

METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA AVALIAR O EFEITO DA CARBONATAÇÃO SOBRE A MICROBIOTA E VISCOSIDADE DO LEITE CRU¹

Response surface methodology for evaluation the effects of carbonation on the microorganism and viscosity of raw milk

Marianne Ayumi SHIRAI^P

Maria Lucia MASSON^B

SUMÁRIO

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da carbonatação sobre a multiplicação de microrganismos e da viscosidade do leite cru durante o armazenamento refrigerado. Foi aplicado um planejamento fatorial 2³ completo onde avaliou-se o efeito das variáveis pH (5,8 a 6,4), tempo (0 a 10 dias) e temperatura (5 a 10°C) de armazenamento do leite carbonatado sobre as respostas psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos, mesófilos e viscosidade. Os resultados mostraram que após 10 dias, a carbonatação em pH 5,8 inibiu a multiplicação de todos os microrganismos pesquisados independente da temperatura de armazenamento. A viscosidade não foi alterada logo após a carbonatação, mas durante a estocagem refrigerada houve elevação nos valores desta propriedade. Os modelos de superfície de resposta foram adequados para prever a contagem de mesófilos e psicrotróficos e medida da viscosidade, pois a falta de ajuste não foi significativa e o coeficiente de determinação (R²) foi maior que 0,95.

Termos para indexação: microbiologia; CO₂; planejamento fatorial; conservação.

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de melhorar a qualidade do leite cru o Ministério da Agricultura publicou a Instrução Normativa nº 51 em 2002, que começou a vigorar no Sul, Sudeste e Centro Oeste a partir de 2005 e no Norte e Nordeste em 2007. A IN 51 determina, dentre outros aspectos, parâmetros físico-químicos e microbiológicos para o leite cru (NERO et al., 2008). O procedimento de refrigeração nas propriedades leiteiras contribui para diminuir a multiplicação de microrganismos mesófilos (PINTO et al., 2006). No entanto a refrige-

ração, por si só, não é garantia de qualidade. É extremamente importante que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para diminuir a contaminação inicial e, desta forma, a redução da temperatura pode manter a contagem microbiana em níveis baixos. Salienta-se que, quanto maior o tempo de estocagem sob baixas temperaturas (7 a 10°C) de um leite apresentando alta contagem inicial de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações no produto final (leite pasteurizado, leite ultra pasteurizado e queijos), pela ação de microrganismos psicrotróficos (MUIR, 1996). Embora

- 1.
 2. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Caixa Postal 19011, CEP 81531-980, Curitiba – PR. Fone: (41) 3361-3232. e-mail: marianeshirai@yahoo.com.br
 3. Docente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. e-mail: masson@ufpr.br
- * Autor para correspondência.

a grande maioria dessas bactérias seja destruída pelo tratamento térmico, estas apresentam capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes que mantêm sua atividade mesmo após a pasteurização ou tratamento UHT (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

Vários estudos têm sugerido a aplicação do dióxido de carbono em conjunto com o armazenamento refrigerado para aumentar o tempo útil do leite cru (ROBERTS & TORREY, 1988; SIERRA et al., 1996; ESPIE & MADDEN, 1997; MA et al., 2003). A técnica de acidificação com CO₂, também conhecida como carbonatação, consiste na injeção de dióxido de carbono sob pressão controlada para acidificar o leite. O leite retorna ao valor do seu pH inicial através da degaseificação a vácuo (RAOUCHE et al., 2008). A carbonatação pode ser considerada um método acessível e que pode ser utilizado nas fazendas ou laticínios para prolongar o tempo útil do leite refrigerado (AMIGO et al., 1995; RUAS-MADIEDO et al., 1996).

