processo as bactérias, inclusive as esporuladas, são eliminadas. A esterilização absoluta não existe, uma vez que esporos extremamente termorresistentes podem permanecer no produto, porém em condições tais que não interferem na durabilidade do produto (Veisseyre, 1988).

O processamento UHT inicia-se com um pré-aquecimento e desaeração do leite, pois a presença de oxigênio pode comprometer a viabilidade de alguns nutrientes, logo em seguida deve ser utilizado o aquecimento (Neto et al., 2002).

O método de esterilização em fluxo contínuo se baseia na eficácia bacteriológica de um tratamento térmico a alta temperatura durante um tempo muito curto. Os métodos de aquecimento utilizados para a esterilização UHT são de dois tipos: aquecimento indireto em trocador de calor tubular ou de placas e aquecimento direto por contato do leite com vapor de água quente (Veisseyre, 1988).

3.12 Método de aquecimento indireto

No método de aquecimento indireto, há uma superfície de separação, entre o elemento de aquecimento e o produto, por meio do qual se faz a permutação de calor. A temperatura de esterilização é de 140 a 150°C por 3 a 5 segundos (Veisseyre, 1988).

3.13 Métodos de aquecimento direto

No método de aquecimento direto o vapor pode ser injetado no produto, fluindo para produzir a exigida temperatura de pasteurização, temperatura na qual o leite deve ser pré-aquecido. Este processo causa uma diluição, aproximadamente de 10% no volume do produto com o vapor condensado. A diluição é compensada, durante o resfriamento, onde o produto quente é borrifado, dentro de uma câmara de vácuo, para promover sua evaporação. A temperatura de esterilização acontece à 138°C por 3 a 5 segundos (Veisseyre, 1988).

Outra forma do método de aquecimento direto é o sistema por infusão, no qual o leite é pulverizado na câmara de vapor. Instantaneamente, por condensação de vapor, a temperatura do leite alcança 140 a 150°C. O produto passa então para um segundo recinto (separador de vapor) que funciona através do sistema de vácuo. O vapor condensado anteriormente se evapora ao descer bruscamente a temperatura do leite até 70 a 75°C. Por último, o produto é refrigerado mediante um trocador que funciona com água fria e água gelada (Veisseyre, 1988).

3.14 Princípios da alta pressão aplicada a alimentos

Atualmente, pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de compreender os efeitos da alta pressão em alimentos e seus constituintes. Embora o potencial para utilização do processamento de alimentos a alta pressão seja conhecido desde o século XIX, a sua aplicação foi amplamente reconhecida recentemente. Nos últimos anos, o uso da alta pressão como uma técnica de conservação de alimentos ganhou impulso em todo o mundo como uma alternativa aos métodos tradicionais, pelos motivos citados anteriormente. Grande parte destas investigações relatam aspectos dos efeitos da pressão hidrostática sobre os sistemas biológicos e a conseqüente inativação de algumas espécies de micro-organismos (Ashie e Simpson, 1996; Krebbers et al., 2003). O processamento a alta pressão pode ser aplicado a uma ampla variedade de diferentes alimentos, incluindo produtos a base de carne (presunto cozido e maturado, entre outros), peixes, pratos pré-cozidos, frutas, legumes e sucos. As principais aplicações hoje são na produção de geleias e sucos de fruta.

3.15 Efeitos da alta pressão sobre micro-organismos

A eficácia de qualquer técnica de preservação de alimentos é avaliada com base na sua capacidade de erradicar micro-organismos patogênicos presentes e, assim, aumentar a segurança do produto. Um objetivo secundário é a inativação de micro-organismos deteriorantes para melhorar a vida de prateleira do alimento (McClements et al., 2001). O crescimento de micro-organismos nos alimentos pode causar deterioração produzindo alterações inaceitáveis no gosto, odor e textura. Os micro-organismos são grupos heterogêneos de organismos que são capazes de crescer em temperaturas bem abaixo da de congelamento (psicrófilos extremos) e a temperaturas acima de 100°C (termófilos extremos). No entanto, cada espécie tem uma temperatura específica de desenvolvimento e esse intervalo é determinado em grande parte pela influência da temperatura sobre as membranas celulares e enzimas e, portanto, o crescimento desses organismos é restrito às temperaturas em que as enzimas e membranas celulares conseguem desenvolver suas funções. O tratamento a alta pressão também é conhecido por causar lesões subletais em micro-organismos, que é particularmente importante para qualquer método de preservação, mas que representam apenas danos reversíveis as células, sendo que a morte celular é

associada a danos irreversíveis aos componentes essenciais para o crescimento e reprodução celular (McClements et al., 2001).

A inativação microbiana por alta pressão tem sido extensivamente estudada e pode ser atribuída a uma combinação de fatores. O principal local a ser afetado visando uma inativação microbiana é a membrana celular. Micro-organismos são resistentes a ataques químicos seletivos, devido à sua capacidade de excluir esses agentes a partir da célula, principalmente pela ação da membrana celular, no entanto, se a membrana torna-se danificada, a tolerância a estes agentes é nula. Além disso, a alta pressão promove alterações na morfologia celular, nas reações bioquímicas, desnaturação de proteínas e inibição de mecanismos genéticos. Outros mecanismos de ação que podem ser responsáveis pela inativação microbiana incluem a desnaturação de enzimas e as perturbações dos ribossomos (Linton e Patterson, 2000). Diferentes micro-organismos reagem a um tratamento de alta pressão com diferentes níveis de resistência. Observa-se que a resistência à pressão dos micro-organismos varia consideravelmente, dependendo de fatores como espécie, linhagem, fase de crescimento e de composição de alimentos.

Em trabalho feito por Kincal et al. (2005) suco de laranja foi processado com dióxido de carbono pressurizado e mostrou uma redução de 5 log na carga microbiana, mantendo a qualidade química e sensorial do produto tratado. Os autores observaram-se poucas alterações em relação à °Brix, pH e cor, enquanto a acidez aumentou ligeiramente para as amostras tratadas com alta pressão em comparação com as amostras não tratadas.

Choi et al. (2009), avaliaram os efeitos do tratamento com CO₂ supercrítico em molho de soja e pasta de pimenta marinada, bem como em produtos de carne de porco marinados, visando a inibição de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7. Tratamentos com CO₂ supercrítico a 14 MPa e 45°C por 40 min. resultaram em uma redução da carga microbiana no molho de soja de (2,52 – 3,47 log UFC/cm²), na pasta de pimenta marinada (2,12 – 2,72 log UFC/cm²). Na carne suína marinada, quando o dióxido de carbono supercrítico foi aplicado em pressão de 14 MPa e 45°C por 40 min., a redução dos níveis de *Listeria monocytogenes* foi de 2,49 e 1,92 log UFC/cm².

3.16 Efeitos da alta pressão na qualidade dos alimentos

Embora a segurança alimentar e a vida útil sejam aspectos muitas vezes estreitamente relacionados com a qualidade microbiológica, outros fenômenos como as reações bioquímicas, reações enzimáticas e as mudanças estruturais podem influenciar significativamente a percepção dos consumidores quanto a qualidade dos alimentos (Le Bail et al., 2003). Os processos convencionais de esterilização térmica envolvem a extensa penetração do calor para o núcleo (ponto frio) do produto e posterior resfriamento. Este processo térmico leva a mudanças na qualidade do produto de forma dependente ao produto e as temperaturas empregadas, que podem incluir geração off-flavor, amolecimento e destruição de cores e vitaminas.

Assim, o processamento a alta pressão oferece à indústria de alimentos uma tecnologia que pode atingir as características desejáveis de segurança alimentar, como nos alimentos tratados termicamente, e ainda satisfazer a demanda dos consumidores por alimentos com características de alimento fresco. Para a seleção das condições de processamento mais adequado para um determinado produto alimentar, as características sensoriais devem ser levadas em consideração (Polydera et al., 2003). O aumento das pressões de tratamento leva a um aumento geral de inativação microbiana, mas em pressões mais elevadas também pode ocorrer um maior nível de desnaturação de proteínas e outras mudanças potencialmente prejudiciais à qualidade dos alimentos que podem afetar a aparência e a textura dos alimentos, em comparação ao produto não processado.

A necessidade do emprego de altas temperaturas e elevadas pressões no processamento de alimentos pode ser minimizado fazendo uso de solventes, o que pode refletir em alterações mais amenas nas propriedades dos alimentos.

3.17 O uso de dióxido de carbono

O efeito biocida da alta pressão empregando dióxido de carbono (CO₂) foi estudado em várias espécies de bactérias e relatado por Tarafa et. al. (2010). O uso de CO₂ como um agente esterilizante tem apresentado vários benefícios. Em primeiro lugar, o CO₂ não é inflamável e não é tóxico em baixas concentrações, não requer nenhum tratamento especial ou ventilação, e não deixa resíduos tóxicos, além de ser inerte. O CO₂ tem uma temperatura crítica baixa (31,1°C) (McHugh e Krukonis, 1993) próxima a temperatura

ambiente, de modo que a degradação térmica não é um problema quando o processo é realizado em temperaturas próximas ao seu ponto crítico. Devido a estes benefícios, o CO₂ tem sido utilizado para esterilização de biomateriais. Além disso, no estado supercrítico, o CO₂ tem baixa viscosidade ($3-7 \times 10^{-5} \text{ Nsm}^{-2}$) e tensão superficial igual a zero (McHugh e Krukonis, 1993), permitindo que ele possa penetrar rapidamente em estruturas complexas e materiais porosos. Finalmente, o CO₂ é barato e facilmente disponível, o que pode tornar viável o seu emprego na esterilização, conforme ressaltado no estudo realizado por Matthews et al. (2001).

Levando-se em conta a baixa temperatura e ausência de resíduos tóxicos, a esterilização utilizando CO₂ pode ser melhor que a esterilização empregando vapor para certas aplicações. A técnica de esterilização utilizando CO₂ é apontada por Zhang et al. (2006) como uma opção para a esterilização de biomateriais para a área médica.

