

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ALINE SCHMIDT PALHANO

**INATIVAÇÃO MICROBIANA EM LEITE CRU REFRIGERADO PELO MÉTODO
DE TERMO-SONICAÇÃO**

MEDIANEIRA

2020

ALINE SCHMIDT PALHANO

**INATIVAÇÃO MICROBIANA EM LEITE CRU REFRIGERADO PELO MÉTODO
DE TERMO-SONICAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Coordenação do curso superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - Câmpus Medianeira, como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Me. Fábio Avelino Bublitz Ferreira

Co-orientador: Dr. Valdemar Padilha Feltrin

MEDIANEIRA

2020



TERMO DE APROVAÇÃO

Título do Trabalho:

**INATIVAÇÃO MICROBIANA EM LEITE CRU REFRIGERADO PELO MÉTODO DE
TERMO-SONICAÇÃO**

Alunos: Aline Schmidt Palhano

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado às 09:00 horas do dia 27 de novembro de 2020 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Professor: Me. Fábio Avelino Bublitz
Ferreira
UTFPR – Câmpus Medianeira
(Orientador)

Professor: Dr. Valdemar
Padilha Feltrin
UTFPR – Câmpus Medianeira
(Co-orientador)

Professora: Eliana Maria Baldissera
UTFPR – Câmpus Medianeira
(Convidada)

Professora: Cristiane Canan
UTFPR – Câmpus Medianeira
(Convidada)

Prof^o. Me. Fábio Avelino Bublitz Ferreira
UTFPR – Câmpus Medianeira
(Responsável pelas atividades de TCC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela conclusão deste trabalho, por Sua inspiração e ajuda nos momentos difíceis desta caminhada, por ter me impulsionado a não desistir e por ter me fortalecido a continuar sem esmorecer, mesmo diante dos desafios.

Agradeço à minha família pelo apoio em todo tempo, pelo incentivo e paciência, pela abnegação quando necessário em prol do término deste trabalho.

Agradeço aos meus professores da graduação por dedicarem suas vidas ao ensino, em especial ao meu orientador Me. Fábio Avelino Bublitz Ferreira por toda a paciência, perseverança, dedicação, auxílio e por acreditar em mim e em meu trabalho, agradeço também ao meu co-orientador Dr. Valdemar Padilha Feltrin, por toda ajuda, orientação e conselho prestado neste período e também à Profa. Dra. Cristiane Canan por me inspirar e ajudar a não desistir nos momentos difíceis, agradeço também à todos os profissionais desta universidade que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço às minhas amigas e colegas de curso por torcerem por mim, por sempre estarem prontas a ajudar, aconselhar e por terem sido apoio e conforto fundamental em todo o tempo.

RESUMO

Considerando o alto consumo do leite e sua importância na alimentação, tecnologias alternativas têm sido estudadas com o objetivo de auxiliar as já existentes no que diz respeito à inativação microbiana. O presente estudo teve por objetivo verificar a eficiência da inativação microbiana, utilizando a termo-sonicação aplicando-a ao leite cru refrigerado, sendo posteriormente realizadas análises para quantificação de Enterobactérias, Coliformes à 35 °C e Contagem Padrão em placas. Para a realização deste estudo, foram utilizadas amostras de leite cru refrigerado adquiridas de produtores. As amostras foram tratadas em copo encamisado, este por sua vez foi inserido do banho ultrassônico, tendo um banho termostatizado como fonte de calor, sendo as análises realizadas antes e após o tratamento de termo-sonicação. O trabalho se caracterizou por um planejamento fatorial completo, de três níveis (0, 10 e 20 minutos; 15, 35 e 55 °C) e dois fatores (tempo e temperatura), totalizando nove tratamentos. Com os resultados obtidos observou-se que não houve diferença estatística entre as contagens de Enterobactérias para o leite cru refrigerado e para o leite submetido à termo-sonicação, com exceção do tratamento F (35 °C/20 min) que apresentou contagem significativamente superior aos demais tratamentos. Tal resultado também não se adequou ao limite de contagem da Instrução Normativa nº 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; já os tratamentos que utilizaram 55 °C (I, G e H), independente do tempo de tratamento, apresentaram contagens dentro do limite estabelecido pela legislação vigente, entretanto, estatisticamente estes tratamentos não se diferiram de outros tratamentos realizados no estudo. Os testes rápidos de Contagem padrão em placas e Coliformes à 35 °C, apresentaram resultados que excederam o limite estabelecido pelas legislações vigentes, antes e após tratamento de termo-sonicação.

Palavras-chave: Métodos de conservação. Ultrassom. Conservação de alimentos. Microbiologia dos laticínios. Pasteurização do leite. Contaminação do leite.

ABSTRACT

Considering the high milk consumption and its importance in the diet, alternative technologies have been studied in order to help the already existing in regards to microbial inactivation. The present study aimed to verify the efficiency of microbial inactivation through thermal-sonication in refrigerated raw milk, with further quantification of *Enterobacteria*, Coliforms at 35° C and Standard plate count. The refrigerated raw milk samples were acquired from rural producer. The samples were treated in a jacket glass Beaker, which was inside an ultrasonic bath containing a thermostatic bath as a heat source; the analysis were conducted before and after the thermo-sonication treatment. The work was characterized as a full factorial design of three levels (0, 10 and 20 minutes; 15, 35 and 55° C) and two factors (time and temperature), totalizing nine experiments. The obtained results showed that there were no statistical differences between the *Enterobacteria* count of refrigerated raw milk and thermo-sonicated milk, except for treatment F (35° C/20 minutes), that exhibited a significantly higher count in comparison to other treatment conditions, and such result did not fit the count limit of Normative Instruction n° 76 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. However, treatment regimens I, G and H (all executed at 55° C), regardless of the time, had a count within the limit established by current legislation, but these treatments had no statistical meaning when compared to the other treatments performed at this research. The results of the rapid tests for Standard plate count and Coliforms at 35° C exceed the established limit by current legislation as well, before and after the thermo-sonication treatment.