A maioria dos estudos foca no efeito da carbonatação sobre microrganismos (ROBERTS & TORREY, 1988; AMIGO et al., 1995; SIERRA et al., 1996; ESPIE & MADDEN, 1997; MA et al., 2003) e parâmetros bioquímicos (GEVAUDAN et al., 1996; RUAS-MADIEDO et al., 1998; GUILHAUME et al., 2004; RAOUCHE et al., 2008) do leite e pesquisas com o intuito de verificar a influência sobre a viscosidade do leite cru ainda precisam ser realizadas. De acordo VIDAL-MARTINS et al. (2005), a viscosidade é uma variável importante para o desenvolvimento contínuo de produtos, processos, equipamentos, manuseio e controle de qualidade. Além disso, em muitas operações e tratamentos ocorrem mudanças das características do produto por isso se torna importante conhecer como a viscosidade varia com o tratamento utilizado.

A legislação brasileira não contempla o uso de aditivos químicos ou coadjuvantes de tecnologia em leite cru (BRASIL, 2002) e estudos ainda são necessários no sentido de viabilizar o emprego desta tecnologia com

segurança e parâmetros de processo devidamente definidos. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da carbonatação sobre a multiplicação de microrganismos e viscosidade do leite cru.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

O leite cru empregado neste experimento foi coletado na Fazenda Experimental do Canguiri da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – Paraná). O produto foi coletado logo após a ordenha em recipiente estéril, o qual foi imerso em gelo e imediatamente transportado para o Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

2.2 Carbonatação do leite cru

Para a realização dos ensaios de carbonatação do leite, utilizou-se o sistema de carbonatação em escala laboratorial empregado no trabalho de Hamerski (2009). O leite foi borbulhado com CO₂ (White Martins) em recipiente de vidro com capacidade de 1.000 mL, sendo que este estava imerso em um banho termostatizado (Tecnal, modelo TE 184). As temperaturas de operação foram de 5°C e 10°C, dependendo das condições do planejamento experimental da Tabela 1. Durante o processo, o pH foi controlado pelo eletrodo de vidro específico para amostras com proteína, conectado ao pHmetro portátil digital (Metrohm, modelo 826) e a temperatura por um termômetro digital.

O leite acidificado foi envasado em garrafas de vidro previamente higienizadas e armazenados sob condições de tempo e temperatura especificadas na Tabela 1 do delineamento experimental. Decorrido o tempo de armazenamento foram realizadas as análises microbiológicas e medida da viscosidade. Amostras sem acidificação com CO₂ (controle) também foram armazenadas nas condições empregadas neste trabalho (tempo e

temperatura do experimento) para avaliar a ação inibitória do dióxido de carbono frente aos microrganismos pesquisados e verificar a influência na viscosidade do leite cru. O efeito de inibição foi calculado mediante diferença entre a contagem da amostra controle e a contagem do leite acidificado para cada combinação de tempo e temperatura.

2.3 Análises microbiológicas e medida da viscosidade

A contagem de mesófilos e de psicrotróficos foram realizadas em ágar padrão – PCA (Difco), com incubação a 35°C/48 horas e a 7°C/10 dias respectivamente (SILVA et al., 2007). Os psicrotróficos proteolíticos foram determinados em ágar padrão – PCA (Difco) suplementado com 10% de leite em pó desnatado e incubação a 7°C/10 dias (FRANK et al., 1992). Todos os resultados das contagens foram expressos em \log_{10} UFC/mL.

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

2.4 Delineamento experimental

Neste trabalho empregou-se um planejamento fatorial 2^3 completo, com repetição em triplicata no ponto central. Os fatores avaliados foram pH de acidificação (X_1), tempo (X_2) e temperatura (X_3) de armazenamento do leite acidificado em dois níveis de variação. Na Tabela 1 estão apresentadas as variáveis (fatores) exploradas neste trabalho com seus respectivos níveis. As respostas avaliadas (variáveis dependentes) foram contagem de mesófilos (Y_1), psicrotróficos (Y_2), psicrotróficos proteolíticos (Y_3) e viscosidade (Y_4). O seguinte modelo linear foi utilizado para a análise estatística:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

onde: Y = resposta, X_1 = pH, X_2 = tempo (dias), X_3 = temperatura (°C) e $b_0 \dots b_{123}$ = coeficientes de regressão.

