



VERIDIANA DE CARVALHO ANTUNES

**“EFEITO DO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO E
DA MICROFILTRAÇÃO NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL
DO LEITE PASTEURIZADO”**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

VERIDIANA DE CARVALHO ANTUNES

**“EFEITO DO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO E DA
MICROFILTRAÇÃO NA QUALIDADE E VIDA ÚTIL
DO LEITE PASTEURIZADO”**

Orientadora: Walkíria Hanada Viotto

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Veridiana de Carvalho Antunes, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pela Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

An89e Antunes, Veridiana de Carvalho.
Efeito do armazenamento refrigerado e da
microfiltração na qualidade e vida útil do leite pasteurizado
/ Veridiana de Carvalho Antunes. -- Campinas, SP : [s.n.],
2013.

Orientador: Walkíria Hanada Viotto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leite microfiltrado. 2. Psicrótrópicos. 3. Avaliação
sensorial. I. Viotto, Walkíria Hanada, 1956-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Effect of refrigerated storage and microfiltration in quality
and shelf life of pasteurized milk

Palavras-chave em inglês:

Microfiltered milk

Psychrotrophics

Sensory analysis

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Walkíria Hanada Viotto [Orientador]

Clarissa Reschke Cunha

Dirce Yorika Kabuki

Leila Maria Spadoti

Mirna Lúcia Gigante

Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto (orientador)
FEA/UNICAMP (titular)

Clarissa Reschke Cunha
EMBRAPA/ Acre (titular)

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki
FEA/UNICAMP (titular)

Dra. Leila Maria Spadoti
ITAL (titular)

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
FEA/ UNICAMP (titular)

Dra. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender
ITAL (suplente)

Profa. Dra. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Escola de Veterinária/UFGM (suplente)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
FEA/UNICAMP (suplente)

Ao Pedro, meu amado filho e seu pai, meu companheiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença constante e por mais essa conquista;

À professora Walkíria pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos;

Ao professor Viotto, pela amizade e auxílio desde o início do projeto;

Aos professores da banca pelas correções e sugestões;

Às professoras Flávia Neto pelas contribuições com a eletroforese e a Helena Bolini pelos esclarecimentos na análise sensorial;

À Carol (Ana Carolina), Bete (técnica do laboratório) e às estagiárias: Janaína, Graziela, Ana Beatriz e Nicole, pela imensa ajuda, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho;

À Renata, Dirce, Diana e Ana Lourdes, técnicas dos Laboratórios de Instrumentação e Microbiologia, pela amizade, atenção e ajuda nos momentos de dúvida;

À técnica Eliana pela imensa e valiosa ajuda nas análises de eletroforese;

À todas as minhas queridas amigas/irmãs pela convivência e imensa ajuda, até como babá do Pedro, especialmente a Cláudia, Clarice, Mônica, Lígia, Rosemar, Simone, meu eterno agradecimento;

E também às queridas amigas, Karina, Cecília, Milena, Renata, Letícia, Ana e amigos Diogo e Guilherme;

Aos amigos e funcionários do CECI/Unicamp (creche), pelo carinho e cuidados com meu Pedro;

Aos meus pais, Margarete e Renaldo, e irmã Letícia pelo incentivo e apoio incondicional;

Ao meu filho, Pedro, o melhor presente que a vida me deu;

Ao meu companheiro de vida, pelo carinho, apoio e compreensão, sempre. Pela dedicação ao nosso filho e por ser pãe (pai e mãe) quando o trabalho me exigiu maior dedicação;

A minha sogra por todo apoio e carinho;

As minhas novas amigas do IFRJ (instituto Federal do Rio de Janeiro), Paula, Marilza e Rosana;

Aos professores e funcionários do DTA;

À CAPES pela concessão da bolsa e a FAPESP pelo financiamento do projeto;

À todos amigos que de alguma forma contribuíram,

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

RESUMO GERAL.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL	14
Capítulo 1.....	17
USO DE MICROFILTRAÇÃO PARA MELHORIA DA QUALIDADE E EXTENSÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO.....	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE	20
2.1. Qualidade microbiológica do leite cru	20
2.2. Qualidade do leite cru refrigerado.....	20
2.3. Plasmina.....	23
2.4. Enzimas associadas à mastite	24
2.5. Enzimas de micro-organismos psicrotróficos.....	25
3. USO DE MICROFILTRAÇÃO PARA ESTENDER A VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE.....	26
4. INCRUSTAÇÕES E LIMPEZA DE MEMBRANAS	29
5. AUMENTO DA VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE PASTEURIZADO.....	31
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO 2	42
DESEMPENHO DA MEMBRANA ISOFLUX® NA MICROFILTRAÇÃO DE LEITE DESNATADO.....	43
Sumário Interpretativo.....	43
RESUMO	44
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Processamento de Leite Desnatado Microfiltrado Pasteurizado em Escala Piloto	47
2.2. Desempenho da Membrana de Microfiltração	48
2.3. Caracterização do Leite	49

2.4. Análise Estatística dos resultados.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
Desempenho da Membrana	50
Fluxo de Permeado.....	50
Retenção de Micro-organismos e Células Somáticas.....	54
Retenção de Caseína e Gordura.	56
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 3	61
INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DO LEITE CRU E DA	
MICROFILTRAÇÃO NA QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE	
PASTEURIZADO	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1. Processamento do leite microfiltrado pasteurizado.....	65
2.2. Análises físico-químicas e microbiológicas	67
2.3. Análise sensorial	69
2.3.1. Detecção de sabor amargo durante armazenamento do leite microfiltrado	
pasteurizado.....	69
2.3.2. Aceitação sensorial.....	70
2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística	70
2.5. Vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1. Efeito do armazenamento refrigerado do leite cru.....	71
3.2. Qualidade e vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado.....	72
3.3. Aceitação sensorial e intenção de compra	79
4. CONCLUSÃO	82
5. REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS.....	86
CONCLUSÃO GERAL.....	87

RESUMO GERAL

A extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado é um desafio e uma necessidade para a indústria de laticínios. A microfiltração tem sido utilizada para remoção de micro-organismos e aumento da qualidade e vida de prateleira de leite fluido, sendo geralmente realizada em membranas cerâmicas sob o conceito de Pressão Transmembranar Uniforme (PTU). O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de um novo tipo de membrana (Isoflux®) capaz de manter o fluxo de permeado constante ao longo do comprimento da membrana e também o efeito do armazenamento refrigerado e da microfiltração na qualidade e vida útil do leite pasteurizado. O desempenho da membrana Isoflux®, na microfiltração do leite cru, foi avaliado através da determinação do fluxo de permeado, retenção de células somáticas, micro-organismos, gordura e caseína. Em geral, o fluxo da membrana estudada foi baixo, variando de 130 a 200 Kg/h/m². A retenção de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos foi maior que 99%, enquanto a retenção de coliformes foi de 90%, e de 100% para células somáticas. A membrana reteve, em média, 11,2% de caseína e 34,6% de gordura. O efeito do armazenamento refrigerado do leite cru (7 °C/ 6 dias) e o impacto da microfiltração na microbiota, qualidade e vida de prateleira do leite pasteurizado foram avaliados pela contagem de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes, pelas alterações físico-químicas (pH, acidez titulável e viscosidade), atividade proteolítica, ocorrência de sabor amargo e aceitação sensorial durante o tempo de armazenamento. Houve um aumento de 2,15 ciclos logarítmicos no número de micro-organismos mesófilos e de 2,55 ciclos para os psicrotróficos, após o armazenamento do leite cru a 7 °C/6 dias. Durante esse tempo, não houve alteração na composição do leite e sua viscosidade permaneceu constante. A microfiltração reduziu em 3 e 4 ciclos logarítmicos a contagem inicial de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, respectivamente. Não foi observada diferença significativa na atividade proteolítica, na viscosidade e no perfil sensorial do leite microfiltrado pasteurizado, durante a vida de prateleira do produto. O produto apresentou boa aceitação sensorial com média de 6,31 para o atributo sabor, sendo que mais de 50 % dos provadores certamente ou provavelmente comprariam o produto, durante toda sua vida de prateleira, independente de ser obtido de leite controle ou com armazenamento refrigerado prévio (7 °C/6 d). O gosto amargo aumentou com o tempo de armazenamento, mas não atingiu níveis que resultassem em rejeição do produto. Aos 15 dias de armazenamento refrigerado, o leite microfiltrado pasteurizado atingiu uma contagem de micro-organismos mesófilos de 3×10^4 UFC/mL, o que determinou o fim da sua vida de prateleira. A microfiltração aliada à pasteurização proporcionou

a obtenção de um produto com maior vida útil de prateleira, mesmo quando proveniente de leite cru refrigerado armazenado a 7 °C por 6 dias.

GENERAL SUMMARY

Extending the shelf life of pasteurized milk is a challenge and a necessity for the dairy industry. The microfiltration has been utilized for the removal of microorganisms and increase the quality and shelf life of liquid milk, usually being held in ceramic membranes under the concept of uniform transmembrane pressure. A new membrane, Isoflux®, with modified thickness of the separating layer, is claimed to maintain a nearly constant permeate flux along the length of the membrane. The performance of membrane Isoflux® on the microfiltration of skim milk and the influence of concentration factor on the components retention by the membrane was evaluated. Permeate flux, reduction of bacteria and somatic cells, and partition of the main components of milk permeate and retentate during milk Microfiltration (MF) were determined. In general, the flux of membrane studied was low, varying with 130 a 200 Kg/h/m². The retention of mesophilic and psychrotrophic microorganisms was greater than 99%, 90% for coliforms, and 100% of somatic cells. The membrane retained, on average, 11.2% of casein and 34.6% fat. In general, the flux of the Isoflux® membrane was low, ranging 130-200 Kg/hm². The new technical regulations require that raw milk is refrigerated on the farm. The effect of refrigerated storage of raw milk and the impact of the microfiltration on the microbiological quality and shelf life of pasteurized milk was assessed by bacterial counts (mesophilic, psychrotrophic and coliforms), physico-chemical changes (pH, titratable acidity, viscosity), proteolytic activity, the development of bitter taste and sensory acceptance during the storage time. There was an increase of 2.15 log in the number of mesophilic bacteria and of 2.55 log for psychrotrophic microorganisms after the storage of raw milk to 7 ° C/6 days. No changes in raw milk composition and viscosity occurred during the refrigerated storage. The microfiltration reduced by 3 log the initial count of mesophilic and up to 4 log the number of psychrotrophic microorganisms. There was no significant proteolytic activity, nor changes in viscosity or relevant sensory changes that might interfere with the sensory acceptance of microfiltered pasteurized milk during the 15 days of storage. The product had good acceptability with an average of 6.31 for the attribute flavor, with more than 50% of the panelists certainly or probably buy the product throughout its shelf life, whether it be milk obtained from control or refrigerated raw milk (7 ° C/6 d). The bitter taste increased with storage time, but did not reach levels that would result in rejection of the

product. At 15 days of refrigerated storage, microfiltered pasteurized milk reached a mesophiles count of 3×10^4 CFU/mL, which determined the end of its shelf life.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos 20 anos, a produção de leite no Brasil cresceu cerca de 107%. O país é o 5º maior produtor de leite, representando 5,3% da produção mundial, com 32 bilhões de litros produzidos em 2011. Em 2009, cerca de 7.042 milhões de litros foram destinados à produção de leite fluido (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012). Esse mercado é dominado pelo leite UHT (74,6%) em função do preço, logística e conveniência (maior vida útil e armazenamento a temperatura ambiente). Desde 1997, têm-se observado uma diminuição no consumo de leite pasteurizado apesar da melhor qualidade sensorial em relação ao UHT.

Em países onde o leite possui alta qualidade, a vida útil de um leite pasteurizado distribuído e mantido sob refrigeração pode chegar até duas semanas, mantendo seu sabor natural e fresco (BOOR, 2001). No Brasil, o leite pasteurizado, mantido sob refrigeração, apresenta vida de prateleira de no máximo oito dias, e se deteriora rapidamente pelo crescimento de micro-organismos psicrótróficos e/ou outros deteriorantes.

A microfiltração seguida de pasteurização é uma tecnologia já aplicada em vários países da Europa, nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, para estender a vida útil do leite refrigerado. É classicamente realizada utilizando membranas cerâmicas sob o conceito de Pressão Transmembranar Uniforme (PTU). Uma nova membrana, Isoflux®, com a espessura modificada da camada de separação, tem sido recomendada pelo fabricante como capaz de manter um fluxo de permeado quase constante ao longo do comprimento da membrana (SKRZYPEK e BURGER, 2010).

A microfiltração promove a remoção de células somáticas, a redução de cerca de 4 ciclos logaritmos na contagem total microbiana, e a pasteurização pós-microfiltração elimina a maioria dos micro-organismos remanescentes.

Os Regulamentos Técnicos da Instrução Normativa (IN) 51 (BRASIL, 2002) e 62 (BRASIL, 2011) que tornam obrigatória a refrigeração do leite cru na propriedade, e sua coleta e transporte refrigerado em até 48 horas após a ordenha, representam um grande avanço para a melhoria da qualidade do leite. É recomendável que a refrigeração do leite seja realizada a temperaturas menores que 5 °C. Entretanto, a legislação brasileira permite que o leite seja refrigerado na fazenda a 7 °C e entregue no laticínio a 10 °C. Além disso, também permite que o leite cru, refrigerado em tanques de expansão comunitários, atinja temperaturas de até 10 °C, nem sempre mantida durante o tempo de armazenamento. Também é comum que o leite cru, após o período de refrigeração na fazenda, seja transportado para o entreposto ou direto para a usina beneficiadora, onde ainda fica estocado por horas ou dias nos silos,

antes de ser processado. Além disso, o leite cru pode ser comercializado entre diferentes indústrias de beneficiamento, aumentando o tempo de armazenamento antes do processamento. O uso de temperaturas inadequadas e tempos prolongados de armazenamento refrigerado do leite cru, na fazenda e na usina beneficiadora, favorecem o crescimento de micro-organismos psicotróficos. Os micro-organismos psicotróficos são eliminados pela pasteurização, mas suas enzimas são resistentes até ao tratamento UHT, gerando defeitos de sabor e textura, que são determinantes para o fim da vida de prateleira do leite fluido. Defeitos de sabor e textura causados pela ação dessas enzimas são perceptíveis quando a população de psicotróficos atinge contagens iguais ou maiores que 10^6 UFC/ml.

O objetivo deste trabalho foi determinar o desempenho da membrana Isoflux® na microfiltração de leite desnatado e verificar o efeito da refrigeração do leite cru, em condições típicas do Brasil, e a influência da microfiltração associada a pasteurização na qualidade microbiológica, propriedades sensoriais e vida útil do leite microfiltrado pasteurizado, acompanhando sua aceitação sensorial, atividade proteolítica e mudanças físico-químicas com o tempo de armazenamento.

A tese está dividida em três partes:

- Capítulo 1: revisão sobre o uso da microfiltração para melhoria da qualidade do leite pasteurizado;
- Capítulo 2: Desempenho da membrana Isoflux® na microfiltração de leite desnatado;
- Capítulo 3: Influência do armazenamento refrigerado do leite cru e da microfiltração na qualidade e vida de prateleira do leite pasteurizado

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção I.
2. BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 251, p. 6-11, 29 dez. 2011. Seção I.

3. EMBRAPA GADO DE LEITE. Produção, industrialização e comercialização (consumo). Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br> Acesso em: 01º de abril de 2012.
4. SKRZYPEK, M.; BURGER, M. Isoflux® ceramic membranes — Practical experiences in dairy industry. **Desalination**, v.250, p. 1095–1100, 2010.

Capítulo 1

USO DE MICROFILTRAÇÃO PARA MELHORIA DA QUALIDADE E EXTENSÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO

A ser submetido à Revista “Brazilian Journal of Food Technology”

USO DE MICROFILTRAÇÃO PARA MELHORIA DA QUALIDADE E EXTENSÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO

Use of microfiltration for improving the quality and shelf life extension of pasteurized milk

Veridiana Carvalho Antunes*, Luiz Antônio Viotto†, Walkiria Hanada Viotto*¹

*Departamento de Tecnologia de Alimentos, †Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil.

¹Autor para correspondência: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, CEP.13083-862 Campinas – SP, Brasil. Tel (19) 3521 4016, Fax (19) 3521 3617, E-mail: walkiria@fea.unicamp.br

RESUMO

A microfiltração é uma das tecnologias utilizadas para melhorar a qualidade do leite fluido. Essa revisão discute a importância da qualidade do leite cru, dos micro-organismos contaminantes e das enzimas: as naturais do leite, e as provenientes das células somáticas ou do crescimento dos micro-organismos psicrotróficos. São descritas as condições de estocagem do leite cru, que são decisivas para a qualidade e vida de prateleira do leite pasteurizado. Também são mencionados os progressos já obtidos e em desenvolvimento da tecnologia de microfiltração para a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado e são descritos os problemas associados com incrustações da membrana que afetam o seu desempenho.

Palavras-chave: membranas, remoção de micro-organismos, armazenamento refrigerado, leite

ABSTRACT

The microfiltration is one of the technologies used to improve the quality of fluid milk. In this review we discuss the importance of milk quality, contaminants micro-organisms and enzymes: natural milk, from somatic cells or the growth of psychrotrophic. We describe the conditions of storage of raw milk, which are decisive for the quality and shelf life of pasteurized milk. The progress made in developing and microfiltration technology for extending the shelf life of pasteurized milk Are also mentioned and the problems associated with fouling of the membrane that affect its performance are described.

Key-words: microfiltration, bacterial removal, shelf life, refrigerated milk

1. INTRODUÇÃO

A extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado, mantendo as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, é um desafio e uma necessidade para a indústria de laticínios. Além da redução dos custos de produção e melhoria da logística de distribuição, o aumento da vida de prateleira do leite pasteurizado atende à busca do consumidor por alimentos mais naturais, seguros, convenientes e sem os defeitos sensoriais normalmente associados com tratamentos térmicos intensos.

No Brasil existem basicamente dois tipos de leite fluido de consumo, o leite pasteurizado e o leite longa vida ou UHT (*ultra high temperature*). Nos últimos anos houve uma diminuição no consumo de leite pasteurizado e crescimento considerável no consumo de leite UHT (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012), que pode ser armazenado à temperatura ambiente. No Brasil, o leite pasteurizado refrigerado tem uma vida de prateleira de 3 a 7 dias e o leite UHT, de 2 a 6 meses. As alterações causadas por bactérias deterioradoras e a produção de enzimas por essas bactérias são os principais fatores que limitam a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado convencional. Além disso, a ocorrência de mastite nos animais e as condições de armazenamento refrigerado de leite no Brasil podem favorecer a alta produção de enzimas que diminuem a qualidade do leite cru, abreviando o tempo de vida de prateleira do leite pasteurizado. Já no caso do leite UHT, apesar do tratamento térmico eliminar praticamente todos os micro-organismos, garantindo uma longa vida de prateleira, ele confere um sabor cozido, que pode ser indesejável para uma parcela dos consumidores.

Uma alternativa para a produção de um leite de vida de prateleira estendida com características sensoriais similares às do leite pasteurizado seria a aplicação da microfiltração antes da pasteurização. A microfiltração é uma tecnologia de membrana, não térmica, que reduz a carga microbiana do leite. O efeito do armazenamento refrigerado do leite cru, a ação

da plasmina, enzimas produzidas por micro-organismos psicotróficos e aquelas associadas à mastite são revisadas. O artigo foca no uso de microfiltração como tecnologia alternativa para melhorar a qualidade do leite fluido e descreve os problemas associados com incrustações da membrana que afetam o seu desempenho, apontando os progressos já obtidos e em desenvolvimento dessa tecnologia para a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado.

2. FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE

2.1. Qualidade microbiológica do leite cru

Contagens elevadas de micro-organismos no leite cru evidenciam a existência de falhas nos procedimentos de manipulação e higienização, podendo comprometer a qualidade e diminuir a vida de prateleira do produto final (NÖRNBERG et al. 2009).