3.18 Temperatura X pressão

A temperatura e a pressão são os fatores mais importantes e que afetam significativamente o crescimento de micro-organismos. Cada micro-organismo tem uma temperatura máxima específica de morte térmica. Acima dessa temperatura, ocorre a desnaturação protéica, o colapso da membrana citoplasmática e sua consequente desativação. Uma vasta faixa de temperaturas foi estudada para o tratamento de alta pressão utilizando CO₂, de 0°C a 100°C. As bactérias são mais resistentes a pressão do que à temperatura, segundo Zhang et al. (2006). As pressões hidrostáticas entre 100 e 1000MPa desativa bactérias. Elevadas pressões hidrostáticas foram avaliadas e observou-se que se o CO₂ a alta pressão foi usado, os níveis de pressão exigidos pode ser reduzidos abaixo de 20MPa na inativação de bactérias, sendo que a maior pressão relatada é de 33MPa (Cheftel, 2005).

Após uma revisão detalhada da literatura sobre o tratamento de micro-organismos a alta pressão fazendo uso de CO₂, Zhang et al., (2006) relata que: 1. Bactérias vegetativas foram amplamente estudados e são suscetíveis ao tratamento a alta pressão utilizando CO₂; 2. Os efeitos da temperatura, pressão e média da desativação das células vegetativas podem ser substanciais, mas não há ainda uma compreensão clara desses efeitos; 3. Vários mecanismos de desativação têm sido propostos. É difícil adquirir dados que confirmem um determinado mecanismo. É possível que espécies variadas reajam de forma diferente frente

a diferentes condições de exposição ao CO₂. Então, observa-se que o principal desafio deste processo é como adaptar os métodos de esterilização a alta pressão sem, contudo, prejudicar as propriedades dos alimentos.

3.19 Tipos de microrganismos que contaminam o leite

Conforme a legislação brasileira atual, não existem padrões microbiológicos para o leite cru tipo C, somente para o leite A e B. De acordo com a federação Internacional de Laticínios (FIL, documento 212-1991), o leite cru é considerado “hígido” quando, no ato de sua coleta ou no momento de sua utilização artesanal, atenda as seguintes exigências:

- 1) *Flora microbiana total* ≤ 100.000 UFC/ml;
- 2) *Células somáticas* ≤ 300.000 UFC/ml;
- 3) *Staphylococcus aureus* ≤ 1.000 UFC/ml;
- 4) *Escherichia coli* ≤ 1.000 UFC/ml;
- 5) *Salmonella*: ausência/1000 ml;
- 6) *Streptococcus β* (*Lancefield, A, B, C, G e L*): ausência/0,1 ml.

De acordo com a temperatura de crescimento, os micro-organismos contaminantes do leite podem ser divididos em três grupos principais: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração, os termodúricos que sobrevivem à pasteurização (30 minutos a 63°C ou 15 segundos a 72°C) e os psicrotróficos, que se multiplicam em temperaturas baixas (7°C ou menos) (Godkin, 2000).

As bactérias psicrotróficas causam degradação das proteínas e gordura do leite, com conseqüentes alterações no sabor e odor e mesmo a redução no rendimento dos queijos. A ação deletéria resulta de proteases e lipases termoestáveis, ataque proteolítico à caseína e aumento dos compostos nitrogenados de baixo peso molecular, que atuam como nutrientes para os contaminantes pós-pasteurização. A presença de enzimas termoestáveis é especialmente prejudicial para a qualidade do leite UHT (Ultra Alta Temperatura, 140-145°C, 2-4 segundos) porque este leite é estocado a temperaturas mais elevadas por longos períodos de tempo (Sumner, J. 1996).

As bactérias psicrotróficas, na maioria, são mesofílicas, isto é, a temperatura ótima de multiplicação é entre 25 a 35°C. Entretanto, possuem a capacidade de se multiplicar a baixas temperaturas, embora de forma mais lenta. A contaminação do leite com essas

bactérias se dá, geralmente, devido a falhas nos processos de higienização das tetas antes da ordenha e a falhas nos sistemas de limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração ou utensílios que entram em contato com o leite. Os principais gêneros são: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* e *Flavobacterium* (Godkin, 2000).

As bactérias termodúricas resistem à pasteurização porque (1) suportam temperaturas mais altas (menos de 100°C) ou (2) produzem esporos que são formas de resistência contra condições adversas. Exemplos de gêneros com espécies esporuladas são *Clostridium* e *Bacillus*. Os esporos são inertes, não apresentam atividade metabólica e não se multiplicam, podendo sobreviver por anos no ambiente. São extremamente resistentes ao calor necessitando-se, em geral, de 20 minutos a 120°C para serem inativados. Como sobrevivem à pasteurização, podem reduzir o tempo de prateleira do leite, principalmente se as bactérias esporuladas forem também psicotróficas. As bactérias termodúricas são associadas com falhas crônicas ou persistentes de limpeza dos equipamentos de ordenha ou de contaminação originada do solo. Outras causas são vazamentos ou rachaduras nos componentes de borracha e depósitos que se formam nos equipamentos (biofilmes ou pedras do leite). Independentemente da origem da contaminação microbiana, quanto mais elevado o número de bactérias no leite, menor será o tempo de prateleira do leite fluido Sumner, J. (1996).

3.20 Enzimas utilizadas no controle do grau de aquecimento do leite

O leite contém várias enzimas de elevada especificidade, que atuam como catalisadores bioquímicos provocando importantes modificações em baixas concentrações. As enzimas chegam ao leite através da glândula mamaria e ainda através dos micro-organismos. Podem ser classificadas em diversos sub-grupos, como hidrolíticas (proteolíticas ou lipolíticas), oxi-redutoras, etc.

De maior interesse na prática rotineira de indústrias são a fosfatase alcalina (hidrolíticas) e a peroxidase, amplamente utilizadas para controlar o grau de aquecimento do leite. Em outras palavras, são uteis para diferenciar se o leite foi submetido ao processo de pasteurização ou a outro. A peroxidase serve para controlar a pasteurização do leite a uma temperatura de 85-90°C durante 20 segundos aproximadamente.

3.21 Fosfatase alcalina

A fosfatase é muito utilizada na indústria para controlar a pasteurização do leite, processo que se baseia na liberação do fenol de compostos fosforados. O fenilfosfatodissódico, em presença de fosfatase, libera fenol, detectado mediante reações colorimétricas (Tronco, 1997).

A fosfatase alcalina é normalmente encontrada no leite cru e destruída pelo calor produzido no processo de pasteurização (72°C/15 segundos ou 63-65°C/30 segundos). A presença desta enzima em uma amostra de leite pasteurizado constitui indicativo de que o leite não sofreu tratamento térmico adequado, podendo ter ocorrido mistura ou recontaminação de leite cru (Tronco, 1997).

A fosfatase alcalina é capaz de hidrolisar alguns ésteres do ácido fosfórico, propriedade utilizada para sua determinação qualitativa na prática. A resistência ao calor da enzima fosfatase é ligeiramente superior à das bactérias patogênicas que possam existir no leite (Tronco, 1997).

Uma das formas de detectar a presença desta enzima é a adição ao leite de uma solução de p-nitro-fenilfosfato. Se houver enzima, a mesma desdobra por hidrólise, produzindo o fosfato e p-nitrofenol, que possui cor amarela. Se a amostra foi adequadamente pasteurizada, não ocorre mudança de coloração (Tronco, 1997).

A técnica de pesquisa da fosfatase da fosfatase alcalina constitui uma prova qualitativa e é realizada com kit rápido. O procedimento é o seguinte: colocar 2,0 ml de p-nitro-fenilfosfato em tubo de ensaio e acrescentar 0,04 ml de leite (ou 0,1 ml para acelerar a reação). Levar então os tubos em banho-maria por 7 minutos a 37°C (quando se usa 0,04 ml), ou por três minutos a 37°C (quando se usa 0,1 ml de leite). Caso não disponha de banho-maria, pode-se deixar a solução em repouso na temperatura ambiente: 15 minutos quando se usou 0,04 ml de leite ou 7 minutos quando se usou 0,1 ml de leite (Tronco, 1997).

Interpreta-se o resultado da seguinte forma: quando o leite for pasteurizado corretamente, a cor permanecerá normal (branca); tendo sinal mal pasteurizado, se estiver cru ou contaminado, o leite apresentará cor amarela, característica do p-nitrofenol hidrolisado (Tronco, 1997).

Recomenda-se fazer sempre o controle positivo e negativo, utilizando respectivamente uma amostra de leite cru e uma amostra de leite pasteurizado adequadamente (Tronco, 1997).

3.22 Peroxidase

A peroxidase serve para controlar a pasteurização do leite a uma temperatura de 85-90°C durante 20 segundos aproximadamente.

Trata-se de uma enzima oxidante, capaz de liberar oxigênio do peróxido para o hidrogênio ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{peroxidase} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$) e de ser destruída a 80°C por alguns segundos. Sua pesquisa é feita aproveitando-se a propriedade da enzima de desdobrar a água oxigenada e liberar oxigênios ativos, o qual pode fixar-se em uma substância oxidável como o guaiacol, produzindo uma oxidação de cor salmão (rosado). Se o teste for positivo, torna-se visível um anel marrom pouco abaixo da superfície do leite em caso de teste negativo, todo o leite permanece branco (Tronco 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de leite foram gentilmente cedidas pelo produtor Vitor Menegola, de vacas de raça holandesa em condições de ordenha e higiene adequadas, através de ordenha mecanizada. O leite obtido apresentou pH em torno de 6,8 a 7,0 após coletado foi imediatamente envasadas e refrigeradas a uma temperatura de 4°C.

4.2 pH

O pH foi determinado utilizando-se um potenciômetro digital (GEHAKA modelo PG 2000), (IAL, 1985), realizando-se leituras diretamente na amostra de leite cru e nas amostras coletadas no ponto otimizado do planejamento de experimentos.