A Tabela 2 representa a matriz do planejamento fatorial completo com valores reais e codificados e com repetição em triplicata no ponto central.

Tabela 1 Especificação das variáveis e da região experimental

Variáveis independentes	Nível		
	-1	0	+1
X_1 - pH	5,8	6,1	6,4
X_2 - Tempo (dias)	0	5	10
X_3 - Temperatura (°C)	5	7,5	10

Tabela 2. Delineamento fatorial 2^3 completo, com repetição em triplicata no ponto central, com valores codificados e reais

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

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Os resultados das variáveis dependentes também foram tratados por análise de regressão múltipla da metodologia de superfície de resposta. A ANOVA foi aplicada para testar a adequação dos modelos lineares e a significância

cia da regressão foi observada pelo coeficiente de determinação. Além disso, para se visualizar o efeito das variáveis independentes nas respostas avaliadas foram construídos gráficos de superfície de resposta.

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 encontram-se as contagens de mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos e valores de viscosidade de cada tratamento. A contagem inicial de mesófilos foi de 3,85 log₁₀ UFC/mL e situou-se abaixo do estipulado pela IN 51 de 2002 do MAPA, que estabelece uma contagem máxima de 7,5 x 10⁵ UFC/mL ou 5,88 log₁₀ UFC/mL para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Hartmann (2009) encontrou contagem média de 6,33 log₁₀ UFC/mL em leites da re-

gião oeste do Paraná e Sanvido (2007) obteve 3,87 log₁₀ UFC/mL em seu estudo.

A contagem inicial de psicrotróficos foi de 2,59 log₁₀ UFC/mL. Valores superiores foram obtidos por Moura (2008) que encontrou contagens médias de 6,2 log₁₀ UFC/mL em leites coletados de diferentes laticínios do estado de Alagoas. Lorenzetti (2006) também encontrou altas contagens de psicrotróficos sendo de 8,99 log₁₀ UFC/mL para amostras de leite da região de Curitiba e 6,16 log₁₀ UFC/mL para amostras da região do Alto Vale de Santa Catarina. Já Nörnberg et al. (2009) encontraram valores médios de 6,0 e 6,5 log₁₀ UFC/mL de bactérias psicrotróficas em diferentes laticínios do Rio Grande do Sul.

A contagem inicial de psicrotróficos proteolíticos foi de 1,67 log₁₀ UFC/mL, valor inferior ao encontrado por Cardoso (2006) e Aaku et al. (2004) que obtiveram 6,04 e 2 a 5 log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

No tempo inicial (tempo 0) não houve

Tabela 3 – Contagem de mesófilos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos e medida de viscosidade do leite cru (controle) e leite cru carbonatado, com seus respectivos desvios-padrão.