A deterioração microbiana é o principal fator limitante para a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado (BOOR, 2001). Portanto, a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado dependerá fundamentalmente da qualidade do leite cru, ou seja, da contagem inicial dos micro-organismos, do tipo de bactérias presentes (SCHMIDT et al., 2012), do número de células somáticas e das condições de armazenamento a que o leite cru é submetido (BARBANO et al., 2006). Além disso, a presença de enzimas termorresistentes produzidas por micro-organismos psicotróficos promove o desenvolvimento de sabores indesejáveis limitando ainda mais a vida de prateleira do leite pasteurizado (FROMM e BOOR, 2004).

2.2. Qualidade do leite cru refrigerado

O programa nacional de melhoria da qualidade do leite, segundo as Instruções Normativas 51 (BRASIL, 2002) e 62 (BRASIL, 2011), alterou o sistema de coleta do leite que passou a ser refrigerado nas fazendas, e também transportado a baixas temperaturas em caminhões isotérmicos. Essa medida também resultou na alteração do perfil de micro-organismos no leite, diminuindo os mesófilos e aumentando os psicotróficos, que são micro-organismos que crescem a temperatura de refrigeração, independente da sua temperatura ótima de crescimento (SANTOS, 2010).

A atual legislação permite que a temperatura do leite cru atinja até 7 °C e que ele seja coletado a cada dois dias (BRASIL, 2011), podendo ser armazenado na indústria para posterior processamento. O leite cru refrigerado pode ser transportado por longas distâncias

entre os centros produtores e os processadores, sendo possível que o processamento ocorra em 5 a 7 dias depois da ordenha. Este quadro é agravado no mercado *spot*, ou seja, na comercialização de leite cru refrigerado entre indústrias (VIANA, 2010).

A estocagem refrigerada do leite cru por longos períodos de tempo afeta negativamente a qualidade do leite pasteurizado devido ao desenvolvimento dos micro-organismos psicrotróficos (NÖRBERNG et al. 2010) que, apesar de serem destruídos na pasteurização, produzem lipases e proteases termorresistentes (COUSIN, 1982; CHEN et al., 2003). Defeitos de sabor e textura causados pela ação dessas enzimas são perceptíveis quando a população de psicrotróficos atinge contagens iguais ou superiores a 10^6 UFC/ml (COUSIN, 1982, NÖRBERNG et al., 2009).

Os micro-organismos psicrotróficos presentes no leite cru são bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, e *Flavobacterium*, e Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Destes gêneros, o mais comumente encontrado em leite é *Pseudomonas*, com destaque para a espécie *P. fluorescens*. Outras espécies incluem *P. fragi*, *P. putida* e *P. aeruginosa* (COUSIN, 1982; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997, DE JONGHE et al., 2011). O gênero *Bacillus* também merece destaque por possuir micro-organismos formadores de esporos como o *Bacillus sporothermodurans* e resistentes aos tratamentos térmicos aplicados ao leite como o *Bacillus stearothermophilus* (SORHAUG e STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003).

Condições de estocagem do leite cru a 4°C por tempo inferior a 48 h seriam ideais para minimizar o crescimento de micro-organismos psicrotróficos, e consequentemente a produção de suas enzimas, conforme preconiza a legislação brasileira que entretanto, permite a estocagem do leite até 7 °C na propriedade rural e 10 °C na indústria (BRASIL 2002; BRASIL 2011). O problema é ainda mais grave, pois muitos produtores não seguem essa recomendação. No estudo realizado por Santos et al. (2009) observou-se que apenas 38,24% das amostras foram coletadas dentro do prazo previsto pela legislação, que é de no máximo 48 horas, e 61,76% das amostras foram coletadas com até 216 horas de estocagem. Além disso, 11,76% das amostras também estavam com temperaturas acima do recomendado e foram detectadas diferenças entre a temperatura aferida com o termômetro e a lida no termostato do tanque de expansão, no momento da coleta.

A relevância da temperatura e do tempo de refrigeração no crescimento dos micro-organismos psicrotróficos já foi objeto de diversos estudos (HARYANI et al., 2003; LORENZETI, 2006; SANVIDO, 2007; SANTOS et al., 2009; IZIDORO et al., 2010; LISITA, 2010).

A contagem de psicrotróficos, a produção de proteases e a proteólise foram avaliadas em leite cru estocado a 2, 4 e 7 °C por 10 dias. O leite cru estocado a 2 °C demorou 9 dias para atingir uma população de psicrotróficos de 10^7 UFC/mL, porém quando estocado a 4 °C a mesma contagem foi atingida em 7 dias e, na temperatura de 7 °C, em apenas 4 dias de armazenamento. O tempo mínimo para a detecção de proteólise também variou em função da temperatura de estocagem, sendo de 6, 4 e 2 dias quando estocado em 2, 4 e 7 °C, respectivamente (HARYANI et al., 2003). Viana (2010) também observou que quando o leite foi estocado a 4 °C ele demorou 5 dias para atingir uma população de 10^6 UFC/mL de micro-organismos psicrotróficos e, de 3-4 dias, quando estocado a 7 °C.

Quando o leite foi armazenado a 5 °C durante 4 e 7 dias, Sanvido (2007) observou um aumento significativo de todos os micro-organismos analisados e da proteólise. A contagem inicial de micro-organismos totais aumentou de $7,4 \times 10^3$ para $6,1 \times 10^6$ e $1,83 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente, após 4 e 7 dias de armazenamento refrigerado. Nos mesmos períodos, a contagem de psicrotróficos passou da ordem de 10^3 para 10^6 e 10^7 UFC/mL.

O aumento do número de psicrotróficos com o tempo de resfriamento também foi observado em outro trabalho (IZIDORO et al., 2010), onde leite cru foi armazenado a 4, 8 e 12 °C por 12, 24 e 48h. Foram observadas contagens mais altas de psicrotróficos quando o leite foi armazenado a temperaturas mais elevadas. Leite cru com contagem inicial menor que 4 log UFC de psicrotróficos por mL estocado a 4 e 8 °C por 48h, apresentaram um aumento de, no máximo 2 ciclos logarítmicos. No entanto, quando as contagens iniciais foram maiores que 4 log UFC/mL, as contagens finais de psicrotróficos foram superiores a 6 log UFC/mL, independente da temperatura de estocagem.

Lorenzetti (2006) mostrou o efeito do tempo de estocagem refrigerada do leite cru no desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos. O leite que passou pelo entreposto antes de ser entregue na indústria, ou seja, mais de 72 horas de estocagem refrigerada, apresentou contagens de psicrotróficos muito elevadas na indústria ($9,8 \times 10^8$ UFC/mL), enquanto que o leite entregue entre 24 e 48 horas após a ordenha atingiu contagens de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, o que evidencia a necessidade de minimizar o tempo de estocagem refrigerada do leite. A importância da redução do tempo de estocagem do leite também foi demonstrada por Santos et al (2009) que observaram que a contagem de micro-organismos psicrotróficos no leite cru refrigerado (5 °C) aumentou de 3,0 log UFC/mL após 24h de armazenamento para 4,9 log UFC/ML após 96h, atingindo 6,5 log UFC/mL após 216h de armazenamento a 5 °C.

A estocagem refrigerada do leite cru também pode afetar a qualidade dos produtos processados. Leite UHT produzido com leite cru, previamente armazenado a 10°C, apresentou maior extensão de proteólise e lipólise, com diminuição da relação caseína/proteína e aumento

do teor de ácidos graxos livres ao longo do tempo de estocagem quando comparado ao leite UHT originado de leite cru armazenado a 3 e 7 °C por 3 dias (LISITA, 2010).

A ocorrência de proteólise no leite pode ser resultado da ação de enzimas proteolíticas responsáveis por diferentes alterações físico-químicas como a plasmina, as enzimas associadas à mastite e as enzimas termorresistentes dos psicotróficos. Segundo Santos et al. (2003), no leite de boa qualidade microbiológica, a proteólise ocorrida é devida às proteases endógenas do leite, das quais a mais importante é a plasmina. Condições não adequadas de refrigeração do leite cru resultam em grande número de micro-organismos psicotróficos e produção de proteases termorresistentes. A proteólise também pode ser causada pelas enzimas das células somáticas, principalmente se a contagem destas no leite estiver alta (FERNANDES et al., 2008).

2.3.Plasmina

A proteólise do leite pode ser atribuída à plasmina e seu precursor inativo, o plasminogênio. O sistema plasmina-plasminogênio é composto por cinco componentes: a plasmina, os inibidores de plasmina, o plasminogênio (PG), os ativadores de plasminogênio e os inibidores desses ativadores (ISMAIL e NIELSEN, 2010). O principal ativador no sangue é o t-PA, que se encontra associado às micelas de caseína, enquanto o u-PA é associado com as células somáticas. No leite, o plasminogênio, a plasmina e os ativadores de plasminogênio estão associados às micelas de caseína, enquanto os inibidores de plasmina e de ativadores de PG estão presentes principalmente no soro do leite. A atividade dos componentes presentes no soro é afetada pelas condições do processo como variações do pH e tratamento térmico.

O crescimento de micro-organismos psicotróficos pode interferir no sistema plasmina-plasminogênio (ISMAIL e NIELSEN, 2010, SCHROEDER et al., 2008). As proteases de psicotróficos, como as produzidas por *Pseudomonas*, ao agirem sobre a micela de caseína, podem liberar a plasmina ligada à caseína para o soro (FAJARDO-LIRA e NIELSEN, 2000). Além disso, as proteases de psicotróficos também podem agir como ativadores de plasminogênio, ou seja, convertendo o plasminogênio em plasmina (KOHLMANN et al., 1991).

A plasmina é uma protease, com pH ótimo de 7,4-7,5, que degrada β , α_{s1} e α_{s2} -caseínas, sendo a β -caseína a mais susceptível (HACHANA et al., 2010). O acúmulo de peptídeos hidrofóbicos, geralmente oriundos da degradação da β -caseína, resulta no desenvolvimento de gosto amargo em produtos lácteos (CHAVAN et al., 2011).

A pasteurização a 72 °C por 15 segundos reduz a atividade da plasmina entre 10-17%, porém esta enzima pode estar presente mesmo após o processamento do leite em temperatura ultra-alta (140 °C por 3 segundos). O tratamento térmico pode também inativar os inibidores de ativadores de plasminogênio, aumentando dessa forma o teor de plasmina em leite pasteurizado (PRADO et al., 2006).

A refrigeração também pode afetar os mecanismos de autólise e ativação do plasminogênio e, portanto, interferir na atividade da plasmina durante a estocagem refrigerada do leite cru. Crudden et al. (2005) observaram uma maior autólise da plasmina durante a estocagem do leite a 5 °C do que a 20 e 37 °C, o que pode ser atribuído à ocorrência de menor ativação do plasminogênio às baixas temperaturas. Os autores mostraram que os mecanismos que mais afetaram a ação hidrolítica da plasmina no leite foram a maior autólise a 5 °C, em comparação com 20 e 37 °C e a ativação do plasminogênio a 37 °C.

Em leite cru com baixa contagem de micro-organismos, a proteólise ocorre principalmente pela ação da plasmina e, em leite com contagens superiores a 10^6 UFC/mL predomina a ação das proteases microbianas. Guinot-Thomas et al. 1995 mostraram que a atividade proteolítica das proteases microbianas foi mais importante que a plasmina quando a população microbiana atingiu $10^6 - 10^7$ UFC/mL após armazenamento do leite cru a 4 °C/ 4 dias. No entanto, em leite de alta qualidade microbiológica (contagem menor que 10^3 UFC/mL), a atividade proteolítica observada após estocagem a 4 °C/72h foi atribuída à plasmina (WIKING et al., 2002).

O processo de microfiltração também pode alterar a atividade da plasmina. A retenção da plasmina foi similar a da caseína no processo de microfiltração em membrana com diâmetro de poro de 800KDa, sendo sua atividade no retentado inversamente proporcional ao teor de proteínas do soro (AALTONEN e OLLIKAINEN, 2011), já que a presença dessas proteínas inibem a atividade da plasmina.

2.4.Enzimas associadas à mastite

O efeito da mastite na qualidade do leite já está bem documentado (LÉ MARECHAL et al., 2011; ANDREZZA et al., 2008; FERNANDES et al 2008; BARBANO et al., 2006; SANTOS et al 2003; MA et al., 2000). A mastite ocasiona aumento da contagem de células somáticas (CCS), que está relacionado ao aumento de proteases, principalmente oriundas dos leucócitos, como as catepsinas D, G e B e a elastase, que podem degradar as β e α_{s1} caseínas (LÉ MARECHAL et al., 2011).

O aumento da atividade enzimática acelera o desenvolvimento de defeitos sensoriais no leite como a rancidez e o sabor amargo, provocados pela lipólise e proteólise (SANTOS et al., 2003), resultando na diminuição da vida de prateleira de leites fluidos. As alterações sensoriais resultantes da alta contagem de células somáticas podem permanecer no leite mesmo após pasteurização ou tratamento UHT (LÉ MARECHAL et al., 2011).

Leite pasteurizado ou UHT provenientes de animais com mastite são caracterizados por níveis elevados de proteases e lipases nativas, principalmente devido ao aumento da contagem de células somáticas e tem sido demonstrado que são mais susceptíveis ao desenvolvimento de *off-flavors* em relação a leites com baixa CCS (FERNANDES et al., 2008; SANTOS et al., 2003). Ma et al. (2000) observaram que em leite pasteurizado com alta CCS, o aumento dos ácidos graxos livres e da hidrólise da caseína foi três vezes maior do que no leite pasteurizado com baixa CCS. O leite com alta CCS também apresentou defeitos sensoriais como rancidez, sabor amargo e adstringência.

A alta contagem de células somáticas em leite cru é associada à proteólise de β -caseína e α_s -caseína em leites UHT, o que pode levar a defeitos de qualidade durante o armazenamento (ANDREZZA et al., 2008). Portanto, é recomendável que o leite cru utilizado para a produção de leite fluido contenha baixa contagem de células somáticas, para evitar a degradação das frações de caseína e a ocorrência de defeitos de qualidade durante o armazenamento do produto.

As enzimas provenientes das células somáticas podem ser o fator limitante da vida de prateleira do leite pasteurizado, produzido a partir de leite cru com baixa contagem microbiana. Essas enzimas serão responsáveis pela produção de defeitos sensoriais no produto final (BARBANO et al., 2006). A microfiltração, ao retirar todas as células somáticas do leite, pode evitar alterações causadas pela liberação de suas enzimas que ocorre nos tratamentos térmicos convencionais, contribuindo para aumentar a vida de prateleira do leite pasteurizado (GÉSAN-GUIZIOU, 2010).

2.5.Enzimas de micro-organismos psicotróficos

As proteases extracelulares dos psicotróficos atuam preferencialmente sobre a κ -caseína (RECIO, 2000), seguida da β -caseína, hidrolisada por essas enzimas mais rapidamente que a α -caseína (HACHANA et al., 2011).

A atividade proteolítica de *Pseudomonas sp* isoladas de 9 amostras de leite cru foi investigada por Adams et al.(1976). Os resultados mostraram que a maioria das cepas degradava a κ -caseína antes mesmo de a população atingir 10^4 UFC/mL, e que a degradação

da β -caseína foi mais pronunciada quando as populações foram maiores que $10^6 - 10^7$ UFC/mL. No entanto, Nörnberg et al. (2009) não encontraram correlação entre a atividade proteolítica e as contagens de psicrotróficos, sugerindo que a proteólise está associada a linhagens específicas de bactérias.

Recio (2000) caracterizou os peptídeos produzidos pela ação das proteases de psicrotróficos na κ -caseína e verificou que os mesmos foram similares aos obtidos pela ação da quimosina, apesar das proteases microbianas serem menos específicas. Já as proteínas do soro são relativamente insensíveis à ação das proteases de psicrotróficos (FAIRBAIN e LAW, 1986).

A produção de enzimas hidrolíticas termorresistentes por bactérias psicrotróficas pode ocasionar alterações indesejáveis no leite UHT, como a gelificação e o desenvolvimento de sabor amargo (DATTA e DEETH, 2003). A utilização da microfiltração do leite, seguida de pasteurização, auxilia na obtenção de um produto com baixa população microbiana e consequentemente com número de psicrotróficos remanescentes reduzido. A redução dos psicrotróficos e consequente produção de suas enzimas pode aumentar a vida de prateleira do leite pasteurizado.

3. USO DE MICROFILTRAÇÃO PARA ESTENDER A VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE

A tecnologia de microfiltração (MF) utiliza membranas para concentração e/ou separação de certos constituintes do leite, e está baseada na permeabilidade seletiva de um ou mais constituintes através da membrana (CHERYAN, 1998). O tamanho do poro da membrana varia de 0,1 a 10 μ m, o que significa que a MF pode ser utilizada para o fracionamento de proteínas e, principalmente, para remoção de micro-organismos, células somáticas e gordura residual (MAUBOIS, 2002; TE GIFFEL e VAN DER HORST, 2004).

O processo de separação por membranas começou a ser utilizado na indústria de laticínios na década de 70. Entretanto, o processo de microfiltração industrial somente foi viabilizado nos anos 90, com o advento das membranas cerâmicas e o desenvolvimento do conceito PTU (Pressão Transmembrana Uniforme) (POULIOT, 2008), que foi introduzido com o processo denominado BactocatchTM (MAUBOIS, 2002). Nesse sistema, faz-se uma recirculação de parte do permeado pressurizado, para manter a pressão uniforme em toda a extensão da membrana e garantir um fluxo de permeado constante, ao diminuir a perda de carga ao longo da membrana e, consequentemente, as incrustações. Entretanto, a utilização de

um sistema adicional de bomba ocasiona altos custos operacionais. Por este motivo, novos sistemas foram desenvolvidos como alternativas ao uso do sistema PTU, com menor consumo de energia e economias no investimento, sem necessidade de bomba para recircular o permeado. O primeiro sistema alternativo ao PTU, conhecido como Membralox GP®, é baseado na variação contínua da porosidade do suporte da membrana. O segundo, chamado de Isoflux® é baseado na variação contínua de espessura da camada da membrana (MAUBOIS, 2002; SKRZYPEK e BURGER, 2010).

O conceito da Isoflux® foi apresentado em 2000, pela Tami Industrie (Nyons/França), através de uma membrana, especialmente desenvolvida, com modificação da espessura da camada de separação que diminui da entrada para a saída, mantendo a pressão constante. Essa modificação também produz fluxo constante ao longo do comprimento da membrana, o que proporciona melhor desempenho, em termos de taxas de fluxo e permite uma melhor homogeneidade nos processos de separação. Além disso, a incrustação ocorre de modo uniforme ao longo de todo o comprimento da membrana, o que resulta em maior facilidade de limpeza química (SKRZYPEK e BURGER, 2010).

A membrana Isoflux® tem sido utilizada em algumas indústrias da Europa para remoção de células vegetativas e esporos de micro-organismos produzindo leite com vida de prateleira estendida, para recuperação de salmoura e também para produção de caseína (SKRZYPEK e BURGER, 2010). No entanto, dados científicos sobre seu desempenho são escassos na literatura.

A utilização da MF com membranas de poro de 1,4µm permite a redução do número de micro-organismos totais e uma remoção completa de células somáticas do leite desnatado (SABOYA e MAUBOIS, 2000; TE GIFFEL e VAN DER HORST, 2004), resultando em um leite praticamente estéril, aumentando dessa forma a qualidade, segurança e vida de prateleira do leite e de seus derivados.

A microfiltração isolada pode promover redução de 4 a 5 ciclos logarítmicos na contagem de micro-organismos totais, mas a legislação da maioria dos países exige a posterior pasteurização do leite (GOFF e GRIFFITHS, 2006). Elwell e Barbano (2006) relataram uma redução bacteriana de 3,8 ciclos log na microfiltração e de 5,6 ciclos log na microfiltração (com utilização de Membralox ®) seguida de pasteurização a 72°C por 15s em leite desnatado. Uma redução de 2-3 ciclos log em leite bovino e caprino também foi obtida com processo de microfiltração (BEOLCHINI et al, 2005). Com a utilização de membrana Isoflux®, uma redução de aproximadamente 4 ciclos log foi obtida em leite desnatado (SKRZYPEK e BURGER, 2010). Em escala laboratorial, uma redução de 94,6 a 99,9% no

número de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* foi realizada com a utilização de membrana Millipore® 1,2 µm (GRANT et al., 2005).