4.3 Acidez Dornic

Realizada através de titulometria de neutralização, utilizando-se solução padrão de NaOH 0,11N e indicador fenolftaleína, no leite cru e nas amostras coletadas no ponto otimizado do planejamento de experimentos, segundo a metodologia de (Tronco, 1997).

4.4 Proteína

Foi utilizado método de Kjeldahl, que consiste na destruição da matéria orgânica pela sua digestão com ácido sulfúrico, passando o nitrogênio presente para a forma de sulfato de amônio, conhecido também por método NKT (Nitrogênio Kjeldahl Total) (TRONCO, 1997).

4.5 Lactose

O método de Munson-Walker foi utilizado para a determinação do teor de lactose das amostras de leite cru e nas amostras coletadas no ponto otimizado do planejamento de experimentos. Também conhecido como método de redução (Licor de Fehling), esse método baseia-se na redução de íons cúpricos (solução de sulfato de cobre) a íons cuprosos pela lactose (açúcar redutor) em meio alcalino aquecido. A solução de hidróxido de sódio faz a alcalinização do meio e, com o agente complexante (tartarato de sódio e potássio),

ambos impedem o consumo de cobre (II) para a formação de hidróxido cúprico (Tronco 1997).

4.6 Minerais – (cinzas)

O método fundamenta-se na perda de peso do leite cru e nas amostras coletadas no ponto otimizado do planejamento de experimentos, que ocorre quando o produto é incubado a 500-550°C, com a destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (Lanara, 1981).

4.7 Fosfatase

A metodologia para quantificação de fosfatase alcalina do leite cru e nas amostras coletadas no ponto otimizado do planejamento de experimentos, foi realizada conforme norma da ISO 3356 IDF 63:2008 e conforme descrita a seguir. A amostra é diluída com um tampão de pH 10,6 e incubadas a uma temperatura de 37°C por uma hora. A fosfatase alcalina presente na amostra irá liberar, sob estas circunstâncias, fenol fenilfosfato dissódico. O fenol liberado reage com uma imida-quinona (dibromo-quinonechlorimide) para produzir dibromo-indofenol (cor azul), que é medida por fotometria a 610 nm.

Foi preparado um conjunto de cinco concentrações diferentes de padrão (fenol) sendo que o tubo de ensaio padrão continha 0 mg de fenol (controle ou branco), e os demais tubos continham 2 mg, 5 mg, 10 mg e 20 mg de fenol, respectivamente. Após adicionou-se em todos os tubos de ensaio 1 ml da solução de sulfato de cobre, 5 ml de solução tampão de cor II, 3 ml de água e 1 ml de solução de BQC, 40 mg $\pm$ 1 mg de BQC ($C_6H_2Br_2ClNO$) em 10 ml de etanol 96%, e guardado em um frasco de cor escura, a 4°C $\pm$ 2°C, então, deixou-se os tubos a temperatura ambiente por 30 min a fim de que pudesse ser observada a cor definitiva.

4.7.1 Cálculo e Expressão dos Resultados Fosfatase Alcalina

A equação 1 apresentada a seguir foi utilizada para converter a densidade óptica determinada para mg de fenol, referindo-se a curva padrão. Para calcular a atividade da fosfatase, expressa em mg de fenol por mililitro de leite, utilizou-se a seguinte equação:

$$a_p = 2,4 \times m \times d \quad (\text{equação 1})$$

Onde

m = é a massa de fenol, em mg, obtidos através da densidade óptica.

d = é o fator de diluição para obter uma diluição adequada da amostra ou reconstituída a amostra se necessário (se não $d = 1$).

4.8 Planejamento experimental para o tratamento empregado no Leite

Planejamentos fatoriais fracionários 2^3 com um ponto central repetido três vezes foram realizados avaliando-se a inativação da fosfatase alcalina. As amostras foram analisadas através da técnica descrita anteriormente. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas e otimizar as condições do processo de esterilização de leite a alta pressão.

As variáveis e níveis estudados nos planejamentos encontram-se na Tabela 7, sendo que os níveis avaliados foram determinados com base em ensaios preliminares mantendo o tempo de residência constante de 30 minutos para este planejamento.

Tabela 7- Variáveis e níveis estudados nos planejamento 1.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
T(°C)	30	50	70
CO ₂ /L(%)	5%	25%	45%
P(bar)	80	130	180

Após o tratamento estatístico para conhecimento das variáveis que possuem efeito significativo no processo de esterilização, partiu-se para a otimização destes resultados através de 1 novo planejamento experimental 2^2 com 4 fatoriais e 3 pontos centrais variando apenas a temperatura e tempo que encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Variáveis e níveis estudados nos planejamento 2.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
T(°C)	30	50	70
TEMPO (min)	10	20	30

4.9 Preparação do inóculo

Foi utilizado o micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 25922 obtido da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da URI - Campus de Erechim. O inóculo inicial foi preparado pela transferência da cultura estoque de *Escherichia coli* ATCC 25922 em um Erlenmeyer com 50 mL de meio líquido Luria Bentani LB (triptona 10,0 g L⁻¹, extrato de levedura 5,0 g L⁻¹, NaCl 5,0 g L⁻¹) sob condições assépticas, sendo incubado a 37°C por um período de 24 horas.

4.9.1 Aparato Experimental

O sistema experimental utilizado neste trabalho foi baseado no trabalho de Silva et al. (2007), Vieitez et al. (2008), Bertoldi et al. (2009), Silva (2009) e Silva et al. (2010) no qual consiste num reator micro tubo, com alimentação da mistura reacional de leite (substrato) e de CO₂, em condições de altas pressões e temperaturas. A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental utilizado neste trabalho.

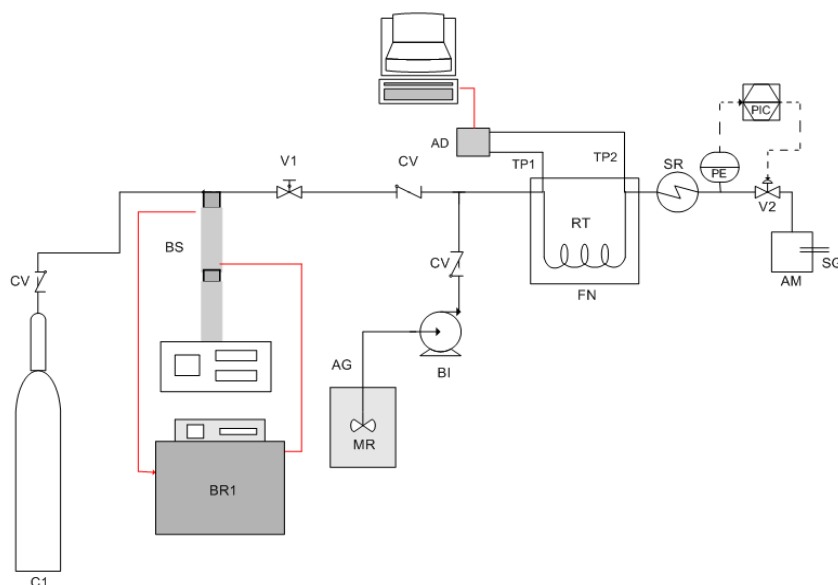


Figura 1 - Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado nas reações de esterilização: (C1) cilindro de gás, (CV) check-valve, (V1) válvula de controle de fluxo do solvente para o sistema reacional; (BS) bomba de alta pressão, (BR1) banho de recirculação, (MR) mistura reacional, (AG) agitador mecânico, (BI) bomba Isocrática, (FM) forno, (RT) reator tubular, (TP1) indicador de temperatura na entrada do reator, (TP2) indicador de temperatura na saída do reator, (AD) Sistema de aquisição de dados, (SR) sistema de resfriamento, (V2) válvula de controle da alimentação, (V2) válvula para controle de pressão e amostragem, (AM) amostragem; (PE) sensor de pressão; (PIC) controlador e indicador de pressão.

Onde:

C1 – Cilindro de gás, com CO₂ liquefeito sob alta pressão.

BS - Bomba Seringa ISCO da SÉRIE-D (MODEL 500D - Marca ISCO) de alta pressão. Este tipo de bomba opera em modo de fluxo constante (0,01 mL/min a 204 mL/min) ou pressão constante (0 a 258,6 bar). A bomba é utilizada para deslocar o CO₂ até a zona reacional.

BR - Banho de Recirculação (Marca QUIMIS, Modelo 214M2). Utilizado para manter a temperatura no cilindro da bomba constante.

V1 - Válvula métrica tipo agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação de até 1034 bar).

MM – Micro Misturador (Marca Valco, modelo ZDV, com diâmetro de 1/16").

CV - Válvula de Via Única (check-valve Marca HOKE, Modelo 6133F2Y). A função desta válvula é permitir o fluxo em apenas um sentido.

MR - Mistura reacional constituído de leite em proporções molares determinadas previamente para cada condição reacional.

AM - Agitador mecânico (Marca Fisatom, Modelo 712). Inserido em frasco contendo a mistura reacional, era utilizado para homogeneizar e manter a mesma sob agitação permanente durante a reação.

BL - Bomba de alta pressão de líquidos (HPLC) Digital Série III (Marca Acuflo). Este tipo de bomba opera com vazão constante (0,1 mL/min a 10 mL/min) e pressão de trabalho de 0 a 414 bar. A bomba é utilizada para deslocar a mistura reacional para a zona de reação e manter a pressão do sistema.

RT - Nas reações foi utilizado um reator de micro tubo, constituído de tubo sem costura (1/4 in de diâmetro externo) ambos em aço inox (Marca Sandvik), um reator denominado reator de micro tubo 1 possui diâmetro interno de 0,5 cm e volume de 37 mL (Figura 2).