Ensaio	Y1	Redução		Y2	Redução		Y3	Redução		Y4
		Y1	Y2		Y2	Y3		Y3	Y4	
log ₁₀ UFC/mL										
cP										
C12	3,85 (0,004) ^e			2,59 (0,16) ^f			1,67 (0,52) ^f			1,636 (0,004) ^c
1	3,56 (0,33) ^e	0,30		2,30 (0,43) ^f	0,29		1,69 (0,12) ^f	*		1,615 (0,008) ^c
2	3,78 (0,44) ^e	0,07		2,74 (0,06) ^f	*		2,53 (0,27) ^e	*		1,621 (0,004) ^c
C34	7,36 (0,02) ^{ab}			6,45 (0,08) ^a			6,04 (0,19) ^a			1,688 (0,007) ^b
3	5,75 (0,08) ^d	1,61		4,45 (0,10) ^{de}	2,00		4,48 (0,20) ^{cd}	1,56		1,719 (0,007) ^a
4	7,29 (0,09) ^b	0,06		6,04 (0,03) ^{ab}	0,41		5,93 (0,04) ^a	0,04		1,716 (0,013) ^a
C56	3,85 (0,004) ^e			2,59 (0,16) ^f			1,67 (0,52) ^f			1,636 (0,004) ^c
5	3,56 (0,33) ^e	0,30		2,30 (0,43) ^f	0,29		1,69 (0,12) ^f	*		1,615 (0,008) ^c
6	3,78 (0,04) ^e	0,07		2,74 (0,06) ^f	*		2,53 (0,27) ^e	*		1,621 (0,004) ^c
C78	8,01 (0,08) ^a			6,68 (0,09) ^a			6,21 (0,13) ^a			1,587 (0,004) ^d
7	7,31 (0,08) ^b	0,70		5,44 (0,14) ^{bc}	1,23		4,00 (0) ^d	1,21		1,638 (0,007) ^c
8	7,54 (0,32) ^{ab}	0,47		5,96 (0,02) ^{ab}	0,72		5,66 (0,08) ^{ab}	*		1,586 (0,004) ^d
C91011	6,45 (0,12) ^c			5,95 (0,02) ^{ab}			5,97 (0,07) ^a			1,625 (0,004) ^c
9	5,58 (0,16) ^d	0,87		3,92 (0,32) ^e	2,03		4,15 (0,21) ^d	1,82		1,624 (0,015) ^c
10	5,92 (0,10) ^{cd}	0,53		4,63 (0,05) ^{de}	1,33		4,47 (0,01) ^{cd}	1,49		1,614 (0,011) ^{cd}
11	6,09 (0,06) ^{cd}	0,36		4,85 (0,21) ^{cd}	1,10		5,09 (0,07) ^{bc}	0,87		1,637 (0,015) ^c

Y1 – Mesófilos; Y2 – Psicrotróficos; Y3 – Psicrotróficos proteolíticos; Y4 – Viscosidade; * não houve redução na contagem bacteriana; C12 – Controle das amostras 1 e 2; C34 – Controle das amostras 3 e 4; C56 – Controle das amostras 5 e 6, C78 – Controle das amostras 7 e 8, C91011 – Controle das amostras 9, 10 e 11.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

influência ($p > 0,05$) da acidificação na contagem de mesófilos e psicotróficos, ou seja, os ensaios 1, 2, 5 e 6 foram estatisticamente iguais aos seus respectivos controles (C12 e C56). Ma et al. (2003) também relataram este fato em seu trabalho, indicando que o efeito inibitório do CO_2 ocorreu durante a estocagem sob refrigeração e não logo ao ser adicionado ao leite. Para os psicotróficos proteolíticos não foi observado este fato e as contagens foram maiores ($p < 0,05$) que os controles.

Após 10 dias de armazenamento o tratamento em pH 5,8 e temperatura de 5°C (ensaio 3) mostrou-se mais eficiente na redução da contagem microbiana sendo de 1,61 logaritmos para mesófilos, 2 logaritmos para psicotróficos e 1,56 logaritmos para psicotróficos proteolíticos. Na temperatura de armazenamento de 10°C (ensaio 7) observaram-se reduções ($p < 0,05$) para mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos, sendo de 0,7, 1,23 e 1,21 logaritmos respectivamente. Resultados próximos a este trabalho foram observados por Ruas-Madiedo et al. (1996), que obtiveram uma redução de 1 a 1,5 logaritmos para a contagem de mesófilos em leite acidificado com CO_2 . Já Roberts & Torrey (1988) constataram uma redução de 3,4 logaritmos no desenvolvimento de psicotróficos em leite cru acidificado e armazenado a 7°C. Ma et al. (2003) relataram que houve uma diminuição de 1 a 2 logaritmos na contagem de mesófilos e de 2 ciclos logaritmos na de psicotróficos após 21 dias de armazenamento a 4°C. Espie & Madden (1997) observaram que a utilização de 30 e 45 mM/L de CO_2 foi efetiva na inibição do crescimento de psicotróficos, quando o leite foi armazenado a 6°C por 7 dias. SIERRA et al., (1996) ao reduzir o pH do leite cru de 6,8 para 6,0 através da adição de CO_2 verificou redução de 1,41 ciclos logaritmos no crescimento de psicotróficos após 4 dias de armazenamento a 7°C.