A microfiltração também tem sido utilizada em combinação com o processo de pulsos elétricos onde se conseguiu uma redução de micro-organismos mesófilos maior que 4,0 ciclos log, comparável ao processo de microfiltração seguido de pasteurização (RODRÍGUES-GONZÁLEZ et al., 2011).

O processo de microfiltração também é eficiente na remoção de esporos. Uma redução de 10⁵ esporos/mL de *B. cereus* e *Clostridium* sp de leite desnatado foi obtida utilizando membrana cerâmica com poro de 1,0µm (GUERRA et al. 1997). Também foi observada uma redução de 4,5 ciclos log de esporos de *Bacillus anthracis* em leite microfiltrado (TOMASULA et al., 2011). Por outro lado, o processo de microfiltração pode induzir a germinação dos esporos devido à temperatura utilizada (35-50 °C) ou por danos causados na estrutura dos esporos (TOMASULA et al., 2011).

Com o intuito de prevenir a germinação de esporos termofílicos durante o processo de microfiltração convencional, Fristich e Moraru (2008) otimizaram os parâmetros para realização de microfiltração a frio (6 °C). A remoção de células vegetativas bacterianas, esporos e células somáticas foi eficaz, mantendo ao mesmo tempo uma composição de proteína no leite microfiltrado muito próxima da inicial do leite desnatado, com fluxo variando de 60 a 80L/h/m², de acordo com os parâmetros operacionais.

Além da produção de leite para consumo com vida útil prolongada, a microfiltração tem sido utilizada para remoção de micro-organismos e esporos de leite para elaboração de bebida láctea probiótica (DEBON et al., 2012) e queijos (DONG et al., 2009; SCHREIER et al., 2010).

A remoção de esporos e células somáticas é particularmente importante porque eles não são destruídos pelo processo de pasteurização (FRISTICH e MORARU, 2008). Além disso, os esporos podem germinar no produto, o que ressalta mais uma vez a vantagem do uso de microfiltração para remoção dos esporos e células somáticas (ELWELL e BARBANO, 2006).

Em geral, a remoção de micro-organismos por membranas com diâmetro de poro de 1,4µm não modifica a composição do leite microfiltrado (DONG et al., 2009, TOMASULA et al., 2011).

Apesar da remoção de esporos de *Bacillus anthracis* ser mais efetiva com a utilização de membrana com poro 0,8 µm, somente a membrana com poro de 1,4 µm permitiu uma transmissão completa da caseína (TOMASULA et al., 2011). Por outro lado, Morin et al. (2004), ao microfiltrar leiteiro, observaram menor transmissão de proteína em membrana com

poro de 1,4 μm em comparação com a de 0,8 μm , o que indica desvio da lei de Ferry. Esta lei de filtração indica que, para uma partícula de um dado diâmetro, um aumento no tamanho dos poros da membrana resulta em maior transmissão do componente. O resultado observado pelos autores pode ser atribuído às incrustações na membrana e a formação da camada gel polarizada.

4. INCRUSTAÇÕES E LIMPEZA DE MEMBRANAS

O fluxo de permeado é um parâmetro crítico na determinação da eficiência do processo de microfiltração. O declínio do fluxo de permeado em função do tempo de processamento de uma solução multicomponente, em comparação com a água pura, pode ser causado pela polarização da concentração e por incrustações (também conhecidas como *fouling*).

A incrustação nas membranas é um fenômeno muito complexo, principalmente quando o fluido é composto de leite ou derivados, devido à contribuição dos diferentes constituintes do leite, sendo as proteínas e os minerais (cálcio e fosfato) os principais componentes associados às incrustações (MARSHALL e DAUFIN, 1995). Micelas de caseína são consideradas as principais responsáveis pela formação do depósito na superfície da membrana e os íons cálcio também desempenham um papel nas incrustações irreversíveis, provavelmente pelo estabelecimento de ligações entre a membrana e as micelas e entre as próprias micelas (JIMENEZ-LOPEZ et al., 2008). A incrustação pode ocorrer por várias formas: pela deposição de proteínas desnaturadas ou aglomeradas na superfície da membrana, ou pela adsorção de proteínas no interior da estrutura dos poros das membranas, o que dificulta sua remoção.

Para minimizar a compactação da camada gel polarizada e impedir a rejeição das proteínas no processo de microfiltração de leite com membranas cerâmicas com diâmetro de poro de 1,4 μm , têm sido propostas condições otimizadas de velocidade (6 m/s) e pressão transmembrana (<30 kPa) (CHERYAN, 1998, SABOYA E MAUBOIS, 2000).

A eficácia do procedimento de limpeza de membranas é importante para garantir seu desempenho, seletividade e vida útil, sendo tema de diversos trabalhos (BLANPAIN-AVET et al., 2004; D'SOUZA e MAWSON, 2005; BLANPAIN-AVET et al., 2009; POPOVIC et al., 2009).

Na limpeza da membrana, geralmente são utilizados detergentes alcalinos para remoção de resíduos de proteínas e gorduras, e posteriormente ácidos principalmente para dissolver precipitados de sais inorgânicos (D'SOUZA e MAWSON, 2005). Entretanto,

Blanpain-Avet et al. (2004) tem recomendado o uso exclusivo de hidróxido de sódio (NaOH) uma vez que observaram aumento gradual no fouling residual da durante a limpeza com ácido nítrico.

A limpeza de membranas cerâmicas, com diâmetro de poro de 50 e 200nm com soda foi também mais eficiente que a realizada com agentes de limpeza alcalinos comerciais. Nesse estudo foram utilizados, além da soda, dois agentes de limpeza; um com 15-30% de óxido de amina e cerca de 5% de enzimas proteolíticas (D1) e, outro com 5-15% de fosfonatos e 5-15% de sais orgânicos (D2) na combinação de 0,8+0,5% e 1,2+0,75% de D2/D1. A melhor recuperação do fluxo inicial para membrana com diâmetro de poro de 50nm ocorreu com a utilização de NaOH 1,0%. (POPOVIC et al., 2009).

Diferentes estratégias para controle das incrustações e otimização dos processos de microfiltração estão disponíveis na literatura (GUERRA et al., 1997, FRISTICH e MORARU, 2008, MASKOOKI et al., 2008, MIRZAIE e MOHAMMADI, 2012). Entre elas destacam-se o uso do conceito de PTU (pressão transmembrana uniforme) com altas velocidades, promoção de turbulências, *backpulsing* (também conhecido como *backwashing*, *backflushing*: que é realizado através da promoção do fluxo no sentido contrário, ou seja, reversão da pressão transmembrana), utilização de ultrassom ou campos elétricos, entre outros (BRANS et al., 2004).

Reduções de 4 a 5 ciclos logarítmicos de esporos em leite desnatado foram conseguidos com a combinação de PTU e o conceito de *backpulsing* mesmo com baixa velocidade de alimentação (0,5 -1,0m/s). Contudo, a eficácia do *backpulsing* depende da frequência, duração e perfil de pressão, e também é altamente dependente da composição da alimentação (GUERRA et al.1997).

A utilização de ultrassom durante o processo de microfiltração do leite aumentou o fluxo de permeado (MIRZAIE e MOHAMMADI, 2012). Os autores estudaram o efeito do ultrassom sobre o fluxo de permeado e avaliaram vários parâmetros, tais como a pressão de alimentação, a potência de irradiação, a distância entre a fonte de irradiação e a superfície da membrana e a irradiação de impulsos. Um aumento de 5 vezes no fluxo foi obtido a uma pressão de 0,5 bar, potência de 40W e distância de 2,6 cm entre a fonte de irradiação e a superfície da membrana.

O ultrassom também pode ser utilizado para otimizar os processos de limpeza. Em estudo realizado por Maskooki et al. (2008), o uso de ultrassom individualmente e em conjunto com EDTA resultou em uma maior eficiência de limpeza da membrana quando comparado ao uso de EDTA sozinho.

5. AUMENTO DA VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE PASTEURIZADO

As tecnologias empregadas para estender a vida de prateleira do leite incluem o uso da bactofugação ou de membranas de microfiltração (MF), mas a MF é mais efetiva na redução da contagem microbiana (TE GIFFEL e VAN DER HORST, 2004; GÉSAN-GUIZIOU, 2010).

A tecnologia de MF é uma alternativa não térmica de processamento do leite fluido, com consequências benéficas na sua qualidade sensorial e vida de prateleira. A microfiltração do leite associa as vantagens da maior qualidade sensorial do leite pasteurizado em relação ao UHT e esterilizado, com a praticidade de um produto de vida de prateleira relativamente mais longa do que o produto apenas pasteurizado, mas sem prescindir da cadeia de frio para sua distribuição e comercialização (SABOYA e MAUBOIS, 2000).

A microfiltração seguida de pasteurização é uma tecnologia já aplicada em vários países da Europa, nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, para estender a vida útil do leite pasteurizado.

O leite Marguerite® foi o primeiro leite microfiltrado produzido na França. O produto é obtido a partir da mistura de creme tratado termicamente (95 °C/20s) e leite desnatado microfiltrado (membrana com diâmetro de poro de 1,4 µm), seguido de envase asséptico em garrafas plásticas. Legalmente, o produto é considerado leite cru, sendo a França o único país que permite a comercialização de leite cru microfiltrado. A vida de prateleira, do produto armazenado a 4 – 6 °C é de até 3 semanas, comparado a 3 dias para o leite cru não microfiltrado. Em 2008, foram produzidos 10 milhões de litros desse leite (CARVALHO e MAUBOIS, 2009).

Em outros países europeus e no Canadá, o leite microfiltrado sofre tratamento térmico de pasteurização (72 °C/15s), antes de ser envasado assepticamente, e sua vida útil se estende por até 35 dias. Esse produto apresenta ampla aceitação pelos consumidores devido às características sensoriais (como ausência de sabor de cozido) e maior vida de prateleira que o leite pasteurizado (BINETTI et al., 2001).

Hoffmann et al. (2006) afirmam que as propriedades sensoriais do leite microfiltrado são comparáveis às do leite pasteurizado. No entanto, Kaufmann (2009) *apud* Lorenzen et al. (2011) concluiu que o leite de vida de prateleira estendida também apresentava um sabor de cozido, porém menos pronunciado que o leite UHT. Kaufmann e Kulosik (2007) também citados por Lorenzen et al. (2011) notaram um sabor estranho no final da vida de prateleira, que foi atribuído à proteólise, pela inativação insuficiente de enzimas endógenas ou de origem

microbiana. Apesar disso, os autores não observaram relação entre alterações no perfil de aroma e o tempo de estocagem do leite.

Em outro estudo, Hoffman et al. (1996) realizaram testes com MF para produção de leite com vida de prateleira estendida, utilizando o sistema Tetra Pak *Filtration Systems*. Os autores observaram que uma combinação de microfiltração e pasteurização HTST (*high temperature short time*), com envase em condições assépticas produziu um leite com boas propriedades sensoriais. O leite assim tratado é uma alternativa à ultrapasteurização para estender a vida de prateleira de leite refrigerado. Quando a temperatura de distribuição utilizada foi de 5 a 6 °C, a vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado foi cerca de cinco semanas. Quando temperatura de armazenamento foi de 8 a 10 °C, o produto alcançou um máximo de duas a três semanas de vida útil. No estudo realizado por Elwell e Barbano (2006) o leite microfiltrado pasteurizado apresentou vida de prateleira de 46 e 32 dias quando o produto foi armazenado a 4,2 e 6,1°C, respectivamente.

Existe pouca informação sobre os fatores que limitam a vida de prateleira dos leites microfiltrados pasteurizados. Em um estudo realizado por Schmidt et al. (2012), observou-se que apesar da contagem total de micro-organismos após a microfiltração ser baixa (<1UFC/mL) e similar entre os produtos analisados, o número de micro-organismos no fim da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado apresentou grande variação (de <1 a 8 log UFC/ml) até mesmo em embalagens do mesmo lote de produção. Essa inesperada variação microbiana no fim da vida do produto foi atribuída à baixa contagem inicial do leite microfiltrado pasteurizado, que pode ter favorecido o desenvolvimento diversificado de espécies microbianas (SCHMIDT et al., 2012). Apesar da diversidade observada no estudo de Schmidt et al. (2012), o principal grupo de micro-organismos deteriorantes em leites microfiltrados pasteurizados foi o de bactérias Gram negativas (G -) recontaminantes (dos gêneros *Acinetobacter* e *Psycrobacter*) e bactérias formadoras de esporos, como *Paenibacillus* sp. e *Bacillus cereus*. A presença de esporos no leite pasteurizado também foi determinada como limitante da vida de prateleira por Fromm e Boor (2004). A biodiversidade de micro-organismos em leite microfiltrado também foi observada durante armazenamento de leite microfiltrado cru a 4 e a 8 °C, sendo *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Delftia* os gêneros dominantes após 3 dias de armazenamento, enquanto que após 7 dias, prevaleceu o gênero *Pseudomonas* (RASOLOFO et al., 2010).

A contagem total de micro-organismos viáveis foi maior em leites com vida de prateleira estendida obtidos por microfiltração quando comparado aos obtidos por tratamentos térmicos de 123-127 °C/1 – 5s (LORENZEN et al., 2011). Nesse estudo não foi detectado crescimento de enterococos e enterobactérias nas amostras analisadas. Também não foram

detectados bacilos psicrotróficos, mas seu crescimento pode ter sido inibido pela presença de outros contaminantes viáveis.

Em estudo recente (SCHMIDT et al., 2012), as alterações enzimáticas foram fatores limitantes à extensão da vida de prateleira de leite microfiltrado pasteurizado. Essas alterações foram ocasionadas pela presença de enzimas microbianas no produto, e foram mais pronunciadas nas amostras armazenadas a 10 °C em comparação com as amostras armazenadas a 4 e 8 °C.

6. CONCLUSÃO

As condições de refrigeração do leite cru são decisivas para a qualidade e vida de prateleira do leite pasteurizado, pois longos períodos ou temperaturas inadequadas podem favorecer o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos e a produção de suas enzimas. A microfiltração, em combinação com a pasteurização, pode ser uma alternativa para prolongar a vida de prateleira do leite pasteurizado, por meio da remoção de micro-organismos e células somáticas do leite cru. A otimização dos parâmetros do processo de microfiltração e do procedimento de limpeza, mais o desenvolvimento de novos sistemas de membrana são fundamentais para a implementação dessa tecnologia na indústria, que necessita de membranas com bom desempenho e vida útil prolongada. Ao reduzir a população bacteriana a níveis muito baixos, a combinação de microfiltração e pasteurização do leite resulta num produto sem os defeitos de sabor do leite UHT mas com vida de prateleira estendida sob refrigeração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALTONEN, T.; OLLIKAINEN, P. Effect of microfiltration of milk on plasmin activity. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 193-197, 2011.
2. ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 823-827, 1976.
3. ANDREZZA, M.F.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; ROSIM, R.E.; LIMA, C.G.; OLIVEIRA, C.A.F. Relationship between the somatic cell count in raw milk and the

- casein fractions of UHT milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 45-49, 2008.
4. BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v. 89(Suppl. 1), p. E15-E19. 2006.
 5. BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, v.6, p. 435-457, 1996.
 6. BEOLCHINI, F.; CIMINI, S.; MOSCA, L.; VEGLIO, F.; BARBA, D. Microfiltration of bovine and ovine milk for the reduction of microbial content: Effect of some operating conditions on permeate flux and microbial reduction. **Separation Science and Technology**, v.40, p. 757–772, 2005.
 7. BLANPAIN-AVET, P.; MIGDAL, J. F.; BÉNÉZECH, T. The effect of multiple fouling and cleaning cycles on a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate. Membrane performance and cleaning efficiency. **Food and Bioproducts Processing**, v.82(C3), p. 231–243, 2004.
 8. BLANPAIN-AVET, P.; MIGDAL, J. F.; BÉNÉZECH, T. Chemical cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate suspension—Characterization of hydraulic and chemical cleanliness. **Journal of Membrane Science**, v. 337, p. 153–174, 2009.
 9. BINETTI, A.G.; BAILO, N.B.; REINHEIMER, J.A. Aplicaciones de la microfiltración en la industria láctea. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, n.24, p. 48-52, 2001.
 10. BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: Looking to the future. **Journal of Dairy Science**, v.84, p. 1–11, 2001.
 11. BRANS, G.; SCHROEN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, R.G.M.; BOOM, R.M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263–272, 2004.
 12. BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção I.

13. BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 251, p. 6-11, 29 dez. 2011. Seção I.
14. CARVALHO, A.F.; MAUBOIS, J.L. Applications of membrane technologies in the dairy industry. **Engineering aspects of milk and dairy products**. Braga: Hardback, 2009, p. 33-56.
15. CHAVAN, S.R.; KHEDKAR, C.D.; JANA, A.H. UHT milk processing and effect of plasmin activity on shelf life: A Review 2011. **Comprehensive Reviews in food Science and Food Safety**, v. 10, n. 5, p. 251-268, 2011.
16. CHEN, L.; DANIEL, R.M; COOLBEAR, T. Review Impact of protease and lipase activity and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p. 255–275, 2003.
17. CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. 1ªEdição, New York, Lancaster:Technomic Publishing, USA, 1998. 597 p.
18. COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 172-207, 1982.
19. CRUDDEN, A.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 305–313, 2005.
20. DATTA, N.; DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.
21. DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E.S.; PETRUS, J.C.C; FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.M.O.; AMBONI, R.D.M.C.; VIEIRA, C.R.W. Storage stability of prebiotic fermented milk obtained from permeate resulting of microfiltration process. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, n.1, p. 96-102, 2012.
22. DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; HEYNDRIX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.
23. DONG, J.Y.; CHEN, L.J.; MAUBOIS, J.L.; MA, Y. Influence of medium-concentration factor microfiltration treatment on the characteristics of low-moisture Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science and Technology**, v.89, p. 139–154, 2009.

24. D'SOUZA, N.M.D.; MAWSON, A.J. Membrane Cleaning in the Dairy Industry: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 125–134, 2005.
25. ELWELL, M.W.; BARDANO, D.M. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 20-30, 2006.
26. EMBRAPA GADO DE LEITE. Produção, industrialização e comercialização (consumo). Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 01º de abril de 2012.
27. FAIRBAIN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, proprieties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v.53, p. 139-177, 1986.
28. FAJARDO-LIRA, C.E.; ORIA, M.; HAYES K. D.; NIELSEN. S. S. Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2190–2199, 2000.
29. FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; ROSIM, R.E.; LIMA, C.G.; OLIVEIRA, C.A.F. Relationship between the somatic cell count in raw milk and the casein fractions of UHT milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 45-49, 2008.
30. FRITSCH, J.; MORARU, C.I. Development and optimization of a carbon dioxide-aided cold microfiltration process for the physical removal of microorganism and somatic cells from skim milk. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3744-3760, 2008.
31. FROMM, H. I.; BOOR, K.J. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. **Journal of Food Science**, v.69, p. 207–214, 2004.
32. GÉSAN-GUIZIOU, G. Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. In: **Improving the safety and quality of milk**. Vol 1: milk production and processing. (Eds MW Griffiths). Boca Raton FL: Woodhead Publishing Ltda. 2010.
33. GOFF, H.D.; GRIFFITHS, M.W. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 1163-1176, 2006.
34. GRANT, I.R.; WILLIAMS, A.G.; ROWE, M.T.; MUIR, D.D. Investigation of the impact of simulated commercial centrifugation and microfiltration conditions on levels of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n. 3, p. 138-142, 2005.