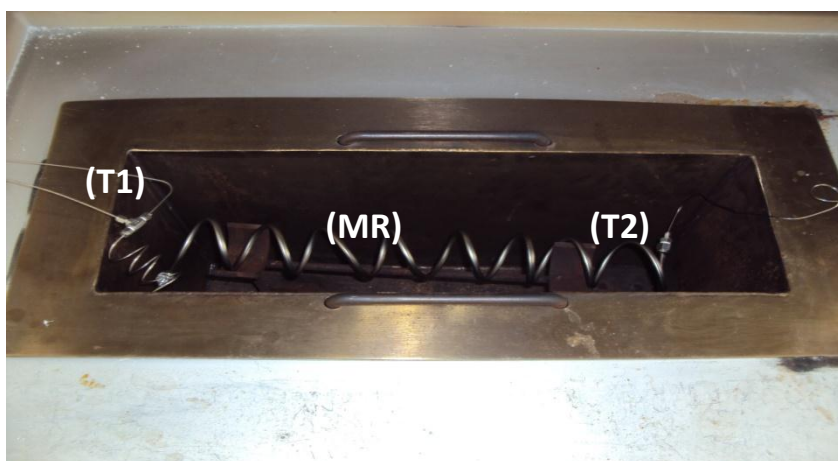


Figura 2 - Reator utilizado nos experimentos: micro reator com diâmetro interno de 0,5 cm (MR). Indicador de temperatura na entrada do reator (T1), indicador de temperatura na saída do reator (T2).

FM - O reator encontrava-se acoplado em um forno (Marca JUNG) potência de 5 kW, com controlador e indicador de temperatura (Marca JUNG, Modelo J200), o qual fornecia temperatura necessária para condução da reação.

TP1 e TP2 - Termopares de isolamento mineral tipo K (Marca Salcas), devidamente calibrados com referência a termopar calibrado por Salcas Laboratório de Termometria, certificado pela RBC (Rede Brasileira de Calibração). Os termopares se encontram acoplados a entrada e saída do reator, por conexão tipo T (Marca Swagelok), ligados a um indicador de temperatura (marca NOVUS, Modelo N1500).

V2 – Válvula eletropneumática designada para aplicações com alta pressão (Válvula Série 51000 Series Baumann com Atuador Tipo 16 e Posicionador Eletropneumático 3661), sendo que a qual possibilitava o controle de pressão no sistema reacional, amostragem e despressurização do sistema.

PE - Sensor de pressão, da marca SMAR (Modelo A5), que atua na faixa de 30 a 3600 psi. O sensor de pressão está conectado ao sistema reacional por uma conexão do tipo T (Marca Swagelok), a fim de transmitir a pressão da linha para o PIC.

PIC - Controlador e Indicador de pressão, (marca NOVUS, Modelo N1100). Controlador de características universais, utilizado para receber o sinal do sensor e transmiti-lo ao atuador da válvula eletropneumática, para esta monitorar e manter a pressão desejada no sistema reacional.

SR - Sistema de resfriamento. Depois de decorrida a reação, a carga passava por um banho com água a temperatura ambiente, com o objetivo de cessar a reação e diminuir a temperatura para posterior amostragem.

A vista geral da unidade experimental utilizada para a aquisição dos dados experimentais (acima descrita) é apresentada na Figura 3.

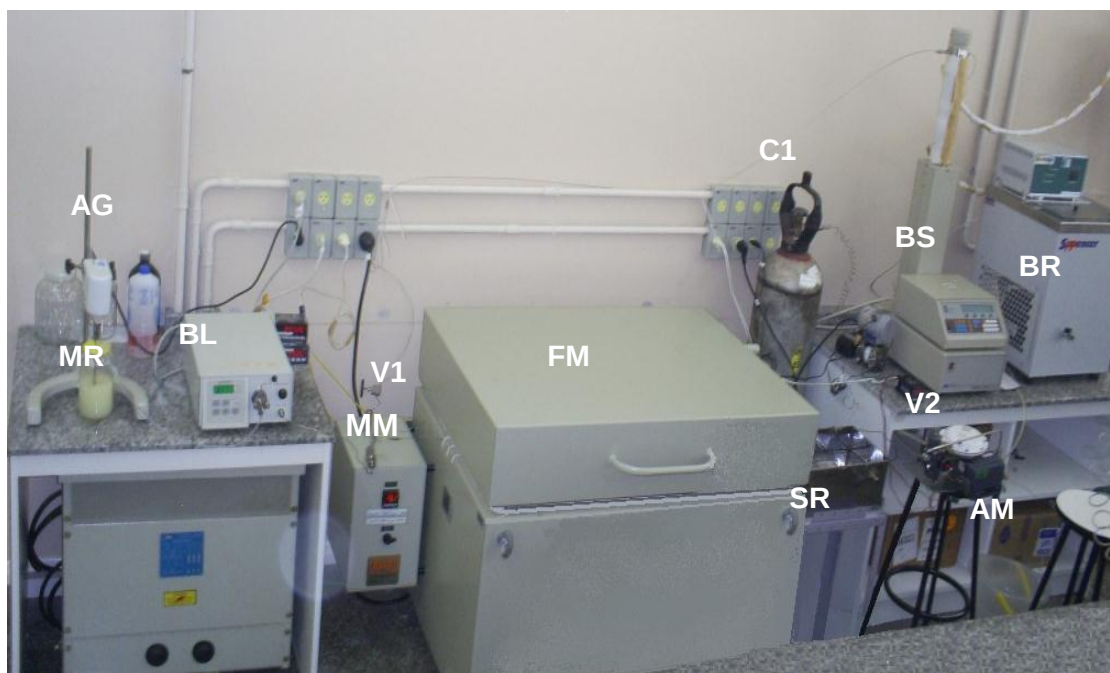


Figura 3 - Vista geral da unidade experimental: (MR) mistura reacional, (AG) agitador mecânico, (BL) bomba HPLC, (C1) cilindro de co-solvente; (BS) bomba seringa; (BR) banho termostático; (FM) forno mufla, (SR) sistema de resfriamento, (V1) válvula de controle da alimentação, (MM) micro misturador, (V2) válvula para controle de pressão e amostragem, (AM) amostragem.

4.9.2 Procedimento Experimental

As reações de esterilização foram realizadas em duplicata, utilizando um reator micro tubo com uma capacidade de 37 mL em tubos de aço inoxidável (1/16 “OD diâmetro interno de 0,5 cm HIP”). O procedimento experimental consiste no bombeamento contínuo de leite, e vazão volumétrica de alimentação, até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba de alta pressão para líquidos (Acuflow). Após, iniciava-se o aquecimento do forno até a temperatura da reação, monitorada através dos termopares acoplados na entrada e na saída do reator, os quais estavam ligados ao sistema de aquisição de dados, com isso a temperatura era controlada com uma precisão de 5 K. A temperatura do sistema foi ajustada pelo controlador do forno.

Paralelamente, o banho termostático era ligado na temperatura de 7°C. Atingida a temperatura iniciava-se o refil na bomba de alta pressão através da abertura do cilindro de solvente (CO₂) e aguardava-se 30 minutos para dispor de maior volume de CO₂ na mesma. Depois de decorrido o tempo de refil fechava-se o cilindro e o sistema era então

pressurizado da bomba de alta pressão (ISCO, modelo 500D) até a válvula de entrada do reator na pressão definida para reação, mudava-se a condição da bomba para fluxo constante a uma dada razão de CO₂. Todo sistema era então pressurizado, pelo ajuste da válvula eletropneumática (BaumannTM, modelo 51000) até obtenção da pressão desejada, sendo a mesma monitorada pelo sensor (Smar, modelo A5) ligado ao controlador PID (Novus, modelo N1100).

Após a mistura reacional percorrer toda a extensão do microreator, a mesma passava por um sistema de resfriamento e posterior coleta das amostras, em torno de 10 ml para análise, era realizada em frascos de amostragem (previamente pesados) em duplicata, depois de estabelecidas temperatura e pressão de reação e decorridos 1,5 tempos de residência da mistura na zona reacional. O tempo de residência foi calculado considerando o volume do reator e a vazão de alimentação de leite da bomba de líquido.

$$t = \frac{\text{Volume do reator (mL)}}{\text{Vazão de alimentação (mL/min)}} \quad (\text{equação 2})$$

Conforme Minami e Saka (2006), o tempo de residência para reatores tubulares pode ser estimado a partir da razão entre o volume do reator e vazão volumétrica de alimentação dos reagentes em condições reacionais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Leite

As características do leite submetido ao aquecimento é função não somente da temperatura alcançada, mas também do tempo de aquecimento.

Estas transformações são o resultado de ações complexas sobre os diversos componentes do leite (Veisseyre, 1988).

Depois dos planejamentos a caracterização do leite foi efetuada para acompanhar algumas alterações físico-químicas durante o processo de esterilização do leite utilizando CO₂ a alta pressão, com as condições experimentais de 80 bar, com uma temperatura de 70°C e uma razão de CO₂/Leite de 5%.

Na Tabela 9 pode-se verificar a caracterização do leite utilizado neste estudo.

Tabela 9 - Caracterização do leite.

Análise	Antes	Depois
pH	6,9	6,9
Acidez	15°D	16°D
Proteína	0,833%	0,832%
Lactose	4,710%	4,695%
Cálcio	44,56mg/100g	44,40mg/100g
Ferro	0,072mg/100g	0,071mg/100g
Potássio	64,18mg/100g	64,16mg/100g
Magnésio	6,05mg/100g	6,02mg/100g

Através dos resultados analisados pode-se verificar que não ocorreram diferenças entre o leite antes e depois do processo de esterilização do leite a alta pressão, na condição investigada, em relação à proteína, lactose e minerais. Além disso, o leite apresentou uma faixa de acidez, um pouco acima do normal, pois a faixa ideal de acidez do leite deve estar em torno de 14 a 17°D (Veisseyre, 1988).

5.2 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima encontrada normalmente no leite cru. Com o processo de esterilização, a enzima é inativada definitivamente. Assim, a detecção da FAL é utilizada na verificação da ocorrência ou não de tratamento térmico do leite.