A acidificação em pH 6,4, após 10 dias de armazenamento, não proporcionou efeito inibitório ($p > 0,05$) sobre os microrganismos estudados (ensaios 4 e 8), indicando

que as temperaturas de armazenamento (5 e 10 °C) não influenciaram ($p > 0,05$) na contagem dos microrganismos.

Com relação à viscosidade verificou-se que logo após a adição de CO_2 não houve alteração desta propriedade, pois todos os ensaios foram estatisticamente iguais aos seus respectivos controle. Observa-se que os ensaios 3, 4 e 7 diferiram ($p < 0,05$) de seus respectivos controles, aumentando a viscosidade do leite. Poucos trabalhos relatam a influência da acidificação sobre a variação da viscosidade do leite cru. No entanto estudos empregando o leite UHT indicam que há um aumento considerável na viscosidade durante o período de estocagem (VIDAL-MARTINS et al., 2005; MELO JUNIOR, 2005). Estes autores enfatizam que o aumento da viscosidade é decorrente da atividade de enzimas extracelulares e termorresistentes, particularmente proteases, produzidas por bactérias psicotróficas contaminantes do leite antes do processamento térmico. No presente trabalho as contagens iniciais de todos os microrganismos foram baixas e mesmo durante a estocagem refrigerada os microrganismos não foram capazes de se desenvolverem a ponto de causar mudanças significativas. Cousin (1982) ainda relata que a atividade proteolítica e lipolítica não é significativa quando a contagem de psicotróficos não excede 6 \log_{10} UFC/mL. Com isso pode-se concluir que como a contagem de psicotróficos manteve-se abaixo de 6 \log_{10} UFC/mL não foi possível obter variações significativas na viscosidade e que esta propriedade está diretamente ligada com a contagem inicial de bactérias psicotróficas do leite.

3.1 Superfície de resposta

Na Tabela 4 estão apresentados os coeficientes de regressão dos modelos propostos e a análise de variância (ANOVA) para as respostas mesófilos, psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e viscosidade.

De acordo com a ANOVA todos os modelos das respostas mesófilos, psicotróficos e viscosidade apresentaram coeficiente de

Tabela 4. Coeficientes de regressão e análise de variância do modelo para cada resposta.

Coeficientes	Mesófilos (Y1)	Psicrotróficos (Y2)	Proteolíticos (Y3)	Viscosidade (Y4)
b ₀	5,46*	4,12*	3,84*	1,64*
b ₁	0,28	0,37	0,59	-0,005
b ₂	1,65*	1,48*	1,45*	0,02*
b ₃	0,22	0,11	-0,09	-0,03*
b ₁₂	0,16	0,15	0,17	-0,008
b ₁₃	-0,16	-0,14	0,02	-0,006
b ₂₃	0,22	0,11	-0,09	-0,03*
b ₁₂₃	-0,16	-0,14	0,03	-0,006
Falta de ajuste	0,09	0,29	0,09	0,17
R ²	0,97	0,95	0,88	0,95

Nota: * significativo em nível de 5%.

determinação (R²) maior que 0,95 e segundo Barros Neto et al. (2007), este é um dos requisitos para que o modelo seja considerado bom. Observou-se também que a falta de ajuste para todas as respostas não foram significativas ($p > 0,05$) indicando que se ajustaram bem aos dados experimentais, podendo ser utilizado para fins preditivos.

Para todos os microrganismos estudados apenas o tempo foi significativo ($p < 0,05$) e para a construção dos gráficos considerou-se então somente esta variável. Já para a viscosidade, o tempo e a temperatura foram significativos ($p < 0,05$) e também houve efeito de interação entre essas duas variáveis. Os gráficos de superfície de resposta (Figuras 1 a 4) foram construídos fixando-se as condições experimentais do ponto central, ou seja, pH 6,1, tempo de 5 dias e temperatura de 7,5°C.