35. GUERRA, A.; JONSSON, G.; RASMUSSEN, A.; WAAGNER NIELSEN, E.; EDELSTEN, D. Low cross-flow velocity microfiltration of skim milk for removal of bacterial spores. **International Dairy Journal**, v.7, p. 849–861, 1997
36. GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, A.M.; LE ROUX, Y.; LAURENT, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, v.5, p. 685- 697, 1995.
37. HACHANA, Y.; KRAIEM, K.; PAAPE, M.J. Effect of plasmin, milk somatic cells and psychrotrophic bacteria on casein fractions of ultra high temperature treated milk. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n.1, p. 79 – 86, 2010.
38. HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A.J.; DEETH, H.C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.58, p. 15-20, 2003.
39. HOFFMANN, W.; KLOBES, H.; KIESNER, C.H.R.; SUHREN, G.; KRUSCH, U.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; LARSEN, P.H. Use of microfiltration for the production of pasteurized milk with extended shelf life. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 311, p. 45-46, 1996.
40. HOFFMANN, W.; KIESNER, C.; KRUSCH, U.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; MARTIN, D.; EINHOF, K.; LORENZEN, P.C.; MEISEL, H.; HAMMER, P. SUHREN, G E TEUFEL P. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 229-235, 2006.
41. ISMAIL, B.; NIELSEN, S.S. Invited review: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 11, p. 4999-5009, 2010.
42. IZIDORO, T.B.; SPINA, T.L.B.; LIMA, M.T.; NOBILE, C.; TUASEK, S.O.; PEREIRA, J.G.; PINTO, J.P.A.N. Resfriamento marginal: multiplicação da microbiota psicrotrófica e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. In: IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBQL, 2010. 1 CD-ROM.
43. JIMENEZ-LOPEZ, A.J.E.; LECONTE, N.; DEHAINAULT, O.; GENESTE, C.; FROMONT, L.; GÉSAN-GUIZIOU, G. Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skim milk microfiltration (0.1µm). **Separation and Purification Technology**, v.61, p. 33–43, 2008.

44. KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 4125–4136, 1991.
45. KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. **Journal of Applied Sciences Research**, vol. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.
46. LE MARÉCHAL, C.; VAUTOR, R.T.E.; LE LOIR, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 247–282, 2011.
47. LISITA, M.O. **Influência da variação da temperatura de armazenamento de leite cru na vida de prateleira de leite UHT em embalagem flexível e estocagem sob luz**. 2010. 129p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
48. LORENZEN, P.H.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; EINHOF, K.; HAMMER, P.; HARTMANN, R.; HOFFMANN, W.; MARTIN, D.; MOKKENTIN, J.; WALTER, H.G.; DEVRESE, M. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.2, p. 166-178, 2011.
49. LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
50. MA, Y; RYAN, C; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M.; BOOR, K. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v.83, p. 264-274, 2000.
51. MADAENI, S.S.; YASEMI, M.; DELPISHEH, A. Milk sterilization using membranes. **Journal of food process engineering**, v. 34, n.4, p.1071-1085, 2011.
52. MARSHALL, A.D.; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. In: **IDF Special Issue 9504: Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes**. Brussels: International Dairy Federation, n. 9504, Cap I, p. 9-29, 1995.

53. MASKOOKI, A.; KOBAYASHI, T.; MORTAZAVI, S.A.; MASKOOKI, A. Effect of low frequencies and mixed wave of ultrasound and EDTA on flux recovery and cleaning of microfiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 59, p. 67–73, 2008.
54. MAUBOIS, J.L. Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n. 2, p. 92-96, 2002.
55. MIRZAIE, A.; MOHAMMADI, T. Effect of ultrasonic waves on flux enhancement in microfiltration of milk. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 77-86, 2012.
56. MORIN, P.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; POULIOT, Y. Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 267–273, 2004.
57. NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.
58. NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p. 41-46, 2010.
59. POPOVIC, S.; MILANOVIC, S.; IIICIC, M.; DJURIC, M.; TEKIC, M. Flux recovery of tubular ceramic membranes fouled with whey proteins. **Desalination**, v.249, p. 293-300, 2009.
60. POULIOT, Y. Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea: Review. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 735– 740, 2008.
61. PRADO, B.M.; ISMAIL, B.; RAMOS, O.; HAYES, K.D. Thermal stability of plasminogen activators and plasminogen activation in heated milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1028–1033, 2007.
62. RASOLOFO, E.A.; ST-GELAIS, D.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, n. 1–2, p. 108-118, 2010.

63. RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDINO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v.67, p. 625-630, 2000.
64. RODRÍGUES-GONZÁLEZ, O.; WALKLING RIBEIRO, M.; JAYARAM, S.; GRIFFITHS, M.W. Factors affecting the inactivation of the natural microbiota of milk processed by pulsed electric fields and crossflow microfiltration. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n.03, p. 270-278, 2011.
65. SABOYA, L. V.; MAUBOIS, J. L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, n. 80, p. 541-553, 2000.
66. SANVIDO, G.B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. Campinas, 2007. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
67. SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARDANO, D.M. Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk During Shelf-Life Storage. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 2491-2503, 2003.
68. SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C.M.S.; ISEPON, J.S.; OLIVEIRA, A.N. NICOLAU, E. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de micro-organismos psicrófilos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, 2009.
69. SANTOS, P. A.; SILVA, M.A.P.; MOREIRA, G.N.; BARROS, J.C.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU E.S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. **Boletim CEPPA**, v. 28, n. 2, p. 313-320, 2010.
70. SCHMIDT, V.S.J.; KAUFMANN, V.; KULOZIK, U.; SCHERER, S.; WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 1-9, 2012.
71. SCHREIER, K.; SCHAFROTH, K.; THOMET, A. application of cross-flow microfiltration to semi-hard cheese production from milk retentates. **Desalination**, v.250, p. 1091-1094, 2010.

72. SCHROEDER, D.L.; NIELSEN, S.S.; HAYES, K.D. The effect of raw milk storage temperature on plasmin activity and plasminogen activation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 114–119, 2008.
73. SKRZYPEK, M.; BURGER, M. Isoflux® ceramic membranes — Practical experiences in dairy industry. **Desalination**, v.250, p. 1095–1100, 2010.
74. SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in food Science e Technology**, v. 8, p. 35-40, 1997.
75. TE GIFFEL; VAN DER HORST, H.C. Comparison between bactofugation and microfiltration regarding efficiency of somatic cell and bacteria removal. **Bulletin of International Dairy Federation**, v. 389, p. 49-53, 2004.
76. TOMASULA, P. M.; MUKHOPADHYAY, S.; DATTA, N.; PORTO-FETT, A.; CALL, J. E.; LUCHANSKY, J.B.; RENYE, J.; TUNICK, M. Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4277-4291, 2011.
77. VIANA, P.C.B. **Adição de dióxido de carbono ao leite cru: Efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT**. 2010. 94p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
78. WIKING, L.; FROST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, p. 190-194, 2002.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO DA MEMBRANA ISOFLUX® NA MICROFILTRAÇÃO DE LEITE DESNATADO

A ser submetido ao Journal of Dairy Science

DESEMPENHO DA MEMBRANA ISOFLUX® NA MICROFILTRAÇÃO DE LEITE DESNATADO

Sumário Interpretativo

W.H. Viotto

A microfiltração (MF) de leite desnatado é uma operação de processamento bem estabelecida para remoção de micro-organismos e aumento da qualidade e vida de prateleira de leite fluido. É classicamente realizada utilizando membranas cerâmicas, com recirculação de parte do permeado pressurizado para manter a Pressão Transmembrana Uniforme (PTU) e fluxo de permeado constante. Os fabricantes de uma nova membrana, Isoflux®, tem alegado que esta consegue alcançar os mesmos resultados pela modificação da espessura da camada de separação. O objetivo deste trabalho foi determinar o desempenho da membrana Isoflux na microfiltração de leite desnatado e verificar a influência do fator de concentração (FC) na retenção dos componentes pela membrana.

Performance of Isoflux® Membrane on the Microfiltration of Skim Milk

Desempenho da Membrana Isoflux® na Microfiltração de Leite Desnatado

V. C. Antunes,* A. C. Urzedo,* L. A., Viotto,† W. H., Viotto*¹

*Departamento de Tecnologia de Alimentos, †Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas – SP, Brasil.

¹Corresponding author: walkiria@fea.unicamp.br

RESUMO

A microfiltração (MF) de leite desnatado é uma operação de processamento bem estabelecida para remoção de micro-organismos e aumento da qualidade e vida de prateleira de leite fluido. É classicamente realizada utilizando membranas cerâmicas sob o conceito de Pressão Transmembrana Uniforme (PTU). Os fabricantes de uma nova membrana, Isoflux®, com a espessura variável ao longo do comprimento da camada de separação, tem alegado que ela mantém um fluxo de permeado quase constante ao longo do comprimento da membrana. O objetivo deste trabalho foi determinar o desempenho da membrana Isoflux® na microfiltração de leite desnatado e verificar a influência do Fator de Concentração (FC) na retenção dos componentes pela membrana. Fluxo de permeado, redução de bactérias e células somáticas, e partição dos principais componentes do leite em permeado e retentado durante Microfiltração (MF) do leite foram determinados. Na fase inicial de uso da membrana, o fluxo de permeado foi de aproximadamente 230 Kg/hm², apresentando uma queda brusca de 60% ao atingir FC 3, permanecendo constante posteriormente. Com o uso continuado da membrana de microfiltração, o seu comportamento se alterou e a curva de permeação passou a apresentar um perfil semelhante aos observados em sistemas utilizando PTU, ou seja, um fluxo praticamente constante, independente do FC alcançado. A retenção de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos foi maior que 99%, enquanto a retenção de coliformes foi de 90%, e 100% para células somáticas. A membrana reteve, em média, 1,2% de caseína e 34,6% de gordura. Em geral, o fluxo da membrana estudada foi baixo, variando de 130 a 200 Kg/hm². Procedimento de limpeza, incluindo uso de EDTA, resultou em restauração parcial do fluxo de permeado, indicando que o cálcio tem um papel importante no estabelecimento da incrustação da membrana.

Palavras-chave: fluxo de permeado, remoção de bactérias, membranas cerâmicas

ABSTRACT

Microfiltration (MF) of skim milk is a well established processing operation for removal of microorganisms and increasing the quality and shelf life of liquid milk for consumption. It is classically carried out using ceramic membranes, under the concept of Uniform Transmembrane Pressure (UTP), achieved by high velocity permeate circulation concurrently with retentate inside the module. A new membrane, Isoflux®, with modified thickness of the separating layer, is claimed to maintain a nearly constant permeate flux along the length of the membrane. The objective of this study was to determine the performance of membrane Isoflux® on the microfiltration of skim milk and to verify the influence of concentration factor on the components retention by the membrane. Permeate flux, reduction of bacteria and somatic cells, and partition of the main components of milk permeate and retentate during Microfiltration (MF) milk were determined. In the early use of the membrane, the permeate flux was approximately 230 Kg/hm², with a sharp decline of 60% at concentration factor (CF) 3 and remained constant thereafter. With continued use of microfiltration membrane, its behavior is changed and the permeation curve started to present a profile similar to those observed in using UTP systems, namely a virtually constant flux, independent of the CF achieved. The retention of mesophilic and psychrotrophic microorganisms was greater than 99%, 90% for coliforms, and 100% of somatic cells. The membrane retained, on average, 11.2% of casein and 34.6% fat. In general, the flux of the Isoflux® membrane was low, ranging 130-200 Kg/hm². Cleaning procedure, including the use of EDTA, resulted in partial restoration of the permeate flux, indicating that calcium plays a role in establishing the fouling of the membrane.

Key-words: permeate flux, bacterial removal, ceramic membrane

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de microfiltração (MF) vem sendo utilizada na indústria de laticínios para o fracionamento de proteínas e, principalmente na remoção de micro-organismos, células somáticas e gordura residual (Cheryan, 1998; Maubois, 2002; Karasu et al., 2010). No entanto, a diferença de pressão transmembrana ao longo da membrana resulta em um desempenho não uniforme nos modelos clássicos de microfiltração. Na tentativa de resolver esse problema foi desenvolvido o conceito PTU (Pressão Transmembrana Uniforme), para garantir um fluxo de permeado constante ao longo do comprimento da membrana, diminuindo a perda de carga e, conseqüentemente, a incrustação (Pouliot, 2008).

O conceito de PTU, recirculação de parte do permeado pressurizado para manter constante a diferença de pressão entre retentado e permeado em toda a extensão da membrana, foi introduzido com o processo denominado Bactocatch (Maubois, 2002). Recentes desenvolvimentos na tecnologia de membranas vêm permitindo alternativas ao uso do sistema PTU, com menor consumo de energia e custo de investimento. O primeiro sistema, conhecido como MembraloX GP®, é baseado na variação contínua da porosidade do suporte da membrana. O segundo, chamado de Isoflux®, é baseado na variação contínua de espessura da camada da membrana, ou seja, a espessura da camada seletiva diminui ao longo do comprimento da membrana para conferir uma vazão de permeado uniforme em toda a sua extensão (Maubois, 2002; Skrzypek e Burger, 2010).

Vários estudos (Maubois, 2002; Te Giffel e Van Der Horst, 2004; Beolchini 2005; Elwell e Barbano, 2006) tem mostrado que a MF, utilizando membranas cerâmicas com poros de 1,4 µm, é muito efetiva na remoção de bactérias, esporos e células somáticas do leite. Por outro lado, membranas com essa porosidade podem permitir a passagem de proteínas para o permeado (Pafyllis et al., 1996; Pouliot, 2008).

Durante a microfiltração do leite, uma redução bacteriana de 2 até 4 ciclos logarítmicos (log) pode ser alcançada com uma membrana cerâmica 1,4 µm. A retenção das bactérias depende, principalmente, do processo de formação da camada polarizada na superfície da membrana que atua como a membrana efetiva (Blanpain-Avet et al., 2004).

A matéria acumulada na superfície da membrana se torna um depósito irreversível, que resulta em declínio do fluxo e mudança na seletividade da membrana (Blanpain-Avet et al., 2004). Micelas de caseína são consideradas as principais responsáveis pela formação do depósito na superfície da membrana e os íons cálcio também desempenham um papel na incrustação irreversível, provavelmente pelo estabelecimento de ligações entre a membrana e as micelas e entre as próprias micelas (Jimenez-Lopez, 2008). Dados sobre o desempenho da

membrana Isoflux® na microfiltração de leite são raros na literatura (Skrzypek e Burger, 2010). O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho da membrana Isoflux® através da determinação do fluxo de permeado e da retenção de células somáticas, micro-organismos, gordura e caseína.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Processamento de Leite Desnatado Microfiltrado Pasteurizado em Escala Piloto

O leite utilizado foi adquirido de um laticínios local, Atilatte, Fazenda Atibainha, Itatiba/SP. O leite cru resfriado foi transportado em latões, devidamente higienizados, para a planta de processamento de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Após aquecimento a 45 °C em tanque encamisado, provido de tampa e agitador, o leite foi desnatado em uma centrífuga de pratos, com capacidade de 400 L por hora, marca Westfalia Separator, modelo MTC 3-03-107 (Oelde, Germany).

Após o desnate, o leite foi microfiltrado a 45 °C, em membrana cerâmica Isoflux®, com diâmetro de poro de 1,4 µm. A unidade de MF era constituída de um módulo com 23 canais de 3,5 mm de diâmetro, diâmetro total de 25 mm, comprimento de 1178 mm e área de permeação de 0,24 m². Os parâmetros utilizados no processo de microfiltração foram: vazão de alimentação 4,5 m³/h, correspondente à velocidade de 4,1 m/s e pressão transmembrana de 1,3 bar. O leite foi concentrado até atingir o Fator de Concentração (FC) igual a 4,0. Este foi calculado pela relação entre a massa de leite inicial e massa final de retentado.

A Figura 1 apresenta o fluxograma do processamento de leite desnatado microfiltrado.

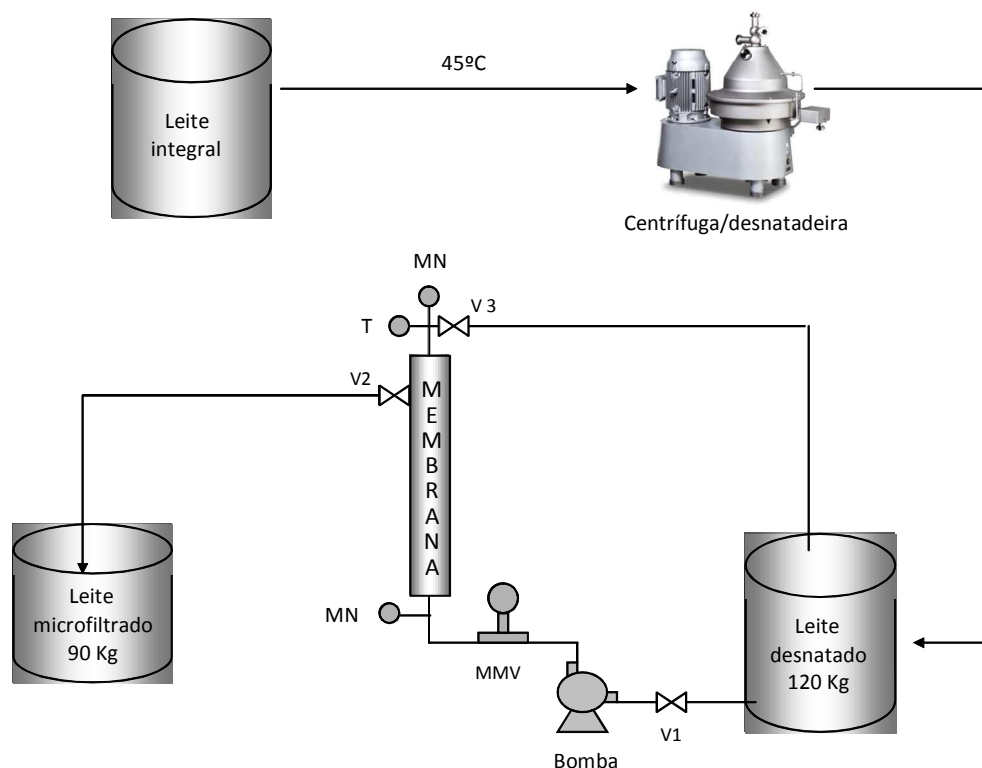


Figura 1. Fluxograma do processamento de leite desnatado microfiltrado. Válvulas borboletas: V1 e V2; Válvula agulha: V3; Medidor Magnético de Vazão: MMV; Termômetro: T; Manômetros: MN.

2.2. Desempenho da Membrana de Microfiltração

Fluxo de Permeado. O fluxo de permeado foi determinado pela medida da massa de permeado coletado em função do tempo decorrido pela área de membrana. Curvas de permeação foram geradas em função do tempo e do fator de concentração. Nove replicatas de processamento foram realizadas para se verificar o desempenho da membrana com relação ao fluxo de permeado.

A retenção dos componentes (micro-organismos, caseína e gordura) pela membrana foi calculada pela fórmula:

$$\text{Retenção (\%)} = 1 - \frac{\% \text{ componente no permeado}}{\% \text{ componente na alimentação}} \times 100$$

A redução de micro-organismos após a etapa de microfiltração foi calculada em relação à contagem inicial do leite desnatado. A avaliação da retenção dos componentes em diferentes FCs (1,5; 2,0; 3,0 e 4,0) foi determinada em triplicata.

Limpeza da Membrana

Imediatamente após o processo de microfiltração, o leite remanescente no sistema foi drenado para, na sequência, ser realizado um enxágue com água deionizada. Os primeiros procedimentos de limpeza obedeceram ao recomendado pelo fabricante, que consistia na circulação de soda cáustica a 1,0 % (v/v) a 80 °C por 30 min, seguido de enxágue e posterior circulação de 5 ml de ácido nítrico/litro de água a 50 °C por 15 min.

O procedimento de limpeza modificado, e adotado, consistiu na limpeza com NaOH (soda) 1% acrescido de EDTA 1%, com recirculação a 40 °C por 30 min. Em seguida, a membrana foi imersa em uma nova solução, com a mesma composição, até o processo seguinte. As condições de operação (vazão de alimentação e pressão transmembrana) foram as mesmas utilizadas para a microfiltração do leite. O fluxo com água deionizada, após o processo de limpeza, foi medido a 45 °C, pressão transmembrana de 1,3 bar e vazão de alimentação de 4,5 m³/h, sendo este o parâmetro utilizado para verificar a eficiência da limpeza.