Para o estudo da fosfatase alcalina foi elaborado uma curva padrão como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Curva padrão da Fosfatase Alcalina.

[] mg	Curva		Média
2	0,103	0,105	0,104
5	0,168	0,163	0,1655
10	0,276	0,263	0,2695
20	0,446	0,442	0,444

Após o preparo das amostras e obtenção dos resultados mostrados na Tabela 10, foi feito o gráfico da fosfatase alcalina aonde obtivemos a equação da reta ($y = 0,9846x - 0,0012$) aonde o y é as mg de fenol encontradas no leite e o x é o valor de absorbância encontrados na curva de fosfatase, o que tornou possível a determinação da concentração de fosfatase alcalina no leite em mg/ml, conforme a equação (1), e obtenção do coeficiente de correlação $R^2 = 0,985$.

A fosfatase alcalina é uma enzima que ocorre naturalmente no leite. Como a resistência térmica da enzima é maior do que a de esporos de micro-organismos patogênicos encontrados no leite, a detecção de fosfatase alcalina é usada como um teste legal para determinar se o leite tem sido adequadamente esterilizado ou pasteurizado (Aschaffenburg e Mullen, 1949, Murthy e Cox, 1988). O leite de vacas pode diferir em até 40 vezes no teor de fosfatase alcalina, que também é afetada por outros fatores, principalmente pelo rendimento de lactação (Andrews, 1992).

Na Tabela 11 pode-se observar que a inativação da fosfatase alcalina teve os melhores resultados nos experimentos 5, 6, 7 e 8 seguidos pelos pontos centrais onde obtiveram valores não tão elevados.

Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com as respostas de mg de fenol e a quantidade de fosfatase alcalina em mg/ml.

	CO ₂ /Leite	P(bar)	T°C	Tempo (min)	mg fenol	Fosfatase mg/ml
Fosfatase cru	-	-	-	-	0,127998	30,71952
Exp 1	-1(5%)	-1(80)	-1(30)	30	0,155567	37,336032
Exp 2	1(45%)	-1(80)	-1(30)	30	0,09846	23,6304
Exp 3	-1(5%)	1(180)	-1(30)	30	0,139321	33,437016
Exp 4	1(45%)	1(180)	-1(30)	30	0,157536	37,80864
Exp 5	-1(5%)	-1(80)	1(70)	30	0,007385	1,77228
Exp 6	1(45%)	-1(80)	1(70)	30	0,001969	0,472608
Exp 7	-1(5%)	1(180)	1(70)	30	0,0128	3,071952
Exp 8	1(45%)	1(180)	1(70)	30	0,006892	1,654128
Exp 9	0(25%)	0(130)	0(50)	30	0,076799	18,431712
Exp 10	0(25%)	0(130)	0(50)	30	0,077783	18,668016
Exp 11	0(25%)	0(130)	0(50)	30	0,076799	18,431712

Com base nos resultados obtidos na matriz do planejamento 1 foi definido a razão que seria utilizado nos experimentos deste trabalho, como podemos observar os menores valores de fosfatase encontrados foram com 45% em relação a CO₂/Leite mas ao utilizar essa relação em pressões elevadas e temperaturas altas ocorria a desnaturação proteica e rompimento da K-caseína do leite devido a concentração de CO₂ presente em contato com o leite, fazendo que isso ocasionasse o coagulação do leite e danificando o unidade de esterilização, por esse motivo foi observado que com 5% de razão CO₂/Leite os valores também se mostravam satisfatórios e não ocorria problemas no processo quando utilizado 5% e através dos resultado da matriz do planejamento 1 foi escolhido para trabalhar a razão de CO₂/Leite de 5% e não 45% devido a problemas ocorridos durante os testes preliminares.

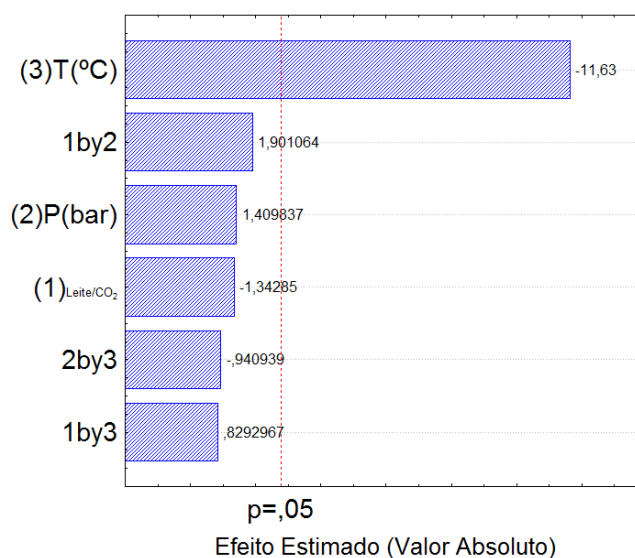


Figura 4 - Efeitos das variáveis manipuladas sobre a quantidade de fosfatase alcalina obtida no processo de esterilização.

A análise estatística dos resultados de fosfatase alcalina apresentados na Tabela 11 permitiu a obtenção dos efeitos das variáveis estudadas. Os efeitos foram expressos na forma de gráfico de Pareto, apresentados na Figura 4. É interessante observar que a temperatura apresenta efeito significativo negativo a nível de 95% de confiança. Para os demais efeitos não obteve-se valores significativos a nível de 95% de confiança. Essa análise mostra que pode haver necessidade de diminuir a faixa de temperatura estudada.

Com a análise estatística dos dados apresentados na Tabela 11, foi possível a validação de modelos empíricos para a inativação da fosfatase alcalina, no processo de esterilização a alta pressão com CO₂.

Tabela 12 - Análise de variância para fosfatase alcalina do leite.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{tab}
Resíduo	2019,3	6	336,6	24,0
Regressão	56,0	4	14,0	
Total	2075,3	10		

Coeficiente de correlação: R=0,98, F_{6;4;0,95}=6,17

Os modelos codificados otimizados para inativação da fosfatase, respectivamente, são mostrados na Equação abaixo, sendo que foi validado pela análise de variância

(ANOVA), apresentadas nas Tabelas 12. Observa-se que os coeficientes de determinação obtidos (0,98 respectivamente) e o F calculado (3,89 vezes maior que o F_{tab} para a inativação da fosfatase alcalina) permitiram a validação do modelo com 95% de confiança. Com o modelo validado foi possível construir as superfícies de respostas juntamente com as curvas de contorno apresentadas nas Figuras 5, 6 e 7.

$$F = 17,5050 - 1,7764 * L / CO_2 + 1,8651 * P - 15,3851 * T + 2,5149 * L * P + 1,0971 * L * T - 1,2448 * P * T$$

ONDE:

CO_2/L : Relação Leite e CO_2 no reator durante o processo de esterilização.

P: Pressão

L: Leite

T: Temperatura

As superfícies de resposta e curvas de contorno da Figura 5 mostram que para os menores valores da vazão de CO_2 /Leite e da temperatura obtém-se melhores resultados para inativação da fosfatase alcalina. Com base no gráfico de pareto e superfície de resposta verifica-se que a pressão pode ser utilizada em qualquer um dos níveis estudados desde que os valores de vazão e temperatura sejam os níveis inferiores estudados.

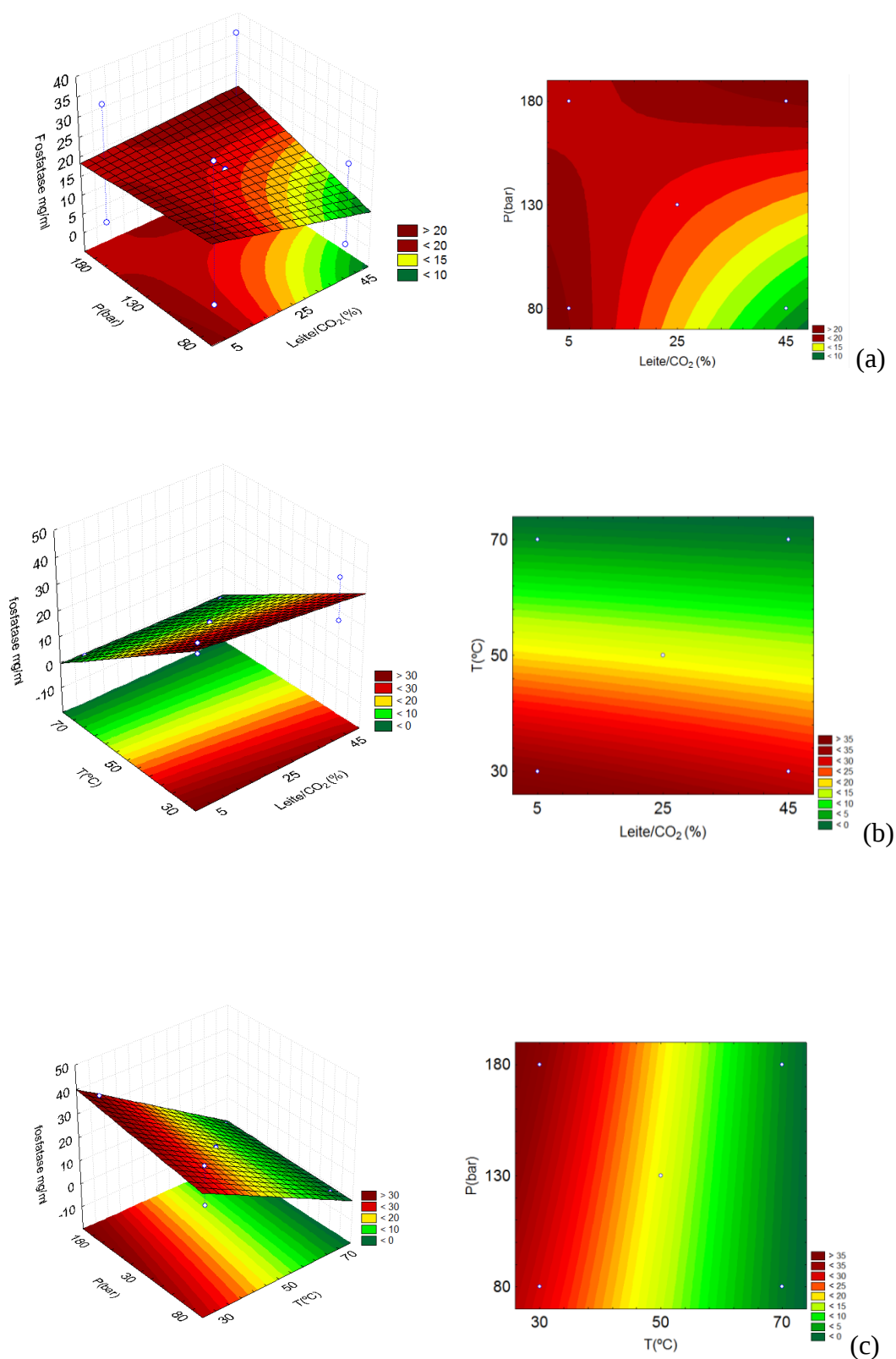


Figura 5 - Superfície de resposta e curva de contorno para inativação da fosfatase: (a) Vazão CO₂/Leite e Pressão P(bar); (b) Vazão CO₂/Leite e Temperatura T(°C); (c) Temperatura T(°C) e Pressão P(bar).