Nas Figuras 1, 2 e 3 observou-se claramente o efeito significativo ($p < 0,05$) do tempo no desenvolvimento dos microrganismos. Além disso, estes três gráficos apresentaram tendência de resposta semelhante. Izidoro (2008) estudou o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento do leite cru sobre a multiplicação de psicrotróficos. O autor observou em seus experimentos que a contagem de microrganismos psicrotróficos foi maior no leite incubado a 12°C em relação ao leite armazenado a 8°C, que por sua vez, foi maior do que aquele incubado a 4°C. Ha-

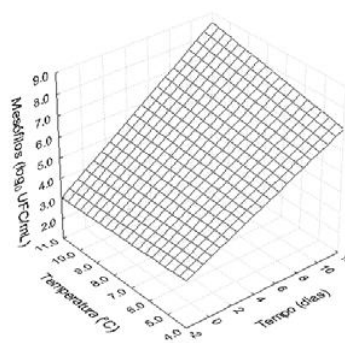


Figura 1. Gráfico de superfície de resposta para a contagem de mesófilos em função da temperatura e do tempo em pH 6,1.

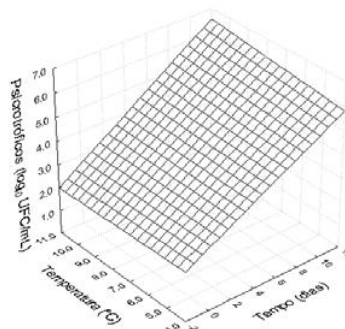


Figura 2. Gráfico de superfície de resposta para a contagem de psicrotróficos em função da temperatura e do tempo em pH 6,1.

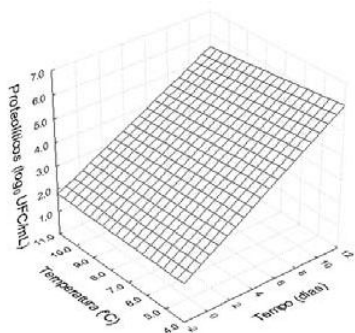


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta para a contagem de psicrotróficos proteolíticos em função da temperatura e do tempo em pH 6,1.

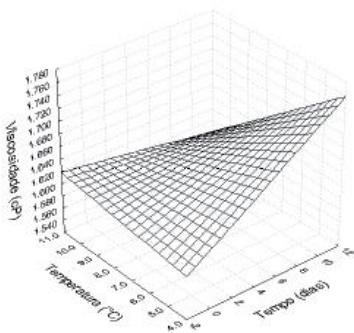


Figura 4. Gráfico de superfície de resposta para viscosidade em função da temperatura e do tempo em pH 6,1.

ryani et al. (2003), também constataram que o aumento na temperatura de armazenamento do leite aumentou consideravelmente a taxa de crescimento de psicrotróficos. No entanto, para o leite acidificado com CO₂ não foi verificado o efeito da temperatura quando este foi avaliado juntamente com a variável tempo.

Martin et al. (2003) sugerem que o dióxido de carbono age prolongando a fase lag e diminuindo a taxa de crescimento de microrganismos, sendo que o efeito inibitório é mais pronunciado em bactérias Gram negativas. Ma et al. (2003) indicam que o mecanismo de inibição microbiano está diretamente as-

sociado com o dióxido de carbono e não com o efeito da redução do pH ou substituição do oxigênio. Alguns efeitos diretos exercidos pelo dióxido de carbono incluem a sua habilidade de mudar a propriedade da membrana microbiana, diminuir o pH intracelular e interferir nas reações enzimáticas.