2.3.Caracterização do Leite

No leite cru desnatado e no leite microfiltrado foram determinados o teor de gordura, de proteína total, caseína e Contagem de Células Somáticas (CCS). Também foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios, psicrótróficos aeróbios e coliformes totais.

O método utilizado para determinação de gordura foi a extração etérea por Monjonier AOAC 989.05 (AOAC,1995). A proteína total foi determinada através do nitrogênio total (NT) pelo método de micro-Kjeldahl AOAC 991.20 (AOAC, 1995); o nitrogênio não protéico (NNP), pela metodologia descrita por Aschaffenburg e Drewry (1959), através da determinação do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação em TCA a 12%, seguida do método de micro-Kjeldahl (AOAC 991.20). O nitrogênio não caseico (NNC) pela metodologia desenvolvida por Rowland (1938) através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação da caseína no pH 4,6, seguida de micro-Kjeldahl, método AOAC 991.20 (AOAC, 1995). Os valores de NT e NNP foram multiplicados pelo fator de correção de 6,38,

para a obtenção dos teores equivalentes de proteína. A caseína foi calculada por diferença entre NT e NNC, seguida da multiplicação por 6,38.

O teor de cálcio nas amostras das soluções de limpeza foi determinado por espectrometria de absorção atômica, segundo metodologia da *American Public Health Association* (APHA, 1976).

Para realização da contagem de células somáticas as amostras foram encaminhadas à Clínica do Leite (ESALQ-USP, Piracicaba – SP) e a contagem foi determinada pelo método de citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments Inc., Chaska - EUA).

As análises microbiológicas foram realizadas seguindo as recomendações da *American Public Health Association* – APHA (DOWES e ITO, 2001). A contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando-se Ágar Padrão para Contagem – PCA e incubação por 48h à 35°C. Para a contagem total de psicrotróficos aeróbios foi realizado plaqueamento em superfície no meio PCA e incubação por 10 dias à 7°C. A determinação de coliformes totais foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP).

2.4. Análise Estatística dos resultados

O fator estudado foi o fator de concentração (FC), com quatro níveis de variação: 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0. O efeito do fator de concentração na retenção de micro-organismos, células somáticas, proteína e gordura foi analisado através do teste de Friedman, utilizando o programa Assistat, versão 7.6 (UFCG/PB, Brasil). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho da Membrana

Fluxo de Permeado. No início da utilização da membrana (processos 1, 2 e 3), o fluxo de permeado foi de aproximadamente 230 Kg/h/m², permanecendo praticamente constante até atingir o fator de concentração (FC) 3 (40 min), quando então diminuiu bruscamente em relação ao fluxo inicial (~ 70 %). Após a queda, o fluxo permaneceu praticamente constante com o aumento do tempo e do FC (Figuras 2 e 3).

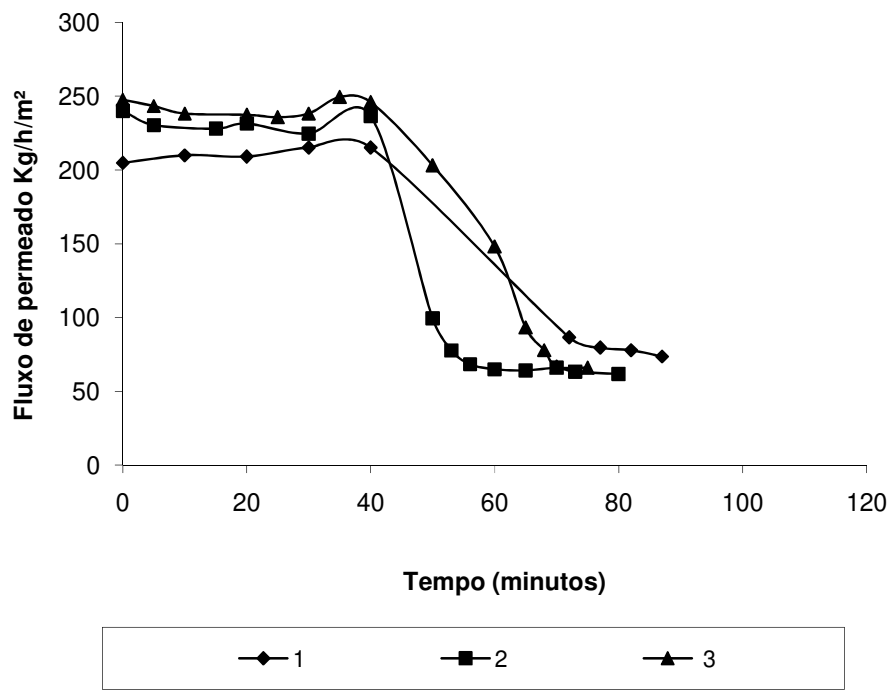


Figura 2. Fluxo de permeado em função do tempo (processos 1 ao 3)

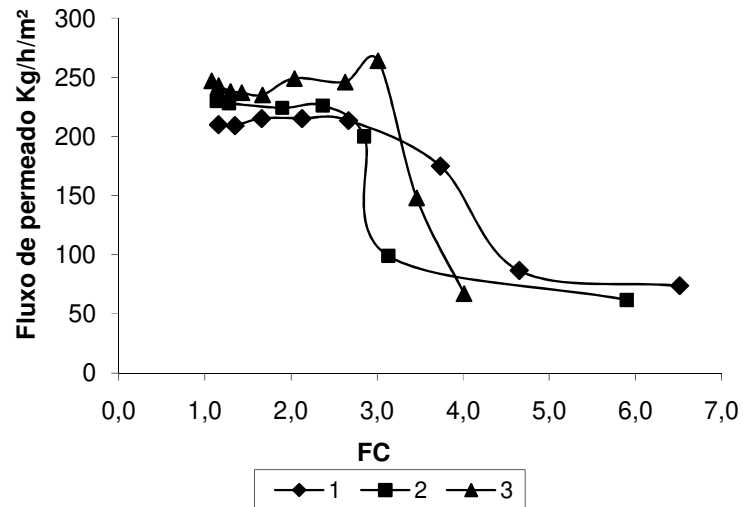


Figura 3. Fluxo de permeado em função do FC (processos 1 ao 3)

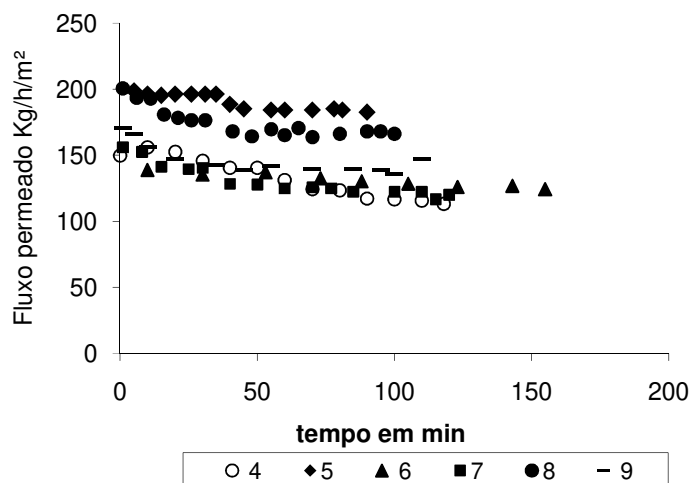


Figura 4. Fluxo de permeado em função do tempo (processos 4 ao 9)

A queda brusca de fluxo, observada no FC 3 nos primeiros processos (Figuras 2 e 3), não é característica de comportamento típico do processo de microfiltração; o comportamento esperado nesses processos é uma diminuição gradual do fluxo com o tempo (Pafyllis et al., 1996, Karasu et al., 2010, Kühnl et al., 2010).

O uso seguido da membrana após os três primeiros processos provocou mudanças significativas no perfil da curva de permeação. Como pode ser visto pela Figura 4, houve uma tendência do fluxo de permeado permanecer praticamente constante, ou com ligeira queda ao longo do processo. Os valores de fluxo agora variaram entre 130 a 200 Kg/hm², e a queda brusca no FC 3 não foi mais observada. Ou seja, houve diminuição do fluxo de permeado, na medida em que a membrana passou a ser mais empregada, indicando a formação de uma incrustação irreversível da membrana que não foi removida pelo procedimento usual de limpeza CIP utilizado para restaurar o fluxo.

Outra causa possível da queda de fluxo de permeado encontrada em nossos experimentos, poderia ser o uso de condições não ideais de pressão, temperatura e vazão, o que deve ser descartado, uma vez que foram utilizadas as condições recomendadas pelo fabricante. Em geral, o fluxo de permeado da membrana estudada (Isoflux®) foi mais baixo que os encontrados para sistemas de microfiltração que, através da recirculação do permeado, garantem uma pressão transmembrana uniforme ao longo do comprimento da membrana (MAUBOIS, 2002). A proposta da Isoflux® consiste na diminuição gradativa da espessura da camada seletiva da membrana para diminuir a perda de carga e, com isso, manter um fluxo de

permeado uniforme em toda a sua extensão. Como pode ser observado na Figura 4, o fluxo de permeado se manteve praticamente constante ao longo do tempo, mas foi baixo desde o início do processo, quando comparado a outras membranas similares. O fluxo relatado para a Isoflux®, segundo o fabricante, em condições industriais, varia de 600 a 700 Kg/h/m². Estudos realizados com a membrana Membralox GP®, também com poro de 1,4 µm, mostraram que o fluxo de permeado variou de 400 a 450 L/h/m² (TROUVÉ et al., 1991; BEOLCHINI et al., 2005). Apesar dos valores de fluxo de permeado, usando água como fluido de referência, ter retornado aos valores iniciais (500 Kg/hm² na condição padrão), o fluxo de permeado com leite desnatado diminuiu a cada processo, sugerindo problemas de limpeza e dificuldades para remover a incrustação da membrana. Ou seja, o fluxo de permeado, com água não foi um bom indicador para prever o fluxo de permeado, quando o leite foi microfiltrado.

As prováveis causas do aumento da incrustação irreversível da membrana com o uso poderiam ser o cálcio e as micelas de caseína. O cálcio pode facilitar interações das micelas de caseína com o material da membrana e entre as micelas de caseína, estabelecendo ligações e formando um depósito protéico irreversível na superfície da membrana (Jimenez-Lopez, et al. 2008).

Experimentos realizados (dados não mostrados) mostraram que o uso de ácido nítrico no processo de limpeza, como recomendado pelo fabricante, contribuiu para a diminuição do fluxo, provavelmente relacionado à mudança de carga das caseínas, o que pode influenciar a sua interação com a superfície da membrana. O fluxo de permeado que era de 250 Kg/h/m², nos primeiros processos, caiu para 150 Kg/hm², evidenciando problemas no procedimento de limpeza.

O uso de ácido foi abolido da limpeza e, além disso, adotou-se a imersão da membrana em solução de NaOH 1 % a 50 °C, por uma semana. Outra mudança efetuada foi a adoção de 40 °C como temperatura de limpeza, ao invés dos 80 °C, recomendados pelo fabricante, pois altas temperaturas poderiam agravar o problema de precipitação de cálcio dificultando ainda mais o processo de limpeza. Como o problema da diminuição do fluxo persistia, testou-se novo protocolo de limpeza, incorporando-se 1 % de EDTA à solução NaOH 1 %, com recirculação por 30 min a 40 °C, uma vez que o EDTA tem a capacidade de sequestrar íons de cálcio. Após a limpeza, a membrana foi imersa em nova solução de soda 1 % mais EDTA 1 %.

A Tabela 1 mostra o efeito da remoção de cálcio pelo EDTA, usando-se o novo protocolo de limpeza e imersão da membrana em solução NaOH 1 % e EDTA 1 %.

Tabela 1. Teores de cálcio da solução NaOH 1% mais EDTA 1% (*) após limpeza e imersão da membrana de microfiltração

Teores de Cálcio (mg/L)	
Permeado	1,51
Retentado	1,27
Solução de imersão	0,26

(*) Teor original de cálcio da solução NaOH 1 % + EDTA 1 %: < 0,09 mg/L

O permeado, retentado e solução de imersão apresentaram, respectivamente, concentrações de cálcio 17, 14 e 3 vezes maior que a concentração inicial da solução de limpeza (< 0,09 mg Ca/L). Os resultados evidenciam a eficácia da remoção de cálcio da membrana pelo EDTA durante o processo de limpeza CIP e no período de imersão da membrana pós-limpeza. Isso resultou em melhora do fluxo, que aumentou para cerca de 200 Kg/hm², mostrando que o cálcio desempenha um papel no estabelecimento da incrustação da membrana. Resultados apresentados por Seng et al. (2006) mostraram que o EDTA auxiliou na remoção de íons cálcio que ajudaram a formar o depósito orgânico que se acumulou na superfície de membrana de osmose reversa de poliamida provocando a diminuição do fluxo de permeado.

Retenção de Micro-organismos e Células Somáticas.

A Tabela 2 apresenta os resultados do efeito da MF na redução do número de micro-organismos e de células somáticas do leite desnatado e a retenção (%) da membrana para estes componentes. Em geral, a membrana reteve mais de 99 % de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, 90 % de coliformes totais e 100 % de células somáticas. A microfiltração resultou numa redução de mais de 4 ciclos log de micro-organismos mesófilos, redução equivalente ao alcançado no processo de pasteurização.

Houve redução de 2,5 ciclos log de psicrotróficos presentes, resultando em contagens abaixo do limite de detecção do método empregado. Isso é importante pelo papel desempenhado pelos psicrotróficos na vida de prateleira de leite fluído. Enzimas termorresistentes produzidas por micro-organismos psicrotróficos causam alterações de sabor e aumento de viscosidade, que são as principais causas do fim da vida de prateleira de leite fluído. A remoção de psicrotróficos pela microfiltração do leite evita a produção e acúmulo das enzimas e as consequentes alterações físicas e sensoriais do produto (Nörnberg et al. 2009).

Tabela 2. Contagem de micro-organismos e células somáticas do leite desnatado antes e após microfiltração (MF) e retenção de micro-organismos e células somáticas (%) pela membrana, (n=3)*

	Antes MF	Após MF	Retenção, %
Mesófilos	3,1 ($\pm$ 1,2) $\times 10^4$ UFC/mL	1,7 ($\pm$ 1,0) $\times 10^0$ UFC/mL	99,98 $\pm$ 0,01
Psicrotróficos	3,30 ($\pm$ 1,25) $\times 10^2$ UFC/mL	< 1 UFC/mL	99,65 $\pm$ 0,14
Coliformes totais	11 ($\pm$ 0) NMP/mL	1,0 ($\pm$ 1,0) NMP/mL	90,75 $\pm$ 9,4
Células somáticas	19,6 ($\pm$ 20,4) $\times 10^3$ cél /mL	1($\pm$ 0,0) $\times 10^3$ cél /ml	100,0 $\pm$ 0,0**

*n = nº de replicatas de processamento.

**A retenção foi considerada 100%, em virtude do limite de detecção do equipamento utilizado (1000 células/mL) e tamanho das células somáticas (6-15 μ m).

Uma porcentagem de 90,75 % dos coliformes totais foram removidos do leite, valor comparativamente menor do que os encontrados para a retenção de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos pela membrana de MF (Tabela 2). Isso pode ser devido ao fato dos coliformes apresentarem morfologia diferente (forma e grau de agregação) dos demais micro-organismos estudados, o que pode interferir na retenção desses micro-organismos pela membrana. Trouvé et al. (1991) mostrou que o volume celular do micro-organismo pode influenciar a maior ou menor retenção do mesmo pela membrana. Outros autores encontraram valores de redução de micro-organismos similares aos deste estudo, na faixa de 2 a 5 ciclos log, utilizando a mesma membrana de microfiltração (Skrzypek e Burger, 2010) ou similares (Beolchini et al., 2005, Elwell e Barbano, 2006).

A membrana foi eficiente na redução de células somáticas (praticamente 100 %) em todos os processos. A legislação brasileira (BRASIL, 2011) estabelece como padrão de qualidade para o leite cru refrigerado tipo A o limite máximo de 6×10^5 células/mL. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que, após a microfiltração, o leite cru estava praticamente isento de células somáticas. Altas contagens de células somáticas são correlacionadas com aumento de protease (plasmina) e lipase, estáveis ao calor, em leite. Se o leite cru apresenta baixa contagem microbiana e ausência de crescimento microbiano em leite pasteurizado, essas enzimas serão o fator limitante da vida de prateleira do leite pasteurizado devido à produção de defeitos de sabor (Barbano et al., 2006). Portanto, a remoção total de células somáticas do leite cru pela microfiltração assegura uma maior qualidade e aumento de vida de prateleira do leite pasteurizado.

Em outros países, a microfiltração tem sido usada, individualmente ou em conjunto com tratamento térmico, na produção de leite de vida estendida, pelas vantagens do sabor de leite fresco e maior vida de prateleira, de 15 a 30 dias (Elwell e Barbano, 2006; Hoffmann et al., 2006; Rysstad e Kolstad, 2006). Nossos resultados mostram a presença de coliformes no leite microfiltrado, indicando que a microfiltração sozinha é insuficiente para garantir a segurança do produto, sendo necessária a realização de uma pasteurização do leite, após a microfiltração.

A Tabela 3 mostra que a retenção de micro-organismos mesófilos e de células somáticas não variou com o aumento do fator de concentração ($p > 0,05$). A redução na contagem dos micro-organismos mesófilos e de células somáticas do leite desnatado ocorreu logo no início da microfiltração (FC 1,5), com praticamente a totalidade dos micro-organismos sendo removida do leite (10^0 UFC/mL) e a totalidade das células somáticas.

Tabela 3. Contagem e retenção (%) de mesófilos e células somáticas durante a microfiltração (MF) do leite desnatado a diferentes fatores de concentração (n=3)*

		Durante MF			
		FC 1,5	FC 2,0	FC 3,0	FC 4,0
Mesófilos					
Contagem (UFC/mL)	3,1(±1,2)×10 ⁴	2,5(±2,6)×10 ⁰	4,3(±3,5)×10 ⁰	2,0(±0,9)×10 ⁰	1,7(±1,0)×10 ⁰
Retenção (%)		(99,99 ^a)	(99,98 ^a)	(99,98 ^a)	(99,98 ^a)
Células Somáticas					
Contagem (UFC/mL)	19,6(±20,4)×10 ³	1(±0)	1(±0)	1(±0)	1(±0)
Retenção (%)**		(100 ^a)	(100 ^a)	(100 ^a)	(100 ^a)

*n = n° de replicatas de processamento.

** A retenção foi considerada 100%, em virtude do limite de detecção do equipamento utilizado ser 1000 células/mL e devido ao tamanho das células somáticas (6-15 μ m).

A - médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Retenção de Caseína e Gordura. A Tabela 4 mostra que não houve diferença significativa da retenção de caseína com o fator de concentração ($p > 0,05$). Ao final do FC = 4, a retenção foi de 11,23 %, que pode ser considerada alta em relação a outras membranas de

microfiltração com o mesmo diâmetro de poro e que utilizaram a mesma pressão transmembrana (Pafyllas et al., 1996, Pouliot, 2008). Em geral, a Isoflux® também apresentou fluxos de permeado inferiores (120-150 Kg/h/m²), quando comparada com membranas de mesmo diâmetro (400-450 Kg/h/m²). Essa diferença pode ter acontecido devido aos problemas na limpeza e formação de depósito de proteína na superfície da membrana, que ocasionou diminuição no fluxo e mudanças na seletividade da membrana.