Com os resultados obtidos no planejamento anterior, observou-se necessário o deslocamento dos níveis estudados para temperatura e diante do interesse em tempos menores de processo, adotou-se como estratégia incluir a investigação do parâmetro tempo. Frente a dificuldade de manuseio do aparato experimental na condição com 45% de razão mássica CO₂/Leite e ainda, pela ocorrência de desnaturação protéica e rompimento da K-caseína observados nesta condição pela coagulação do leite, e observando os resultados de inativação da fosfatase alcalina na Tabela 11 é que se adotaram como parâmetros fixos para os experimentos que seguem a variável razão de CO₂/Leite e pressão foram fixadas em 5% e 80 bar respectivamente. Assim, desenvolveu-se um novo planejamento de experimento tendo como finalidade avaliar o efeito da inativação da fosfatase alcalina variando os parâmetros tempo e temperatura. As faixas de estudo foram ajustadas em função dos resultados obtidos nos planejamentos anteriores. A Tabela 13 apresenta os resultados para os novos planejamentos fatoriais para inativação da fosfatase alcalina, respectivamente.

Tabela 13 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com as respostas de mg de fenol e a quantidade de fosfatase alcalina em mg/ml.

	T(min)	T°C	mg fenol	fosfatase mg/ml
Fosfatase	-	-	0,14769	35,4456
Exp 1	-1 (10)	-1 (50)	0,059076	14,17824
Exp 2	1 (30)	-1 (50)	0,044307	10,63368
Exp 3	-1 (10)	1 (70)	0,063999	15,35976
Exp 4	1 (30)	1 (70)	0,024615	5,9076
Exp 5	0 (20)	0 (60)	0,034461	8,27064
Exp 6	0 (20)	0 (60)	0,029538	7,08912
Exp 7	0 (20)	0 (60)	0,039384	9,45216

Na Tabela 13 pode-se observar que a inativação da fosfatase alcalina teve o melhor resultado no experimento 4, onde o tempo de 30 minutos e a temperatura de 70°C obteve-se maior inativação da fosfatase alcalina. Valores reduzidos de fosfatase ainda foram observados na temperatura de 60°C e 20 minutos de tempos de exposição.

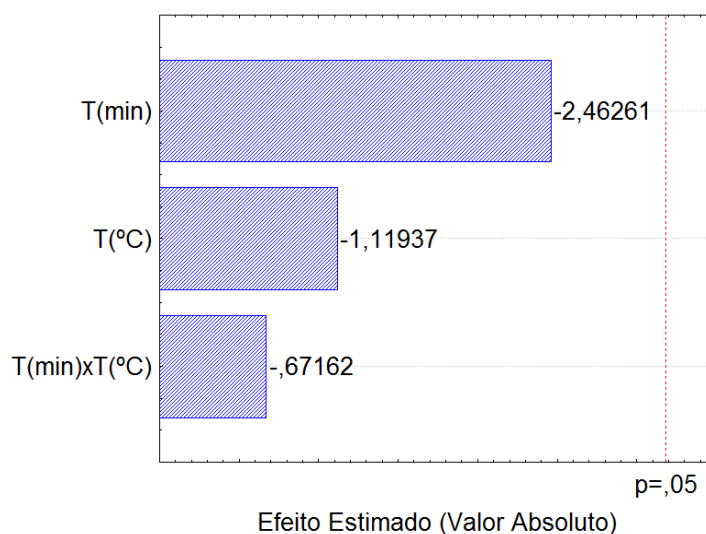


Figura 6 - Efeitos das variáveis da determinação da fosfatase alcalina no leite após o tratamento do segundo planejamento.

Com os resultados obtidos pela análise estatística do segundo planejamento verifica-se que nem uma das variáveis estudadas apresenta efeito significativo ($p < 0,05$).

Não obstante, observa-se que um grande número de trabalhos da literatura (Behmer, 1980; Garcia CA et al. 2000; Jackson CJ. 1936; Duthie CM. 1985; Loss CR, Hotchkiss JH. 2003; Rashed MA, Mehanna NM, Mehanna AS. 1986) e até mesmo as técnicas convencionais para análise de fosfatase alcalina no leite, fazem uso de técnicas qualitativas, como a descrita por (Tronco 1997), o que tornam os resultados obtidos neste estudo de grande relevância, mas também de difícil comparação com a validação dos demais processos. Frente a estes fatores, e imbuídos de espírito investigativo, é que foram realizados os estudos, com 80 bar, e temperatura de 70°C e uma razão de CO₂/Leite de 5% e um tempo de residência de 30 min.

5.3 Avaliações da inativação de micro-organismos contaminantes

Após a obtenção do ponto ótimo do processo, começou a ser avaliada a inativação do micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 25922 no processo de esterilização, onde foi preparada a amostra (leite) e logo após contaminada com o micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 25922, em quantidade de população 10⁵ UFC/ml, e após o preparo do inóculo inicial foi preparado a transferência da cultura para a amostra de leites aonde foi adicionado 1 ml da cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922 para 1 litro de leite

ocasionando a contaminação do leite para a realização dos experimentos. Após o leite ser contaminado iniciou-se imediatamente o processo de esterilização, na condição citada anteriormente. Mantendo estas condições e a vazão de CO₂ constante, variando-se apenas a vazão do leite contaminado na bomba de líquido com um aumento de 1 ml/min na vazão da bomba a cada tempos de residência, que corresponde ao instante de amostragem. Sendo assim, realizou-se uma cinética onde obteve-se os valores de inativação da *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados desta cinética encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da cinética de inativação de *Escherichia coli* ATCC 25922 com variação da taxa de vazão do leite.

Experimento	Vazão do Leite(ml/min)	Crescimento UFC/ml	n/n ^o *
0	-	(2,1x10 ⁵)	1
1	0,49	(8,0x10 ³)	0,038095
2	1,49	(3,0x10 ⁴)	0,142857
3	2,49	(4,0x10 ⁴)	0,190476
4	3,49	(5,0x10 ⁴)	0,238095
5	4,49	(1,0x10 ⁵)	0,47619
6	5,49	(1,3x10 ⁵)	0,619048
7	6,49	(1,4x10 ⁵)	0,666667
8	7,49	(1,6x10 ⁵)	0,761905
9	8,49	(1,8x10 ⁵)	0,857143

*Onde n/n^o corresponde a contagem encontrada após o tratamento dividido pela contagem inicial.

Pode-se observar na Tabela 14 que conforme aumenta a vazão do leite aumenta gradativamente o numero de micro-organismo presentes nas amostras coletas de cada tratamento. Com resultados obtidos anteriormente é necessário que o leite permaneça um tempo de residência no reator para que ocorra a inativação da *Escherichia coli* ATCC 25922.

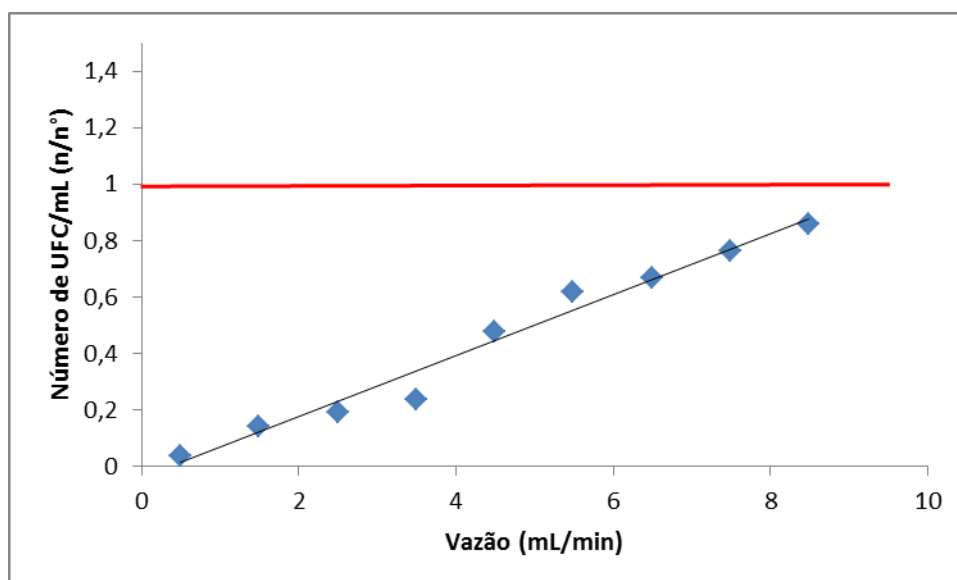


Figura 7 - Curva de inativação da *Escherichia coli* ATCC 25922 após tratamento com CO₂ a 80 bar e temperatura de 50°C.