Na Figura 4 nota-se a elevação nos valores de viscosidade com o tempo e com a diminuição da temperatura. O comportamento diferenciado deste gráfico em relação aos demais (Figuras 1, 2 e 3) se deve ao efeito significativo de interação entre as variáveis tempo e temperatura como já apresentado na Tabela 5.

4 CONCLUSÃO

A carbonatação do leite cru em pH 5,8 inibiu o crescimento de mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em mais de 1 log₁₀ UFC/mL independente da temperatura de armazenamento.

A viscosidade do leite cru não foi afetada logo após a acidificação. A alteração da mesma durante o armazenamento refrigerado em alguns ensaios pode estar correlacionado com o aumento da contagem dos microrganismos pesquisados.

A carbonatação do leite pode ser uma alternativa viável para aumentar o tempo útil do leite cru durante o armazenamento refrigerado.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of carbonation on the growth of microorganism and viscosity of raw milk during refrigerated storage. A Full Factorial Design 2³ was applied to evaluate the effect of pH (between 5,8 to 6,4), time (between 0 to 10 days) and temperature (between 5 to 10°C) storage of carbonated raw milk face of responses psychrotrophic, proteolytic psychrotrophic, mesophilic and viscosity. The results showed that after 10 days the carbonation at pH 5,8 inhibited the growth of all microorganism examined independent of storage temperature. The viscosity was not changed after the carbonation, but during

cold storage an increase was observed in the values of this property. The response surface models were adequate to predict the mesophilic and psychrotrophic counts and viscosity measurement, because the lack of fit was not significant and the coefficient of determination (R^2) was greater than 0,95.

Index-terms: microbiology; CO_2 ; factorial design; conservation.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw milk with CO_2 . **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 200, p. 293-296, 1995.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.172, p.8-13, 20 set. 2002 a. Seção I.

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

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

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

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

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

GEVAUDAN, S.; LAGAUDE, A.; TARODO DE LA FUENTE, B.; CUQ, J.L. Effect of treatment by gaseous carbon dioxide on the colloidal phase of skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1713-1721, 1996.

GUILHAUME, C.; GASTALDI, E.; CUQ, J.L.; MARCHESSEAU, S. Rennet-induced gelation of calcium and phosphate supplemented skim milk subjected to CO_2 treatment, **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3209-3216, 2004.

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

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

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

- IZIDORO, T. B. **Efeito da multiplicação de microrganismos psicrotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.
- LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition on raw milk on proteolysis and lipolysis at 4 °C. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1616-1631, 2003.
- MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1932-1940, 2003.
- MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicrotróficos na sedimentação e gelificação do leite UHT.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- MOURA, A. C. S. **Caracterização da qualidade do leite cru refrigerado produzido em municípios do estado de Alagoas,** Brasil. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, p.24-32, 1996.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; BELOTI, V., FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Raw Milk Produced in Brazil: Occurrence and Interference of Indigenous Microbiota in their Isolation and Development. **Zoonoses Public Health**, v.55, n.6, p.299-305, 2008.
- NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.2, p.157- 163, 2009.
- PINTO, C.J.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- RAOUCHE, S.; DOBENESQUE, M.; BOT, A.; CUQ, J. L.; MARCHESSEAU, S. Stability of casein micelles subjected to CO₂ reversible acidification: Impact of carbonation temperature and chilled storage time. **International Dairy Journal**, v.18, p.221-227, 2008.
- RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J. C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; DELLANO, D. G.; REYES-GAVILÁN, C. G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: a pilot-scale study, **Journal of Food Protection**, v.59, n.5, p.502–508, 1996.
- RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A.F.; BADA-GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILÁN, C. G. Influence of Carbon Dioxide addition to raw Milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw milk and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1552-1555, 1998.
- ROBERTS, R. F.; TORREY G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.52–60, 1988.

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

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de méto-**

dos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 3 ed, 2007. 552p.

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa de estudo, o CNPq pelo recurso financeiro aprovado para realização deste trabalho e a Fazenda Experimental do Canguiri da UFPR por gentilmente conceder as amostras de leite cru.