Tabela 4. Teor (%) e retenção (%) de caseína e gordura do leite desnatado (LD) durante a microfiltração do leite desnatado a diferentes fatores de concentração, (n=3)*

	Antes MF	Durante MF			
		FC 1,5	FC 2,0	FC 3,0	FC 4,0
Caseína					
Teor (%)	2,47 (± 0,190	2,19 (± 0,14)	2,06 (± 0,27)	2,14 (± 0,19)	2,20 (± 0,19)
Retenção (%)		11,27 (± 0,88 ^a)	17,48(± 4,76 ^a)	13,67 (±1,46 ^a)	11,23 (± 1,62 ^a)
Gordura					
Teor (%)	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Retenção (%)		15,53 (± 8,37 ^a)	22,73 (± 3,92 ^a)	28,80 (± 6,58 ^a)	34,60 (± 10,25 ^a)

*n = nº de replicatas de processamento.

a - médias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Em geral, a retenção de gordura foi baixa (cerca de 30%) e não foi significativamente afetada pelo fator de concentração (p =0,07). A membrana Isoflux® utilizada tem porosidade diâmetro de poro de 1,4 µm e, portanto, não deveria reter glóbulos de gordura menores que 1,4 µm. Após desnate, a maioria dos glóbulos de gordura remanescentes no leite desnatado apresentam diâmetro médio de 1,2 µm (Walstra et al., 2006), o que explica a baixa retenção de gordura encontrada.

4. CONCLUSÃO

O fluxo de permeado da membrana cerâmica de microfiltração de 1,4 µm estudada (Isoflux®) se mostrou inferior aos obtidos por membranas de mesmo diâmetro de poro, que utilizam o sistema de Pressão Transmembrana Uniforme (PTU). No início do uso da

membrana, o fluxo de permeado apresentou queda brusca a FC=3, provavelmente devido a fouling irreversível da membrana. Com o uso subsequente da membrana, o fluxo de permeado se estabilizou a cerca de 150 Kg/h/m², se mantendo praticamente constante ao longo do tempo e com o aumento do fator de concentração. A retenção de micro-organismos e células somáticas foi similar às outras membranas de microfiltração existentes, mas a retenção de proteína foi maior que o esperado para membranas com diâmetro de poro 1,4 µm (~11 %). Não houve aumento da retenção de micro-organismos, células somáticas, proteína e gordura com o aumento do FC. O baixo fluxo observado e a retenção mais elevada de proteína podem ser atribuídos à incrustação da membrana, envolvendo a participação do cálcio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aschaffenburg, R.; Drewry, J. 1959. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. Int. Dairy Congress, **Int. Dairy Fed.** 3:1631-1637.
2. AOAC. 1995. **Official methods of analysis**. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
3. Barbano, D.M., Ma. Y., Santos, M.V. 2006. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. **J. Dairy Sci.** 89 (Supp 1) E15–E19
4. Beolchini, F., Cimini, S., Mosca, L., Veglio, F., Barba D. 2005. Microfiltration of bovine and ovine milk for the reduction of microbial content: Effect of some operating conditions on permeate flux and microbial reduction. **Separation Sci. Technol.**40:757–772.
5. Blanpain-Avet, P., Migdal, J. F., Bé Nézech, T. 2004. The effect of multiple fouling and cleaning cycles on a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate. Membrane performance and cleaning efficiency. **Food and Bioproducts Processing**. 82(C3) 231–243.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 251: 6-11. dez. 2011. Seção I.
7. Cheryan, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. 1^a Edição, New York, Lancaster:Technomic Publishing,USA, 1998, 597 p.
8. DOWES P., ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C., Ed. American Public Health Association, 2001. 676p

9. Elwell, M.W., Bardano, D.M. 2006. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. **J. Dairy Sci.** 89: 20-30.
10. Hoffmann, W., Kiesner C., Krusch, U., Clawin-Rädecker, I., Martin, D., Einhoff, K., Lorenzen, P.C., Meisel H., Hammer P., Suhren, G E, Teufel P. 2006. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. **Int. J. Dairy Technol.**59:229-235.
11. Karasu, K., Glennon, N., Lawrence, N., Stevens, G., O'Connor ,A., Barber, A.R., Yoshikawa, S., Kentish, S.E. 2010. A comparison between ceramic and polymeric membrane systems for casein concentrate manufacture. **Int. J. Dairy Technol.** 63:284-289.
12. Kühnl W., Piry A., Kaufmann, V., Grein, T., Ripperger, S., Kulozik, U. 2010. Impact of colloidal interactions on the flux in cross-flow microfiltration of milk at different pH values: A surface energy approach. **J. Membrane Sci.** 352:107–115.
13. Jimenez-Lopez, A.J.E., Leconte, N., Dehainault, O., Geneste, C., Fromont, L., Gésan-Guiziou, G. 2008. Role of milk constituents on critical conditions and deposit structure in skim milk microfiltration (0.1µm). **Separation and Purification Technol.**61:33–43.
14. Maubois, J.L. Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. **Aust J. of Dairy Technol.**v.57, p. 92-96, 2002.
15. Nörnberg, M. F. B. L.; Tondo, E. C.; Brandelli, A. 2009. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Vet.** 37:157-163.
16. Pafylas, I., Cheryan, M., Mehaia, M.A., Saglam, N. 1996. Microfiltration of milk with ceramic membranes. **Food Res Int.** 29:141–146.
17. Pouliot, Y. 2008. Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. **Int. Dairy J.** 18:735– 740.
18. Rand, M.C., Greensberg A.E., Taras, M.J., (Eds.) 1976. **Standard methods for examination of water and wastewater.** American Public Health Association. 14:1193.
19. Rowland, S.J. 1938. The determination of nitrogen distribution in milk. **J. Dairy Res.**9:42-46.
20. Rysstad, G., Kolstad, J. 2006. Extended shelf milk – advances in technology. **Int. J. Dairy Technol.** 59:85-96.
21. Seng A. W., S. Lee, M. E. 2006. Chemical and physical aspects of cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. **J. Membrane Sci.** 272:198–210.
22. Skrzypek, M., Burger, M. 2010. Isoflux® ceramic membranes — Practical experiences in dairy industry. **Desalination.** 250:1095–1100.

23. Te Giffel, Van Der Horst, H.C. 2004. Comparison between bactofugation and microfiltration regarding efficiency of somatic cell and bacteria removal. **Bulletin Int. Dairy Federation.** 389:49-53, 2004.
24. Trouvé, E., Maubois, J.L., Piot, M., Madec, M.N., Fauquant, J., Rouault, A., Tabard, J., And Brinkman, G. 1991. Rétention de différentes espèces microbiennes lors de l'épuration du lait par microfiltration en flux tangentiel. **Lait.** 71:1-13.
25. Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. 2006. Colloidal particles of milk. In: **Dairy science and technology.** 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. 109-158.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DO LEITE CRU E DA MICROFILTRAÇÃO NA QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE PASTEURIZADO

A ser submetido à Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos

INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DO LEITE CRU E DA MICROFILTRAÇÃO NA QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA DO LEITE PASTEURIZADO

Veridiana Carvalho Antunes*, Luiz Antônio Viotto†, Walkiria Hanada Viotto*¹

*Departamento de Tecnologia de Alimentos, †Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas – SP, Brasil.

Autor para correspondência: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862 Campinas – SP, Brasil. Tel (19) 3521 4016, Fax (19) 3521 3617, E-mail: walkiria@fea.unicamp.br

RESUMO

O efeito do armazenamento refrigerado do leite cru e o impacto da microfiltração na microbiota, qualidade e vida de prateleira do leite pasteurizado foi avaliado pela contagem de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes, pelas alterações físico-químicas (pH, acidez titulável, viscosidade), atividade proteolítica, ocorrência de sabor amargo e aceitação sensorial durante o tempo de armazenamento. Houve um aumento de 2,15 ciclos log no número de micro-organismos mesófilos e de 2,55 ciclos log para os psicrotróficos, após o armazenamento do leite cru a 7 °C/6 dias. Durante esse tempo, não houve alteração na composição do leite e a sua viscosidade permaneceu constante. A microfiltração reduziu em 3 ciclos log a contagem inicial de micro-organismos mesófilos e em até 4 ciclos log o número de micro-organismos psicrotróficos. Não foi observada atividade proteolítica significativa, alterações na viscosidade ou mudanças sensoriais relevantes que prejudicassem a vida de prateleira do produto, sendo a contagem de micro-organismos mesófilos o parâmetro determinante do fim da vida de prateleira do leite pasteurizado. O produto apresentou boa aceitação sensorial com média de 6,31 para o atributo sabor, sendo que mais de 50 % dos provadores certamente ou provavelmente comprariam o produto, durante toda sua vida de prateleira, independente de ser obtido de leite controle ou com armazenamento refrigerado prévio (7 °C/6 d). O gosto amargo aumentou com o tempo de armazenamento, mas não atingiu níveis que resultassem em rejeição do produto. Aos 15 dias de armazenamento

refrigerado, o leite de vida estendida atingiu uma contagem de micro-organismos mesófilos de 3×10^4 UFC/mL, o que determinou o fim da sua vida de prateleira.

Palavras-chave: leite cru refrigerado; remoção de bactérias, análise sensorial

ABSTRACT

The effect of refrigerated storage of raw milk and the impact of the microfiltration on the microbiological quality and shelf life of pasteurized milk was assessed by bacterial counts (mesophilic, psychrotrophic and coliforms), physico-chemical changes (pH, titratable acidity, viscosity), proteolytic activity, the development of bitter taste and sensory acceptance during the storage time. There was an increase of 2.15 log in the number of mesophilic bacteria and of 2.55 log for psychrotrophic microorganisms after the storage of raw milk to 7 ° C / 6 days. No changes in raw milk composition and viscosity occurred during the refrigerated storage. The microfiltration reduced by 3 log the initial count of mesophilic and up to 4 log the number of psychrotrophic microorganisms. There was no significant proteolytic activity, nor changes in viscosity or relevant sensory changes that might interfere with the sensory acceptance of microfiltered pasteurized milk during the 15 days of storage. The product had good acceptability with an average of 6.31 for the attribute flavor, with more than 50% of the panelists certainly or probably buy the product throughout its shelf life, whether it be milk obtained from control or refrigerated raw milk (7 ° C/6 d). The bitter taste increased with storage time, but did not reach levels that would result in rejection of the product. At 15 days of refrigerated storage, microfiltered pasteurized milk reached a mesophiles count of 10^4 CFU/mL, which determined the end of its shelf life.

Keywords: refrigerated raw milk;; bacterial removal, sensory analysis

1. INTRODUÇÃO

Os Regulamentos Técnicos da Instrução Normativa (IN) 51 (BRASIL, 2002) e 62 (BRASIL, 2011) que tornam obrigatória a refrigeração do leite cru na propriedade, e sua coleta e transporte refrigerado por até 48 horas após a ordenha, representam um grande avanço para a melhoria da sua qualidade. É recomendável que a refrigeração do leite seja realizada a temperaturas menores que 5 °C (HOFFMANN et al., 2006, IZIDORO et al., 2010). Entretanto, a legislação brasileira permite que o leite seja refrigerado na fazenda a 7 °C e entregue no laticínio a 10 °C. Além disso, também permite que o leite cru, refrigerado em tanques de expansão comunitários, atinja temperaturas de até 10 °C, nem sempre mantida durante o tempo de armazenamento. Também é comum que o leite cru, após o período de refrigeração na fazenda, seja transportado para o entreposto ou direto para a usina beneficiadora, onde ainda fica estocado por horas ou dias nos silos, antes de ser processado. Além disso, o leite cru pode ser comercializado entre diferentes indústrias de beneficiamento, aumentando o tempo de armazenamento antes do processamento.

O uso de temperaturas inadequadas e tempos prolongados de armazenamento refrigerado do leite cru, na fazenda e na usina beneficiadora, favorecem o crescimento de micro-organismos psicrotróficos. Os micro-organismos psicrotróficos são eliminados pela pasteurização, mas suas enzimas são resistentes até ao tratamento UHT, gerando defeitos de sabor e textura, que são determinantes para o fim da vida de prateleira do leite fluido. Defeitos de sabor e textura causados pela ação dessas enzimas são perceptíveis quando a população de psicrotróficos atinge contagens iguais ou maiores que 10^6 UFC/ml (COUSIN, 1982, NÖRBERNG et al., 2009).

Outro grande problema de qualidade do leite cru brasileiro é a alta contagem inicial de micro-organismos e a prevalência de mastite, evidenciada pela alta contagem de células somáticas. Altas contagens de células somáticas são correlacionadas com aumento de protease e lipase, estáveis ao calor, em leite (LÉ MARECHAL et al., 2011).

A microfiltração (MF) seguida de pasteurização é uma tecnologia já aplicada em vários países da Europa, nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, para estender a vida útil do leite refrigerado (SABOYA e MAUBOIS, 2000). A microfiltração promove a remoção de células somáticas, a redução de cerca de 4 ciclos logaritmos na contagem total microbiana, e a pasteurização pós-microfiltração promove a destruição da maioria dos micro-organismos remanescentes (ELWELL e BARBANO, 2006).

A tecnologia de MF representa uma alternativa não térmica para obtenção de um leite fluido, não esterilizado, mas com vida de prateleira estendida (SABOYA e MAUBOIS,

2000). O leite microfiltrado pasteurizado associa a vantagem da maior qualidade sensorial do leite pasteurizado em relação ao UHT, com a praticidade de um produto de vida de prateleira relativamente mais longa do que o produto somente pasteurizado, mas sem prescindir da cadeia de frio para sua distribuição e comercialização.

Nos países europeus e no Canadá, o leite microfiltrado pasteurizado é envasado assepticamente e pode ter sua vida útil estendida por até 35 dias (BINETTI, BAILO, e REINHEIMER, 2001; HOFFMANN et al., 2006; LORENZEN et al., 2011). Atualmente, a vida de prateleira típica do leite pasteurizado refrigerado nos EUA é de 14 dias (BOOR, 2001) e no Brasil, o leite tipo A pasteurizado refrigerado não ultrapassa 7 dias.

A vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado depende diretamente da qualidade do leite cru, que é resultado da contagem inicial dos micro-organismos, tipo de bactérias presentes (SCHMIDT et al., 2012), número de células somáticas e das condições de armazenamento a que o leite cru é submetido (BARBANO et al., 2006).

O objetivo desse trabalho consistiu em verificar o efeito da refrigeração do leite cru, em condições típicas do Brasil, e a influência da microfiltração na qualidade microbiológica, propriedades sensoriais e vida útil do leite microfiltrado pasteurizado, acompanhando sua aceitação sensorial, atividade proteolítica e mudanças físico-químicas com o tempo de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Processamento do leite microfiltrado pasteurizado

O leite recém-ordenhado utilizado foi adquirido de um laticínio local, Atilatte, Fazenda Atibainha, Itatiba/SP. Após ordenha mecânica, o leite foi imediatamente resfriado e transportado em latões, devidamente higienizados, para a planta de processamento de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. Após aquecimento a 45 °C em tanque encamisado, provido de tampa e agitador, o leite foi desnatado. O desnate foi realizado em uma centrífuga de pratos, com capacidade de 400 L/h, marca Westfalia Separator®, modelo MTC 3-03-107.

Após o desnate, o leite foi dividido em duas partes: 1) leite controle (imediatamente processado: microfiltrado e pasteurizado) e 2) leite armazenado a 7 °C/6 dias e depois processado. A microfiltração foi realizada a 45 °C, em membrana Isoflux®, porosidade de 1,4 µm, Ø 25 mm e comprimento de 1178 mm. A membrana cerâmica era constituída de 1 módulo com 23 canais de 3,5 mm de diâmetro cada. Os parâmetros utilizados no processo de

microfiltração foram: vazão de alimentação 4,5 m³/h e pressão transmembrana de 1,3 bar. Durante a microfiltração, o fluxo de permeado variou de 120 a 150 L/h.m².

A microfiltração do leite foi realizada até atingir Fator de Concentração (FC) igual a 4,0. O FC foi calculado pela relação da massa de leite inicial e a massa coletada de retentado. Em seguida, o leite microfiltrado foi pasteurizado a 65 °C/30min em tanque pasteurizador elétrico, automático, aço inox, modelo Mixmatic 110, capacidade 110 litros, com controle de agitação e da temperatura de aquecimento e resfriamento.

Após a pasteurização, o leite foi resfriado até 7 °C e envasado manualmente em garrafas plásticas de polietileno pigmentado, previamente sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm por 30 minutos). O processo foi feito em triplicata, em dias diferentes, o que resultou em 6 experimentos. Após envase, o leite desnatado, microfiltrado e pasteurizado foi armazenado a 7 °C. A Figura 1 apresenta um esquema geral do processamento.

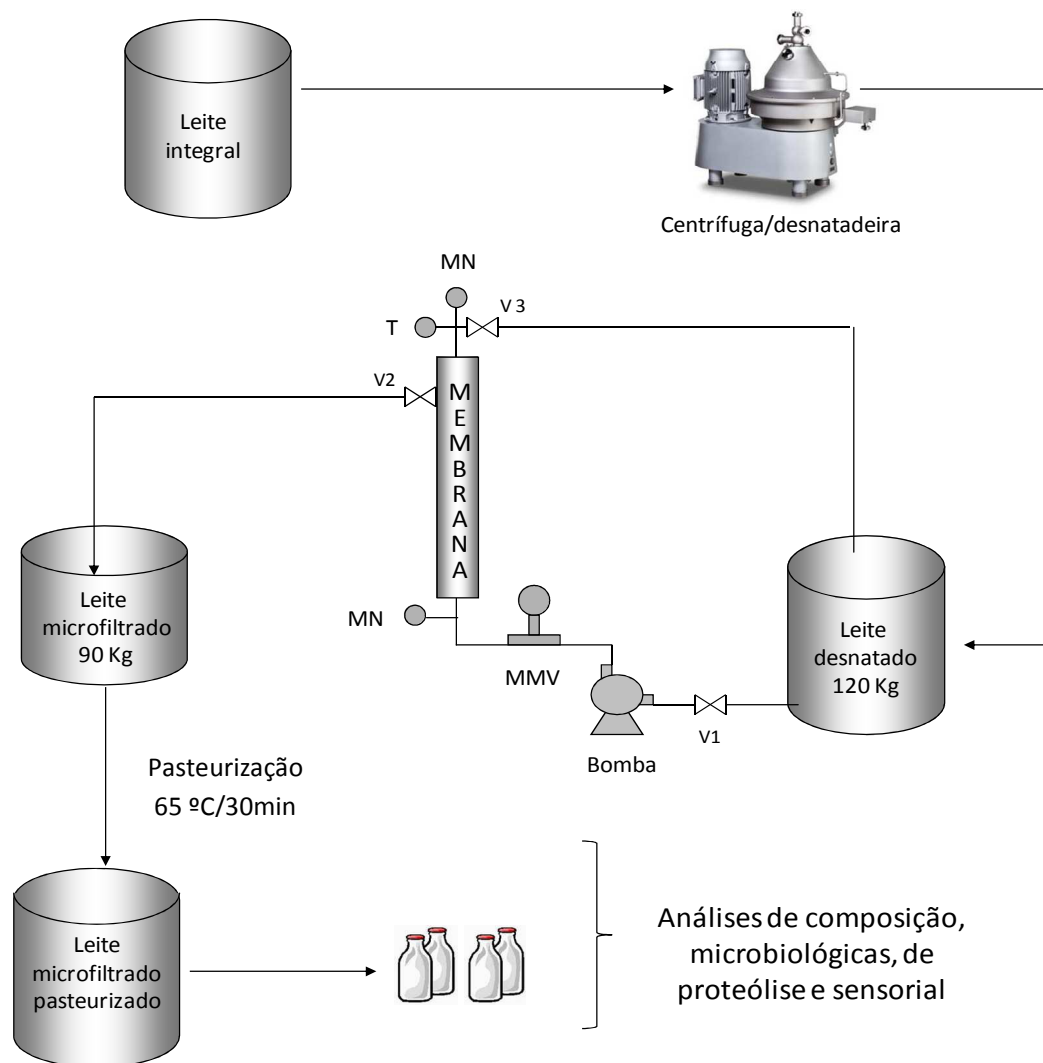


Figura 1. Fluxograma geral do processamento. Válvulas borboletas: V1 e V2; Válvula agulha: V3; Medidor Magnético de Vazão: MMV; Termômetro: T; Manômetros: MN.