Na Figura 7 pode-se observar que o padrão de UFC é 1 e esta indicado no gráfico com uma linha vermelha. Os demais pontos foram obtidos através de uma cinética de inativação de *Escherichia coli* ATCC 25922 em função da vazão de leite, apresenta a equação geral de reta ($y=0,1078x-0,0405$), e coeficiente de correlação $R^2 = 0,97$. A partir dessa cinética pode-se observar que houve uma inativação significativa das células do micro-organismo, mostrando a necessidade de exposição da *Escherichia coli* ATCC 25922 ao fluido pressurizado CO₂ por um determinado tempo de residência nas condições investigadas.

Segundo Adams e Moss 1995 e Hitch-ins et al., 1992, a presença de *Escherichia coli* em alimentos como carnes, leite é um indicador de contaminação fecal, portanto deve ser ausente nos leites tipo A, B e C. Estudos demonstraram a viabilidade de alta pressão CO₂ no tratamento, tal como uma técnica alternativa para a inativação de micro-organismos em alimentos, Ballestra et al. (1996), Daniels et al. (1985), Erkmen et al. (2000), Haas et al. (1989), Lin H et al. (1994); Wei et al. (1991). A aplicação de CO₂, a alta pressão pode reduzir o tempo e a temperatura necessária para a inativação de micro-organismos e enzimas, e minimizar a degradação térmica de substâncias sensíveis em produtos naturais, Ballestra et al. (1996); Chen et al. (1993). Alguns resultados experimentais do efeito de alta pressão de CO₂, na inativação de vários agentes

patogênicos alimentares ocorridos têm sido relatados (McMeekin et al., 1992; Ballestra et al., 1996; Erkmen et al., 2000; Haas et al., 1989; Lin et al., 1994).

O efeito do processo de Alta Pressão de Dióxido de Carbono (HPCD – High Pressure Carbon Dioxide) vem sendo estudado em diversas espécies de bactérias ou diretamente em algumas classes de alimentos. Silva (2011) estudou os efeitos de HPCD na inativação de *Escherichia coli*, enquanto os efeitos do processamento a alta pressão no processamento de salmão foram quantificados por Yagiz et al. (2009), que aplicando 150 MPa por 15 minutos obteve uma redução de 2 ciclos logarítmicos na contagem de micro-organismos inicial e aplicando 300 MPa pelo mesmo período obteve a inativação completa.

Estudos realizados por Damar e Balabam (2006) em suspensões de culturas puras, de diferentes micro-organismos, demonstraram que a inativação microbiana alcançada pela HPCD variou de 2-12 logs com pressões abaixo de 50 MPa e temperaturas entre 5 a 60°C.

Já Silva (2011), descreve a eficiência do uso de HPCD na inativação de *Escherichia coli* em pressões que variaram de 80 a 160 bar em meio de cultura e indica a inativação total deste micro-organismo sob diversas condições.

6. CONCLUSÃO

Após a realização deste estudo pode-se concluir que:

O desenvolvimento do sistema reacional para esterilização do produto (leite) mostrou uma grande eficácia durante os experimentos.

O uso de alta pressão associado ao CO₂ não acarretou em perdas de proteínas, cálcio, ferro, potássio, magnésio no leite após tratamento.

A utilização de dióxido de carbono (CO₂) para a inativação de fosfatase alcalina é eficiente e a melhor condição encontrada nesse trabalho para que os índices de fosfatase sejam mínimos foi de temperatura de 70°C com uma relação mássica de 5% de CO₂/leite, tempo de residência no reator de 30 min, e pressão de 80 bar.

Na cinética avaliada neste estudo que expressa a inativação do micro-organismo, *Escherichia coli* ATCC 25922 verificou-se que o número de crescimento dos micro-organismos foi inibido a uma taxa de 97%.

Os resultados descritos nesse trabalho apresentam relevância científica, uma vez que grande parte dos trabalhos científicos não acompanham a inativação das enzimas de forma quantitativa. Ainda trouxe conhecimento sobre dados de tratamento térmico utilizando técnicas exploratórias, como um sistema contínuo de alta pressão associado ao uso de dióxido de carbono.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, a seguir são apresentadas algumas sugestões de trabalhos que podem ser realizados:

- Estudo cinético da inativação de populações de micro-organismos com contagens mais baixas, compatíveis com as encontradas no leite;
- Ampliação do estudo o do efeito e da adição de CO₂ e alta pressão sobre as características físico químicas do leite;
- Avaliação das características sensoriais dos alimentos submetidos a altas pressões com dióxido de carbono.
- Realização de cálculos de morte térmica do micro-organismo *Escherichia coli* ATCC 25922 para comparação com os dados experimentais obtidos.
- Testes com despressurização ou queda brusca de pressão ao longo do processo para avaliar a morte dos micro-organismos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, M.R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de Los Alimentos**. 1º ed. Zaragoza (Espanha) Editorial Acribia p. 463.1995.
- AMIOT, J. **Ciência y tecnologia de la leche: Principios y aplicaciones**. ZARAGOZA: Acribia, 1991. 547p.
- ANDREWS, A.T., 1992. Phosphatases in milk. In: Fox, P.F. (Ed.), **Advanced Dairy Chemistry-1. Proteins**. Elsevier Applied Science LTD, Essex, pp. 322–331.
- ASCHAFFENBURG R & MULLEN JEC 1949 **um ensaio da fosfatase rápida e simples para o leite**. *Journal of Dairy Research* 16 58-67.
- ASHIE, I., SIMPSON, B. **Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration**. *Food Research International*, 29 (5), 569-575.
- BALLESTRA, P., SILVA, A. A. D., and CUQ, J. L.: **Inactivation of Escherichia coli by carbon dioxide under pressure**. *J. Food Sci.*, 61, 829-836 (1996).
- BASSO, DAVID; SILVA NETO, BENEDITO; BERTO, JORGE LUIZ. **Otimização da produção de leite em função da qualidade dos alimentos nas condições do Noroeste do Rio Grande do Sul**. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre: Fepagro, v. 8, n. 1-2, p. 137-147, 2002.
- BERTOLDI C.; SILVA C.; BERNARDON J. P.; CORAZZA M. L.; CARDOZO FILHO L.; OLIVEIRA J. V.; CORAZZA F. C. **Continuous Production of Biodiesel from Soybean Oil in Supercritical Ethanol and Carbon Dioxide as Co-solvent**. *Energy & Fuels*, v. 23, pp. 5165-5172, 2009.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 10 ed. São Paulo: Nobel, p. 17-51, 1980.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13o ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1984. 320p. BRASIL. (Ministério da Agricultura/DAS/DIPOA/SNT) **Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade dos produtos lácteos, Brasília**; 1996, 50p.
- BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Portaria nº 146, de 07/03/96, leis decretos, etc, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Diário Oficial**, Brasília 11/01/96. seção I, p. 3977-3986, 1996.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos Analíticos para o Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – Métodos Físico-Químicos**. Diário Oficial da União, Brasília, 1981, p. XIV1-22. Ministério da Saúde. Portaria n. 451, 19 de setembro de 1997. Regulamentos técnicos. **Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 22 set. 1997. Seção 1, p. 21005-210112.
- CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização de tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2003.
- CARVALHO, V.R.F. **Indústria de laticínios no Rio Grande do Sul: um panorama após o movimento de fusões e aquisições**. 1º Encontro de Economia Gaúcha, 2002. Disponível em: www.fee.tche.br/sitefee/download/eeg/1/mesa_10_carvalho.pdf. Acesso em: 27 out. 2011.
- CHEFTEL J.C., CULIOLI L. **Effects of high pressure on meat: A review**. Meat Science, 46 (3), 211-236, 2005.
- CHEN, J. S., BALABAN, M. O., WEI, C. I., GLEESON, R. A., and MARSHALL, M. R.: **Effect of carbon dioxide on the inactivation of Florida spiny lobster polyphenol oxidase**. J. Sci. Food Agric., 61,253-259 (1993).
- CHOI, Y.M.; BAE, Y.Y.; KIM, K.H.; KIM, B.C.; RHEE, M. S. **Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and E. coli O157:H7 in marinades and marinated pork**. Meat Science, v 82, p 419-424, 2009.
- DAMAR, S.; BALABAN, M. O. Review of dense phase CO2 technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. **Journal of Food Science**, v 71, p 1–11, 2006.
- DANIELS, J. A., KRISHNAMURTHI, R, and RIZVI, S. S. A.: **A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality**. J. Food Prot., 48,532-537 (1985).
- DUTHIE CM. 1985. **Effect of low-level carbonation on the keeping quality of processed milk**. [MS thesis]. Ithaca, N.Y.: Cornell Univ. p 60.
- ENTICOTT, G. **Risking the rural: nature, mortality and the consumption of unpasteurized milk**. Journal of Rural Studies, v.19, p.411-424. 2003. FEE - Fundação de Economia e Estatística Siegfried Emanuel Heuser. Disponível em: http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/sel_modulo_pesquisa.asp. Acesso em: 24 out. 2011.