2.2. Análises físico-químicas e microbiológicas

No leite cru desnatado foram determinados o pH, acidez, gordura, Contagem de Células Somáticas (CCS), proteína total, caseína, viscosidade e perfil eletroforético. Também foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios, micro-organismos psicrotróficos aeróbios, coliformes totais e coliformes termotolerantes. As mesmas análises foram realizadas, a cada 5 dias de armazenamento refrigerado, até o fim da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado, com exceção da CCS, que foi feita somente no primeiro dia. Nesse leite também foi realizada análise para detecção da presença de *Salmonella* sp.

Os métodos utilizados foram: pH (potenciômetro Digimed DM20); acidez titulável: através de titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic) na presença de indicador fenolftaleína, método oficial AOAC 947.05 (AOAC, 1995); gordura: pelo método de Gerber (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 1989) para o leite cru integral, e pelo método de extração etérea de Monjonier AOAC 989.05 (AOAC, 1995) para leite após desnate. A proteína total foi determinada através do nitrogênio total (NT) pelo método de micro-Kjeldahl AOAC 991.20 (AOAC, 1995); o nitrogênio não protéico (NNP), pela metodologia descrita por Aschaffenburg & Drewry (1959), através da determinação do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação em TCA a 12%, seguida do método de micro-Kjeldahl AOAC 991.20 (AOAC, 1995). O nitrogênio não caseico (NNC) pela metodologia desenvolvida por Rowland (1938) através do nitrogênio solúvel do sobrenadante após a precipitação da caseína no pH 4,6, seguida de micro-Kjeldahl, método AOAC 991.20 (AOAC, 1995). Os valores de NT foram multiplicados pelo fator de correção de 6,38, para a obtenção dos teores equivalentes de proteína total. A caseína foi calculada por diferença entre NT e NNC, seguida da multiplicação por 6,38.

Para realização da contagem de células somáticas as amostras foram encaminhadas à Clínica do Leite (ESALQ-USP, Piracicaba – SP) e a contagem foi determinada pelo método de citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments Inc., Chaska - EUA).

A contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando-se Ágar Padrão para Contagem – PCA e incubação por 48h à 35°C. Para contagem total de micro-organismos psicrótróficos aeróbios foi realizado plaqueamento em superfície no meio PCA e incubação por 10 dias à 7°C. A determinação de coliformes 30° foi realizada através da técnica do Número Mais Provável – NMP (DOWES e ITO, 2001). A detecção de *Salmonella* spp foi feita pelo ITAL, segundo a metodologia da ISO 6785 / IDF 93 através de pré-enriquecimento em caldo lactosado (35°C/24h), enriquecimento seletivo com caldo tetrionato e caldo selenito cistina (35°C/24h), semeadura em placas com Ágar entérico de Hertoen (HE) e Ágar xilose lisina desoxicolato-XLD (35°C/24h).

A viscosidade foi determinada a 25 °C em viscosímetro (Brookfield modelo DV II, Stoughton, USA) a 100 rpm equipado com adaptador UL para spindle cilíndrico nº 00. As medidas foram feitas em duplicatas após 30 s e os resultados foram expressos em cP.

A avaliação da proteólise do leite microfiltrado pasteurizado foi realizada pelo acompanhamento da relação caseína/proteína e NNP/NT durante o tempo de armazenamento refrigerado.

As amostras foram também analisadas por eletroforese UREA-PAGE de acordo com Melachouris (1969). Os géis de concentração e de separação foram constituídos de 4 % e 9 % de poliacrilamida, respectivamente. A migração foi efetuada em uma unidade vertical Mini Protean III (Bio-Rad) sob tensão elétrica de 120V. As revelações das bandas foram feitas por imersão do Urea-PAGE em Coomassie Brilliant Blue Coloidal G, seguindo metodologia descrita por Blakesley & Boezi (1977).

2.3. Análise sensorial

2.3.1. Detecção de sabor amargo durante armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado

Amostras de leite microfiltrado pasteurizado provenientes de leite cru controle (imediatamente processado) e leite cru armazenado por 7 °C/6 dias foram avaliadas pela equipe treinada após 1, 5, 10 e 15 dias de armazenamento para determinação do gosto amargo. Foi solicitado que expressassem a intensidade do gosto amargo das amostras de leite (codificadas com 3 dígitos) em escala não estruturada de 9 cm, ancorada nos extremos direito e esquerdo com os termos “nenhum” e “forte” respectivamente.

Uma equipe de 10 assessores foi selecionada e treinada para detecção e quantificação do sabor amargo. Para seleção dos assessores, a amostra estímulo foi uma solução de sulfato de quinino a 0,0005% adicionada ao leite pasteurizado desnatado (CLARK et al. 2009) e a amostra referência foi o mesmo leite sem a adição da solução. As duas amostras foram apresentadas aos candidatos nas 6 possíveis combinações (AAB, BAA, ABA, BBA, BAB, ABB).

Posteriormente, os assessores foram treinados, através de procedimento que solicitou que expressassem a intensidade do gosto amargo de 3 amostras (0,0 mL, 1,2 mL e 2,5mL) de leite em escala não estruturada de 9 cm, ancorada nos extremos direito e esquerdo com os termos “nenhum” e “forte” respectivamente. As amostras foram codificadas com 3 dígitos e oferecidas em 4 sessões.

Foram selecionados os candidatos com base no poder de discriminação entre as amostras, repetibilidade e concordância entre os assessores (DAMÁSIO e COSTELL, 1991), verificadas pela análise de variância de dois fatores (amostra e repetição) para cada provador em relação ao atributo testado.

2.3.2. Aceitação sensorial

O teste de aceitação sensorial foi realizado no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, em cabines individuais. As duas diferentes amostras de leite desnatado microfiltrado pasteurizado (provenientes de leite cru controle e leite cru armazenado por 7 °C/6 dias) foram avaliadas por 100 provadores, consumidores habituais de leite. Os provadores foram recrutados/convidados no campus da Universidade e solicitados a assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido antes de participarem da pesquisa, conforme aprovação do Comitê de Ética (Parecer 051/2007).

As amostras foram avaliadas após 1, 5, 10 e 15 dias de armazenamento refrigerado e apresentadas monadicamente em copos plásticos de 30 mL, a uma temperatura na faixa de 10 a 15 °C. Os atributos avaliados sequencialmente foram aparência, aroma, sabor e impressão global, utilizando-se escala hedônica estruturada de 9 pontos, com extremos gostei extremamente e desgostei extremamente. A intenção de compra também foi avaliada utilizando escala hedônica de 5 pontos, com extremos certamente compraria e certamente não compraria.

2.4.Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento foi do tipo casualizado, em blocos, com três repetições. O fator estudado foi a condição de armazenamento do leite cru, com 2 níveis de variação: sem armazenamento refrigerado (controle) e resfriado a 7 °C/6 dias.

Para avaliação da qualidade do leite microfiltrado pasteurizado (acidez, proteólise, viscosidade aparente, intensidade do gosto amargo e aceitação sensorial) com o tempo de armazenamento foi adotado um delineamento experimental do tipo *split-plot*, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento. As análises foram realizadas nos dias 0, 5, 10 e 15 de armazenamento refrigerado. O teste F-ANOVA foi usado para verificar as diferenças entre tratamentos, tempo de armazenamento refrigerado e a interação tempo versus tratamento. Foi utilizado o teste de Tukey de comparação múltipla, a 5% de significância, para agrupar tratamento e/ou tempo com médias cujas diferenças não foram estatisticamente significativas, com auxílio do programa SAS versão 9.2 (SAS institute Inc, Cary, NC/USA).

2.5. Vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado

O fim da vida de prateleira do leite - microfiltrado pasteurizado foi determinado pelos seguintes critérios: (a) aceitação sensorial, (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1993) quando as médias das notas forem inferiores a 6, correspondente a “gostei ligeiramente” na escala hedônica para qualquer um dos atributos; (b) detecção do gosto amargo, quando as médias forem $\geq$ a 4,5; (c) limites microbiológicos, a 2 NMP de coliformes a 30 °C/ mL de leite ou 1 NMP de coliformes a 45 °C/ mL de leite $4,0 \times 10^4$ UFC de mesófilos aeróbios/mL de leite (IN 62, BRASIL, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do armazenamento refrigerado do leite cru

A Tabela 1 mostra que o armazenamento refrigerado do leite cru a 7°C/6 dias não alterou a composição do leite, pH e viscosidade quando comparado ao leite controle ($p > 0,05$). Lisita (2010) também não observou alterações significativas para os valores de pH, acidez, proteína total, NNP, caseína e viscosidade após armazenamento do leite cru a 3, 7 e 10 °C por 3 dias.

Tabela 1. Caracterização do leite cru controle e após armazenamento refrigerado (7°C/6dias), $n=3^*$.

Componente	Leite controle	Leite 7°C/°C/6d
<i>ph</i>	6,73 ^a	6,76 ^a
<i>Acidez (°D)</i>	15,2 ^a	15,0 ^a
<i>Gordura (%)</i>	0,09 ^a	0,09 ^a
<i>Proteína (%)</i>	3,18 ^a	3,15 ^a
<i>Caseína (%)</i>	2,50 ^a	2,44 ^a
<i>NNP (%)**</i>	0,03 ^a	0,03 ^a
<i>Viscosidade (cP)</i>	1,72 ^a	1,72 ^a

* $n = n^\circ$ de replicatas de processamento; ^amédias com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). **NNP = Nitrogênio Não Protéico

As contagens de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos antes (leite controle) e após o armazenamento refrigerado (leite a 7 °C/6 dias) são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Contagem de micro-organismos (log UFC/ml) do leite desnatado antes e após armazenamento refrigerado (7°C/6 dias)

Replicata de Processo	Contagem (log UFC/mL)			
	Mesófilos		Psicrotróficos	
	<i>Leite controle</i>	<i>Leite 7°C/6d</i>	<i>Leite controle</i>	<i>Leite 7°C/6d</i>
1	4,60	6,87	2,53	6,00
2	3,20	4,48	2,30	3,30
3	3,23	6,15	2,95	6,14

O armazenamento refrigerado permitiu o aumento médio de 2,15 ciclos log dos micro-organismos mesófilos, e de 2,55 ciclos log dos psicrotróficos. O desenvolvimento de psicrotróficos foi maior que o de mesófilos devido ao armazenamento refrigerado, conforme esperado. No trabalho realizado por HARYANI et al. (2003), no leite estocado a 4 °C, o tempo necessário para se atingir uma população de micro-organismos psicrotróficos de 10^7 UFC/mL foi 7 dias, porém quando estocado a 7 °C a mesma contagem foi atingida em apenas 4 dias. Em nosso trabalho, após armazenamento refrigerado por 7 °C/6 dias, o número de micro-organismos mesófilos ultrapassou o limite permitido pela legislação que é de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a partir de 01/01/2012 (BRASIL, 2011). A contagem de psicrotróficos maior que 10^6 UFC/mL pode comprometer a qualidade dos produtos pelas alterações causadas pelas enzimas produzidas por esses micro-organismos (COUSIN, 1982, NÖRBERNG et al., 2009).

3.2. Qualidade e vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado

Como pode ser visto na Tabela 3, a etapa de microfiltração reduziu em 3 ciclos log a contagem inicial de micro-organismos mesófilos e até 4 ciclos log o número de micro-organismos psicrotróficos. A etapa posterior de pasteurização eliminou grande parte da microbiota remanescente pós-microfiltração, resultando em um leite com contagens de 10^0 UFC/mL de mesófilos e <1 UFC/ml de psicrotróficos. Assim, a combinação de microfiltração e pasteurização resultou em um leite com baixa população microbiana sem a necessidade de um tratamento térmico tão intenso como a ultrapasteurização ou a esterilização, e o indesejável “sabor a cozido” normalmente associado a esses tratamentos. A microfiltração

também foi efetiva na remoção de 100 % das células somáticas do leite cru desnatado, cujo teor médio era de $(16,0 \pm 5,6) \times 10^3$ cel/mL.

Tabela 3. Contagem média (n=3)*de micro-organismos mesófilos (UFC/mL) e psicrotróficos (UFC/mL) do leite desnatado (controle) e do leite refrigerado (7 °C/6 dias), após a microfiltração e a pasteurização.

Amostra	Contagem (UFC/mL)	
	Mesófilos	Psicrotróficos
Leite controle		
Leite cru	$1,4 (\pm 2,2) \times 10^4$	$4,8 (\pm 3,7) \times 10^2$
após microfiltração	$1,4 (\pm 1,4) \times 10^1$	<1
após pasteurização	$3,6 (\pm 2,9) \times 10^0$	<1
Leite 7°C/6 dias		
Leite	$3,0 (\pm 3,2) \times 10^6$	$8,0 (\pm 7,2) \times 10^5$
após microfiltração	$1,2 (\pm 1,5) \times 10^3$	$4,3 (\pm 3,6) \times 10^2$
após pasteurização	$8,7 (\pm 6,8) \times 10^0$	<1

*n = n° de replicatas de processamento

A Tabela 4 mostra que o armazenamento refrigerado do leite cru não afetou a viscosidade aparente, o teor de caseína e NNP e a população de micro-organismos mesófilos do leite microfiltrado pasteurizado. A acidez titulável ($p=0,0073$) e o número de micro-organismos mesófilos ($p=0,0001$) foram afetados pelo tempo de armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado. Houve aumento da acidez titulável do leite com o tempo de armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado, consistente com o aumento de micro-organismos mesófilos, responsáveis pela conversão da lactose em ácido láctico (Figura 2). Aos 15 dias de armazenamento refrigerado, o leite microfiltrado pasteurizado atingiu uma contagem de micro-organismos mesófilos de 3×10^4 UFC/mL, o que determinou o fim da sua vida de prateleira.

Tabela 4. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para os parâmetros físico-químicos.

Fatores	Acidez titulável			Viscosidade aparente		CN/P		NNP/NT		Contagem mesófilos	
	GL	QM	Valor p	QM	Valor p	QM	Valor p	QM	Valor p	QM	Valor p
Tratamento¹	1	0,35	0,5610	0,0008	0,1680	0,002	0,3536	0,5109	0,4109	0,19	0,6244
Tempo²	3	5,70	0,0073	0,0001	0,8264	0,003	0,2704	0,6277	0,4742	15,30	0,0001
Tratamento*tempo	3	0,31	0,08147	0,00005	0,9423	0,001	0,6227	0,5461	0,5317	0,11	0,9296
Erro	16	0,99		0,0003		0,052		0,7166		0,78	

GL: Graus de liberdade; QM: Quadrado médio; CN/P: relação caseína proteína; NNP/NT: relação nitrogênio não protéico nitrogênio total

¹Tratamento: Armazenamento refrigerado prévio: sem (controle) e 7°C/6dias

²Tempo de armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado (LMP): 1, 5, 10 e 15 dias

Após a pasteurização, as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes foram menores que 0,03 NMP/mL para todas as amostras de leite microfiltrado pasteurizado, independente da origem, não se alterando ao longo do tempo de armazenamento. Em todas as amostras de leite microfiltrado pasteurizado, também não foi detectada a presença de *Salmonella* sp.

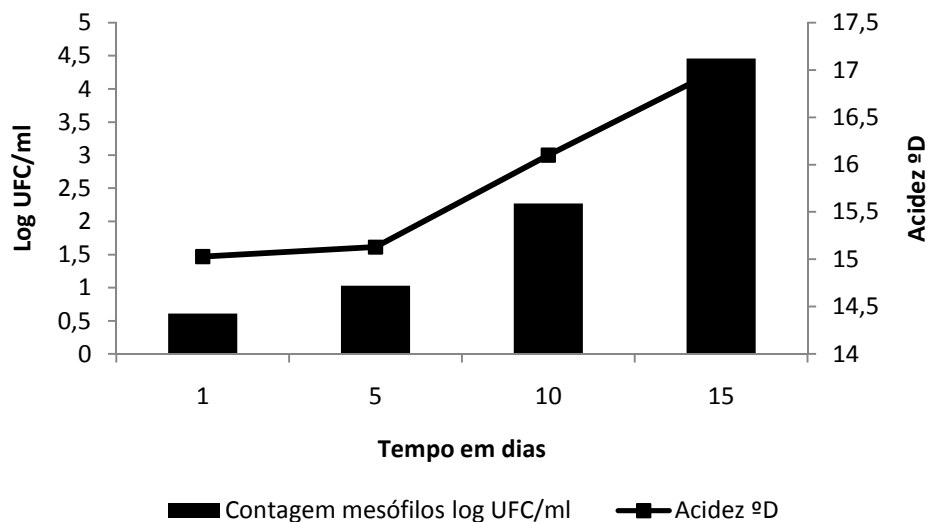


Figura 2. Evolução da acidez (°D) e da contagem de micro-organismos mesófilos (log UFC/ml) do leite microfiltrado pasteurizado ao longo do tempo de armazenamento refrigerado (n=3).

Apesar do leve aumento na relação $(\% \text{ NNP} / \% \text{ NT}) \times 100$, indicando ter havido aumento da proteólise com o tempo (Figura 3), essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,47$). Também não foram detectadas alterações ao longo do tempo na viscosidade do leite microfiltrado pasteurizado ($p=0,83$) (Tabela 5). O perfil eletroforético (Figura 4) também foi similar entre as amostras e ao longo do tempo. Isso pode ser atribuído às baixas contagens iniciais de micro-organismos psicrotróficos no leite cru utilizado para elaboração do leite microfiltrado pasteurizado, insuficientes para produzir enzimas proteolíticas em quantidade suficiente para provocar alterações significativas na viscosidade do produto. Aos 15 dias de estocagem do leite microfiltrado, o número de psicrotróficos ainda era menor que 10^6 (Figura 3), patamar normalmente associado com alterações físicas e sensoriais (aumento de viscosidade e gosto amargo) provocadas pela ação de enzimas proteolíticas de micro-organismos psicrotróficos (SANTOS e FONSECA, 2001; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

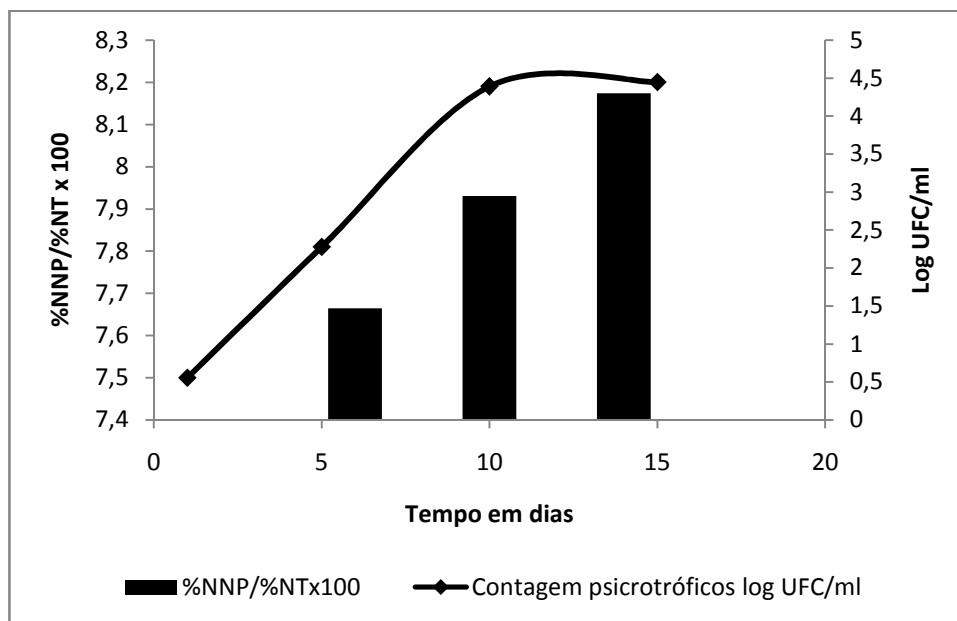


Figura 3. Evolução da proteólise e do número de micro-organismos psicrotróficos (log UFC/ml) do leite microfiltrado pasteurizado durante a estocagem (n=3).

Tabela 5. Viscosidade (cP) do leite microfiltrado pasteurizado ao longo da estocagem.

	Tempo (dias)			
	1	5	10	15
<i>Leite controle</i>	1,72 (± 0,02) ^a	1,71 (± 0,02) ^a	1,72 (± 0,03) ^a	1,73 (± 0,02) ^a
<i>Leite 7°C/6 dias</i>	1,71 (± 0,03) ^a	1,70 (± 0,02) ^a	1,71 (± 0,01) ^a	1,71 (± 0,01) ^a

a - médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha e na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

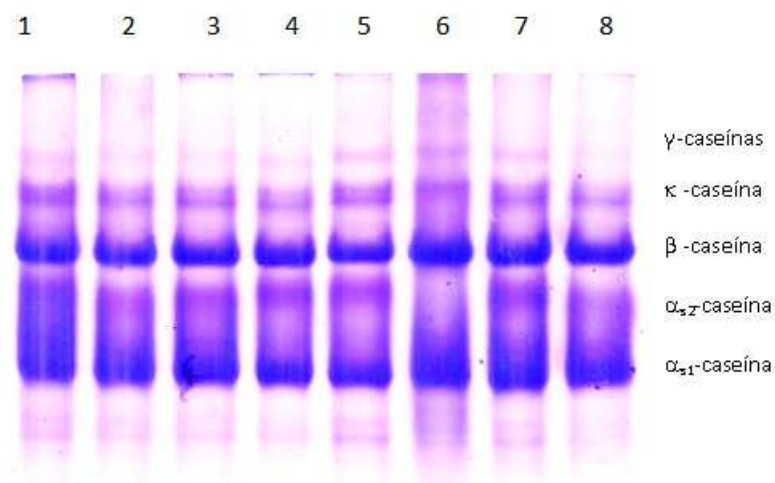


Figura 4. Eletroforese Urea-PAGE das amostras: 1 ao 4 (leite microfiltrado pasteurizado proveniente do leite controle – sem armazenamento refrigerado prévio); 5 ao 8 (leite microfiltrado pasteurizado - obtido do leite refrigerado por 6 dias), ambos com 1, 5, 10 e 15 dias de estocagem, respectivamente.

Uma diminuição na relação caseína/proteína, com o tempo de estocagem do leite - microfiltrado pasteurizado pode ser observada na Figura 5, apesar de não ser estatisticamente significativa ($p=0,27$). Um decréscimo de CN/P (%) maior que 4,76 % é utilizado como parâmetro de fim da vida de prateleira (SANTOS et al, 2003; ELWELL e BARBANO, 2006). Este limite foi estabelecido por Santos, Ma e Barbano (2003) em estudo onde 50 % dos julgadores de um painel treinado detectaram gosto amargo em leite de baixa contagem microbiana e alto teor de células somáticas. Os autores atribuíram a formação de gosto amargo à presença de plasmina, plasminogênio e outras proteases associadas à altas contagens de células somáticas.

Em nosso trabalho, a baixa contagem de células somáticas do leite cru desnatado (16×10^3 cel/mL) torna improvável atividade proteolítica intensa devida à plasmina. A ação da plasmina sobre a β -caseína, com produção de γ -caseínas não se alterou com o tempo de armazenamento refrigerado do leite microfiltrado pasteurizado, independente da origem do leite cru utilizado para a sua fabricação, como pode ser visto na Figura 4.

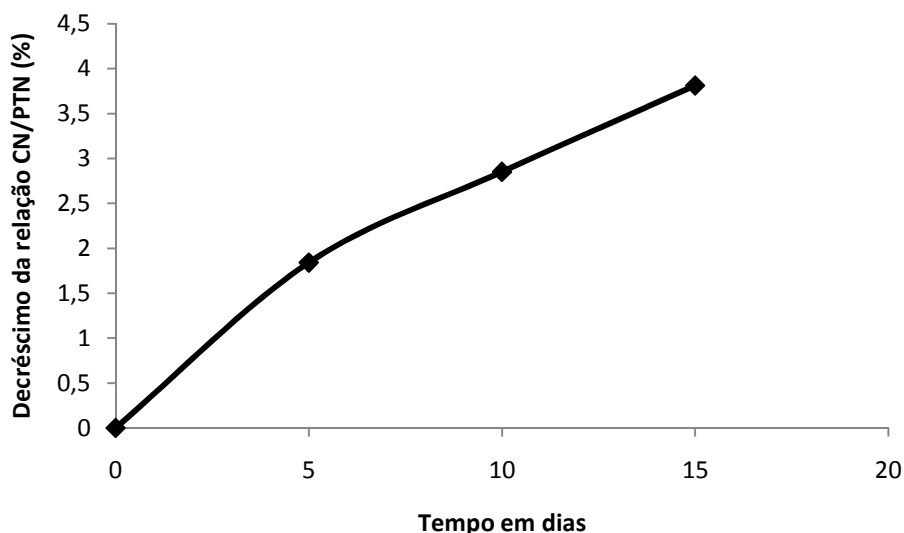


Figura 5. Proteólise. Decréscimo em caseína, como % da proteína total do leite microfiltrado pasteurizado - durante a estocagem.

A Tabela 6 apresenta a evolução do sabor amargo do leite microfiltrado ao longo do tempo de armazenamento. Observou-se que no leite cru refrigerado a 7 °C/6 d, o atributo gosto amargo foi mais percebido pelos julgadores que no leite controle ($p=0,0007$).

Tabela 6. Evolução do sabor amargo do leite microfiltrado pasteurizado ao longo do tempo (n=10 assessores)

	Tempo (dias)				
	1	5	10	15	Média
Leite controle	0,46	1,01	1,52	1,75	1,18 ^B
Leite armazenado 7 °C/6 dias	1,35	1,71	2,62	2,95	2,16 ^A
Média	0,91 ^c	1,36 ^{bc}	2,07 ^{ab}	2,35 ^a	

a, b,c - médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$). A, B - médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Também houve aumento significativo do gosto amargo do leite microfiltrado pasteurizado com o tempo de armazenamento ($p<0,0001$), independente de sua procedência (leite controle ou com refrigeração). Apesar do aumento durante os 15 dias de armazenamento, as médias nunca

atingiram valores maiores ou iguais a 4,5, o que significaria rejeição ao produto, mesmo quando o leite microfiltrado pasteurizado foi proveniente de leite cru armazenado a 7 °C/6 dias, que apresentou maior número de micro-organismos psicrótróficos (Tabela 3). Como já discutido anteriormente, a proteólise ocorrida com o tempo foi baixa (Figuras 3, 4 e 5) e insuficiente para provocar alterações físicas significativas, como aumento de viscosidade (Tabela 5), alteração no perfil eletroforético, ou ainda mudanças sensoriais, como gosto amargo intenso (Tabela 6), que levassem ao fim da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado.

3.3. Aceitação sensorial e intenção de compra

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dos atributos (aparência, aroma, sabor e impressão global) entre as amostras de leite microfiltrado pasteurizado processadas a partir de leite cru (controle) e leite cru refrigerado (7 °C/6dias) (Tabela 7). O tempo de armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado também não influenciou a aceitação sensorial ($p > 0,05$). Uma relação entre o perfil de sabor/aroma do leite e o tempo de estocagem também não foi encontrada no estudo realizado por Lorenzen et al. (2011).

Tabela 7. Graus de liberdade, quadrados médios e probabilidades para os atributos sensoriais.

Fatores	Aparência			Aroma		Sabor		Impressão global	
	GL	QM	Valor p	QM	Valor p	QM	Valor p	QM	Valor p
Tratamento¹	1	0,10	0,88	2,10	0,43	10,81	0,11	2,31	0,40
Tempo²	3	1,02	0,72	2,35	0,56	1,54	0,78	0,58	0,91
Tratamento*tempo	3	2,44	0,36	5,40	0,19	5,80	0,25	6,10	0,14
Erro	792	2,31		3,46		4,30		3,34	

GL: Graus de liberdade, QM: Quadrado médio

¹Tratamento: Armazenamento refrigerado prévio: sem (controle) e 7°C/6dias

²Tempo de armazenamento do leite microfiltrado pasteurizado (LMP): 1,5, 10 e 15 dias

Os dados da Tabela 8 mostram a boa aceitação sensorial do leite microfiltrado pasteurizado durante os 15 dias de armazenamento. Aparentemente, o processo de microfiltração, seguido da pasteurização do leite foi suficiente para garantir a boa aceitação sensorial mesmo quando a matéria-prima foi armazenada a 7 °C/6dias. As médias dos atributos aroma, sabor e

impressão global (5,98 a 6,64) corresponderam ao termo gostei ligeiramente. Questionários respondidos pelos provadores mostram que somente 30,2 % dos participantes consomem leite desnatado, o que pode ser o motivo das médias serem relativamente baixas. Além disso, apenas 15,8% dos provadores consomem leite pasteurizado, tendo declarado estarem mais habituados a consumir leite UHT (77,0 %).

Tabela 8. Médias dos atributos sensoriais do leite microfiltrado pasteurizado durante o armazenamento (n=100).

Tempo (dias)	Média dos atributos*			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
1	7,26 ^a	6,17 ^a	6,24 ^a	6,35 ^a
5	7,17 ^a	6,25 ^a	6,03 ^a	6,31 ^a
10	7,15 ^a	6,39 ^a	6,18 ^a	6,40 ^a
15	7,09 ^a	6,16 ^a	6,07 ^a	6,27 ^a
Média	7,17	6,24	6,13	6,33

a, – médias com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

O produto apresentou boa intenção de compra independente da origem do leite cru durante os 15 dias de estocagem ($p=0,10$), como mostra a Figura 6. Mais de 50 % dos provadores, certamente ou provavelmente comprariam o leite microfiltrado pasteurizado durante toda sua vida de prateleira. Mais de 53 % dos provadores consideraram que o sabor foi o atributo mais importante na hora de comprar o produto.

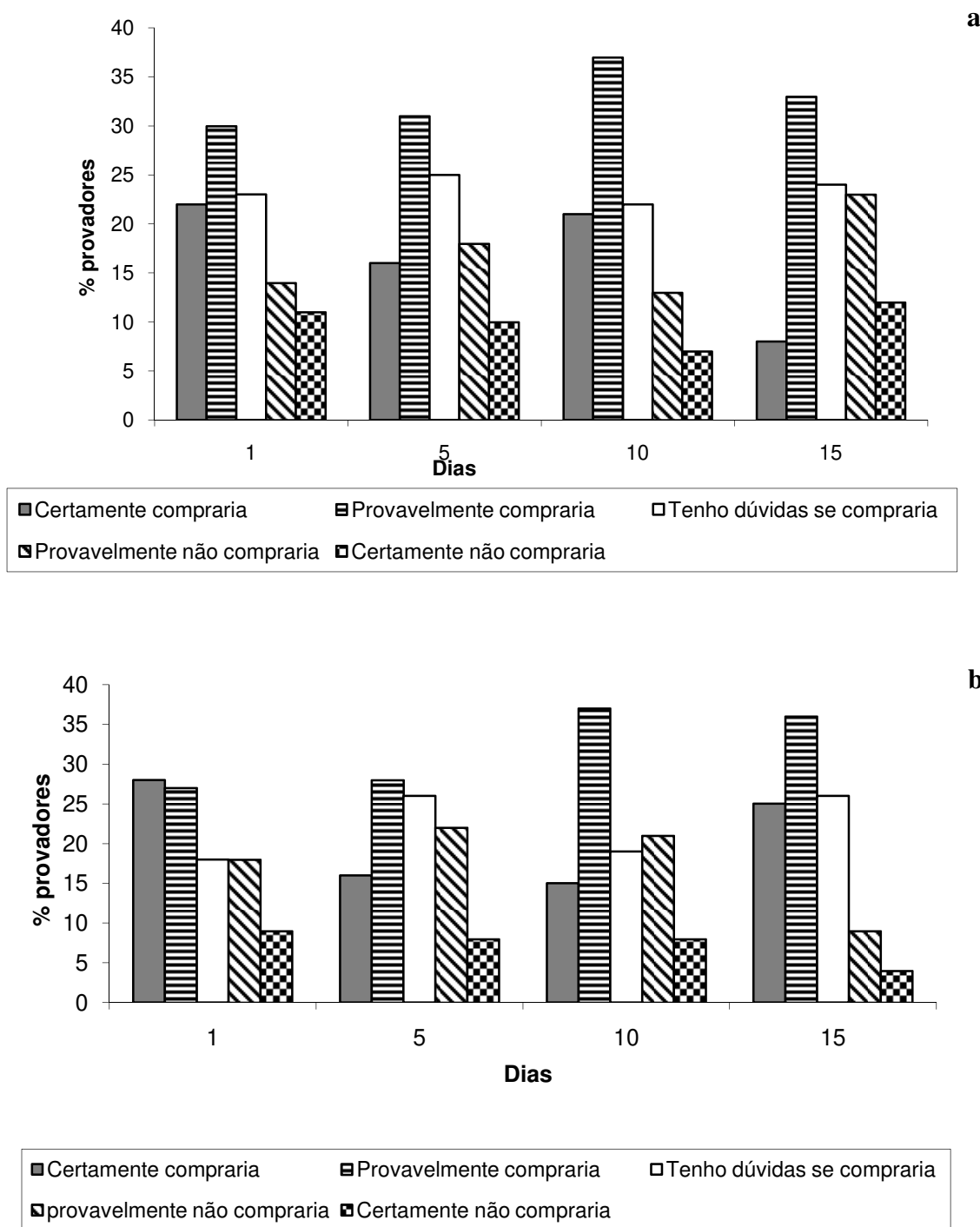


Figura 6. Intenção de compra ao longo do tempo de estocagem do leite. Amostra controle (a) e amostra de leite refrigerado a 7°C /6 d (b).

Mudanças físicas e sensoriais não foram fatores que determinaram o fim da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado. A contagem de micro-organismos mesófilos foi o

fator determinante do fim da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado, que foi de 15 dias. Nesse período, o leite atingiu contagem de 3×10^4 , levemente inferior ao limite estabelecido pela legislação brasileira para leite pasteurizado (IN 62, BRASIL, 2011) ($4,0 \times 10^4$ UFC/mL), independente da matéria prima utilizada (controle ou com armazenado a 7°C/6 d). Resultado similar de 14 dias de vida de prateleira também foi obtido para leite desnatado, pasteurizado e microfiltrado em membrana Membralox GP® de 1,4 µm (SPADOTI et al. 2007).

4. CONCLUSÃO

Os 15 dias de vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado, bem superior aos 5-7 dias do leite tipo A pasteurizado, traz vantagens inequívocas na logística de distribuição para a indústria. O estudo mostrou que a microfiltração do leite cru, mesmo quando armazenado a 7 °C/6 dias, é uma tecnologia efetiva para a redução da carga microbiana e obtenção de um produto que alia qualidade sensorial e vida de prateleira estendida ao leite pasteurizado.

5. REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E 18.06.07. **Standard guide for the shelf life determination of consumer products by sensory evaluation.** Philadelphia, ASTM, 1993.

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. **International Dairy Congress**, v.15, 1959. Proceedings...International Dairy Federation, v.3, p.1631-1637, 1959.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International.** 16ª Ed., Washington, 1995.

BARBANO, D.M.; MA, Y.; SANTOS, M.V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. **Journal fo Dairy Science**, v. 89 (Supl.1), p.E15–E19, 2006.

BINETTI, A.G.; BAILO, N.B.; REINHEIMER, J.A. Aplicaciones de la microfiltración en la industria láctea. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, n.24, p.48-52, 2001.

BLAKESLEY, R.W.; BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 82, n.2, p. 580-582, 1977.

BOOR, K.J. Fluid dairy products quality and safety: looking to the future. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1-11, 2001.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002, Seção I, n. 172, p. 13-22.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 dez. 2011. Seção I, n. 251, p. 6-11.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods**. London: British Standard Institution, 1989. 12p.

CLARK, S.; COSTELLO, M.; DRAKE, M.; BODYFELT, F.W. **The sensory evaluation of dairy products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 2009. 573p.

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

DAMÁSIO, M.H.; COSTELL, E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.31 n.2, p. 165-178, 1991.

DOWES P., ITO K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C., Ed. American Public Health Association, 2001. 676 p.

ELWELL, M.W.; BARDANO, D.M. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 20-30, 2006.

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

HOFFMANN, W.; KIESNER, C.; KRUSCH, U.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; MARTIN, D.; EINHOF, K.; LORENZEN, P.C.; MEISEL, H.; HAMMER, P.; SUHREN, G.; TEUFEL, P. Processing of extended shelf life milk using microfiltration. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 229-235, 2006.

IZIDORO, T.B.; SPINA, T.L.B.; LIMA, M.T.; NOBILE, C.; TUASEK, S.O.; PEREIRA, J.G.; PINTO, J.P.A.N. Resfriamento marginal: multiplicação da microbiota psicrófila e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. In: IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBQL, 2010. 1 CD-ROM.

LE MARÉCHAL, C.; VAUTOR, R.T.E.; LE LOIR, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 247–282, 2011.

LISITA, M. **Influência da variação da temperatura de armazenamento de leite cru na vida de prateleira de leite UHT em embalagem flexível e estocagem sob luz**. 2010. 129p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LORENZEN, P.H.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; EINHOF, K.; HAMMER, P.; HARTMANN, R.; HOFFMANN, W.; MARTIN, D.; MÖLKENTIN, J.; WALTE, H.G.; DEVRESE, M. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.2, p. 166-178, 2011.

MELACHOURIS, N. Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins, casein, and clotting enzymes. **Journal of Dairy Science**, v.52, p.456-459, 1969.

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

ROWLAND, S.J. The determination of nitrogen distribution in milk. **Journal of Dairy Research**, v.9, p. 42-46, 1938.

SABOYA, L. V.; MAUBOIS, J. L. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. **Lait**, n. 80, p. 541-553, 2000.

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

SANTOS, M.V.; MA, Y; BARBANO, D.M. Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk During Shelf-Life Storage. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 2491-2503, 2003.

SCHMIDT, V.S.J.; KAUFMANN, V.; KULOZIK, U.; SCHERER, S.; WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 1-9, 2012.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in food Science & Technology**, v. 8, p. 35-40, 1997.

SPADOTI, L.M.; MORENO, I.; ALVES, A.T.S.; DENDER, A.G.V.V; MARASCA, E.T.G.; VIALTA, A.; COPPE, R.; LOSCALZO, I.T.; TRENTA, F.K.H.S. Aplicação da microfiltração na melhoria e qualidade do leite fluido. Anais XXIV Congresso Nacional de Laticínios - **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, MG, v.62, n.357, p. 471-476, 2007.

ANEXOS

Ficha para Teste de Aceitação

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra e use a escala abaixo para indicar quanto você gostou ou desgostou de cada atributo.

Código da amostra:

Impressão global:

Aroma:

Aparência:

Sabor:

9 - gostei extremamente

4 - desgostei ligeiramente

8 - gostei muito

3 - desgostei moderadamente

7 - gostei moderadamente

2 - desgostei muito

Ficha para detecção de sabor amargo

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra codificada de leite microfiltrado pasteurizado. Por favor, avalie a intensidade do sabor amargo.

Código da amostra:

SABOR AMARGO

Fraco

Forte

CONCLUSÃO GERAL

O fluxo de permeado da Isoflux® se mostrou inferior aos obtidos por membranas da mesma porosidade que utilizam o sistema de Pressão Transmembrana Uniforme (PTU).

A retenção de micro-organismos e células somáticas foi similar a outras membranas de microfiltração existentes, mas a retenção de proteína foi maior que o esperado para membranas com poro 1,4 μm (~11 %). Não houve aumento da retenção de micro-organismos, células somáticas, proteína e gordura com o aumento do FC.

A microfiltração foi efetiva no aumento da vida de prateleira do leite microfiltrado pasteurizado, que foi de 15 dias, bem superior aos 5-7 dias do leite tipo A pasteurizado, o que traz vantagens inequívocas na logística de distribuição do produto.

A microfiltração do leite cru, mesmo quando armazenado a 7 °C/6 dias, é uma tecnologia efetiva para a redução da carga microbiana e obtenção de um produto que alia qualidade sensorial e vida de prateleira estendida ao leite pasteurizado.