- **Erkmen, O.: Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods.** J. Sci. Food Agri., 80(4), 465-470 (2000).
- **Erkmen, O.: Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide.** Food Microbial., 17(2), 225-232 (2000).
- FDA, 2000. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center For Food Safety And Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. **High Pressure Processing.** Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>. Acesso em: 2 June 2006.
- FAO. 2001. **Agriculture, alimentation et nutrition en Afrique: un ouvrage de référence à l'usage des professeurs d'agriculture.** Roma.
- FILHO, M. J. P. OLIVEIRA, V. F. L. at **Ensaaios FEE, Porto Alegre**, v. 31, Número Especial, p. 635-647, jun. 2011.
- FINAMORE, E. B.; MAROSO, M. T. D. **A dinâmica da cadeia de lácteos gaúcha no período de 1990 a 2003: um enfoque no Corede Nordeste.** Disponível em: <http://www.fee.tche.br/3eeg/Artigos/m01t01.pdf>. Acesso em: 05 de janeiro de 2012.
- FELLOWS, P. **Tecnologia del procesado de los alimentos: principios y prácticas.** Zaragoza: Acribia, 1994. 487p.
- FRANTZ, Telmo Rudi; SILVA NETO, Benedito. **A dinâmica dos sistemas agrários e o desenvolvimento rural.** In: SILVA NETO, Benedito; BASSO, David (Orgs.). **Sistemas Agrários do Rio Grande do Sul: análise e recomendações de políticas.** Ijuí: Ed. Unijuí, 2005. p. 109-156.
- GARCIA CA, SILVA NR, LUQUETTI BC, SILVA RT, MARTINS IP, VIEIRA RC. **Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura".** Hig Aliment. 2000; 14(70): 36-50.
- GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In. **II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE**, 2000, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. P. 9-20.
- GUIMARÃES, J. N. Transnacionalização das Cooperativas de Laticínios: Estudo de caso das Cooperativas Brasileiras em comparativo com as Cooperativas Internacionais, visando Competitividade Globalizada. **Revista de Administração da Unimep.** v.6, n.1, jan./abr., 2008.
- HAAS, G J., PRESCOTT, H. E., DUDLEY, E., Jr., Dik, R., HINTLIAN, C., and KEANE, L.: **Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure.** J. Food Safety, 9,253-265 (1989).

- HAYASHI, R. **Application of high pressure to food processing and preservation**: philosophy and development, Engineering and Food. (W. E. L. Spiess and H. Schubert, eds.). London: Elsevier Applied Science, 1989. v. 2, p. 815.
- HERNÁNDEZ, G. T.; PEÑA, H. R.; VELAZQUEZ, G.; RAMIREZ, J. A.; TORRES, J. A. Effect of combined thermal and high pressure processing on the microbial stability of milk during refrigerated storage. **IFT Annual Meeting + Food Expo, 65, 15-20/07/2005**. New Orleans, Louisiana. Book of Abstracts... Chicago: IFT, 2005.
- HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. **Bulletin of West Virginia University Agricultural Experimental Station**, Virginia, v. 58, p. 15-35, 1899.
- HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODO, E. C. D. Coliforms, Escherichia coli and. Its toxins. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium Public Health Association (APHA) p. 1219, 1992.
- HOFFMANN, F. L. et. al. **Microbiologia do leite pasteurizado tipo “C”, comercializado na Região de São José do Rio Preto – SP**. Higiene Alimentar, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.
- IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3º ed., São Paulo, 1985.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 nov. 2011.
- JACKSON CJ. 1936. **Technique for obtaining anaerobic milk with some observations on its carbon dioxide content**. J Dairy Res 7:25–8.
- KINCAL, D; HILL, W. S.; BALABAN, M. O.; PORTIER, K. M.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. A continuous high – pressure carbon dioxide system for microbial reduction in Orange juice. **Journal Food Science**, v 70, p M249-M254, 2005.
- KNORR, D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 158-161, 1993.
- KREBBERS, B., MATSER, A.M., HOOGERWERF, S.W., MOEZELAAR, R., TOMASSEN, M.M., VAN DEN BERG, R.W. **Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters**. Innovate Food Science e Emerging Technologies, (4), 377-385, 2003.

- LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II-Métodos Físico e Químicos- **Ministério da Agricultura- Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária** – Laboratório Nacional de Referência Animal. Brasília, 1981.
- LE BAIL A., BOILLEREAUX L., DAVENEL A., HAYERT M., LUCAS T., MONTEAU J.Y. **Phase transition in foods : effect of pressure and methods to assess or control phase transition.** Innovate Food Science and Emerging Technologies, 4, 15-24.
- LINTON M., PATTERSON, M.F., **high pressure processing of foods for microbiological safety and quality.** Acta microbiologia et Immunologica Hungarica, 47 (2-3), 175-182, 2000.
- LOSS CR, HOTCHKISS JH. 2003. **The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products.** In: Smit G, editor. **Dairy processing: improving quality.** Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 391–416.
- MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of high pressure technology in the food industry. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n .6, p. 164-169, 1993.
- MURTHY, G. K., KLEYN, D. H., RICHARDSON, T., & ROCCO, R. M. (1992). **Alkaline phosphatase methods.** In R. T. Marshall (Ed.), **Standard methods for examination of dairy products (pp. 413–431).** Washington, DC: American Public Health Assoc.
- McCLEMENTS, J.M.J., PATTERSON, M.F., LINTON, M. **The effect of growth stage and growth in milk.** Journal of Food Protection, 64 (4), 514-522.
- McHUGH, M. KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction**, 2 nd ed. Butterworth-Heinemann, Newton, M.A., 1993.
- McMEEKIN, T. A., ROSS, T., and OLLEY, J.: **Application of predictive microbiology to asses the quality and safety of fish and fish products (review).** **Int. J. Food Microbial.**, 15(1/2), 13-32 (1992).
- NETO, L. G. G., et al. **Influência do tratamento UAT no valor nutritivo do leite. Leite e derivados**, São Paulo, vol. 12, n. 67, p. 36-39, nov./dez. 2002.
- PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. Apostila: Processamento de leite de consumo. Dep. Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 1991.
- POLYDERA A.C., GALANOU E. STOFOROS N.G., TAOUKIS P.S. **Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperatue process conditions.** Journal of Food Engineering, 62 (3), 291-298.

- RAMOS, E. M.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 1- Equipamentos e processos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, p. 46-53, 2003.
- RASHED MA, MEHANNA NM, MEHANNA AS. 1986. **Effect of carbon dioxide on improving the keeping quality of raw milk**. J Soc Dairy Technol 39:62–4.
- SANTANA, E. H. W. de.; BELOTI, V.; BARROS, M. de. A. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.88. p.27-32, 2001.
- SANTOS, D. dos; BERGMANN, G. P. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo – Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.110. p.56-63, 2003a.
- SANTOS, D. dos; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite cru. Parte I – mesófilos aeróbios. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.109. p.69-74, 2003b.
- SILVA, J. A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13 n.65. p.19-25, 1999.
- SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 325p.
- SILVA NETO, Benedito; FRANTZ, Telmo Rudi. **The Dynamics of Agriculture ad the Rural Development in Rio Grande do Sul**. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. Brasília: Sober, v. 41, n. 3, p. 253-272, jul./set. 2003.
- SILVA, C. **Produção de ésteres etílicos por transesterificação não catalítica de óleo de soja**. Dissertação de M. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2007.
- SILVA, C. **Produção Contínua de Biodiesel por Transesterificação não catalítica de Óleo de Soja**, Dr. Thesis, Universidade Estadual de Maringá, Brazil, 2009 (in Portuguese).
- SILVA, C.; CASTILHOS, F.; OLIVEIRA, J. V; FILHO, L. C. **Continuous production of soybean biodiesel with compressed ethanol in a microtube reactor**. Fuel Proc. Technol. doi: 10.1016/j.fuproc.2010.04.009.
- SILVA, J. M.. **INATIVAÇÃO DE *Escherichia coli* UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2011.

- SILVEIRA, Vicente Celestino Pires.; PEDRAZZI, Paulo Ramon. **As transformações na cadeia produtiva do Leite: impactos no Rio Grande do Sul e em Santa Maria.** Santa Maria, 2002. Disponível em: <http://www.ufsm.br/cieper/mainfiles/Resumo CPILeite2.doc>. Acesso em: 06 de janeiro de 2012.
- SMELT, J. P.; HELLEMONS, J. C.; PATTERSON, M. Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: HENDRICKX, M. and KNORR, D. (Eds). **Ultra high pressure treatments of foods.** New York, United States: Kluwer Academic/plenum Publishers, 2002. p. 55-76.
- SUMNER, J. Farm **production influences on milk hygiene quality.** In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. *Proceedings...* Brussels: International Dairy Federation, 1996.p. 94-102.
- SUZIGAN, W; FURTADO, J.; GARCIA, R.; SAMPAIO, S. E. K. **Coeficientes de Gini locais – GL: aplicação à indústria de calçados do Estado de São Paulo.** Nova Economia, Belo Horizonte, p. 39-60, jul.- dez. 2003.
- TAUSCHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, Heidelberg, v. 200, n. 1, p. 3-13, 1995.
- TARAFA P. J., JIMÉNEZ A., ZHANG J., MATTHEWS M.A., **Compressed carbon dioxide for decontamination of biomaterials and tissue scaffolds.** *The Journal of Supercritical Fluids*, 53, 192-199, 2010.
- TIMM, C. D. et al. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite Pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul.** *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17 n.106. p.100-104, 2003.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** Guaíba: UFSM. 144pp. 1997.
- WEI, C. I., BALABAN, M. O., FERNANDO, S. Y., and PEPLOW, A. J.: **Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*.** *J. Food Prot.*, 54, 189-193 (1991).
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche e productos lácteos: tecnologia, química y microbiología.** Zaragoza: Acribia, 1995. 476p.
- VEISSEYRE, R. **Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche.** 2o ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.
- VIEITEZ I.; SILVA C.; BORGES G. R.; CORAZZA F. C.; OLIVEIRA J. V.; GROMPONE M. A.; JACHMANIÁN I. **Continuous production of soybean biodiesel in supercritical ethanol-water mixtures.** *Energy & Fuels*, v. 22, pp. 2805-2809, 2008.

- XAVIER, L. S. et al. **Coleta de leite em latões e a granel: Estudos de casos.** Rev. Inst. Lact. “Cândido Tostes”, Juiz de Fora, v. 54, n. 54, p.22-26, 2000.
- YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALABAM, M. O.; WELT, B. A.; RALAT, M.; MARSHALL, M. R. Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. **Food Chemistry.** v.116, p. 828–835, 2009.
- ZHANG J. DAVIS M.A., DREWS M., LABERGE, Y.H. **Sterilization using high-pressure carbon dioxide.** **Journal of Supercritical Fluids.** 38, 354-372, 2006.