Keywords: Conservation methods. Ultrasound. Food conservation. Dairy microbiology. Milk pasteurization. Milk contamination.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Banho ultrassônico	13
FIGURA 2 - Sistema de tratamento ultrassônico com banho termostatizado	16
FIGURA 3 - Sistema de tratamento por termo-sonicação	17
FIGURA 4 - Teste em laminocultivo Nutrilab E	18
FIGURA 5 - Contagem modelo para o Nutrilab E	19
FIGURA 6 - Médias para contagem de enterobactérias em leite cru refrigerado submetido à tratamento de termo-sonicação	22
FIGURA 7 - Gráfico de contorno para contagem de enterobactérias em leite cru refrigerado submetido à tratamentos de termo-sonicação	23
FIGURA 8 - Comparação de médias das análises de coliformes à 35 °C, enterobactérias e Contagem padrão em placas	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Planejamento experimental aleatorizado para tratamento de termo-sonicação do leite cru refrigerado	17
TABELA 2 – Contagem de Enterobactérias em leite cru refrigerado com e sem tratamento de termo-sonicação	20
TABELA 3 – Contagem de Coliformes à 35 °C e Contagem padrão em placas em leite cru refrigerado submetido à tratamento de termo-sonicação	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 O LEITE	4
3.1.1 Microflora do leite	6
3.1.2 Bactérias de interesse	7
3.2 O ULTRASSOM	10
3.2.1 O Ultrassom na inativação microbiana	11
3.2.2 Banho ultrassônico	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 MATERIAL	15
4.2 MÉTODOS	15
4.2.1 Preparo de meios	15
4.2.2 Tratamento do leite	15
4.2.3 Análises microbiológicas	17
4.2.4 Tratamento dos dados	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
5.1 CONTAGENS DE ENTEROBACTÉRIAS, COLIFORMES À 35 °C E CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS	20
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Da década de 60 até o ano de 2017, o consumo de leite no Brasil aumentou significativamente, de uma estimativa de 75 litros por habitante por ano, para 166 litros por habitante por ano, tal crescimento de consumo tem por motivo mudanças nos hábitos de consumo, aumento do poder aquisitivo da população e na crescente garantia de qualidade do produto (VILELA et al., 2017); do ano de 2017 ao ano de 2019 o consumo de leite per capita no Brasil subiu para 170 litros por habitante (LEITE; RESENDE; STOCK, 2019). A ingestão tanto do leite quanto de seus derivados é altamente recomendada pois possuem grande valor nutricional, proveniente de proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais, do qual o mais importante é o cálcio, que forma a estrutura óssea do organismo, sendo o leite, a principal fonte alimentar deste mineral (SBAN, 2015).

Para que o leite apresente qualidade dentro do esperado para o consumo, ele é submetido à tratamentos térmicos, que tem por objetivo destruir microrganismos e enzimas que o tornariam impróprio para o consumo e confeririam aromas e sabores indesejados para o consumidor; no entanto tais tratamentos térmicos podem eventualmente causar perda de nutrientes e desenvolvimento de *flavour* indesejado, por isto novas tecnologias estão sendo estudadas para preservar características nutricionais e ao mesmo tempo eliminar microrganismos, que substituam a pasteurização e esterilização térmica e garantam a vida de prateleira e qualidade do produto, além de apresentar pouco consumo de energia, custo de produção competitivo e respeito ao meio ambiente. O uso do ultrassom com este fim específico é uma tecnologia recente e promissora, pois rompe as células microbianas e desnatura enzimas (ultrassom de alta intensidade), além de modificar o metabolismo dos microrganismos (ultrassom de baixa intensidade); o uso desta tecnologia, se combinado com o uso de calor (termossonicação), pressão (manossonicação), pressão e calor (manotermossonicação) ou ainda radiação ultravioleta, denominada de fotossonicação (ŞENGÜL et al., 2011), pode diminuir a duração e intensidade do tratamento térmico do leite, que resulta em um menor impacto nas características nutricionais e sensoriais do produto (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018).

Estudos mostraram que o uso do ultrassom combinado com a radiação ultravioleta na inativação microbiana traz resultados significativos na redução do crescimento exponencial de microrganismos, como a diminuição de 3,29 log de bactérias totais e 5,31 log de coliformes, usando fotossonicação com três lâmpadas UV (24 kHz, 65°/30min) em leite cru (ŞENGÜL et

al., 2011). Foi observada ainda a diminuição de 5,3 log de *Listeria innocua* e bactérias mesofílicas com o uso da termossonicação (24 kHz, 63 °C/30 min) em leite cru (BERMÚDEZ-AGUIRRE et al., 2009). Outro estudo ainda avaliou a capacidade de inativação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Debaryomyces hansenii*, que foram inoculados em leite cru e tratados com diferentes tempos de sonicação (50, 100, 200 e 300 segundos) e amplitude de onda (70 e 100%), obtendo-se como resultado a maior redução de log (4,61 para *D. hansenii*, 2,75 para *P. fluorescens*, 2,09 para *E. coli* e 0,55 para *S. aureus*) em 300 segundos e 100% de amplitude, com frequência de 24 kHz. Contudo, além da redução decimal da população microbiana, também foi observado neste estudo a deterioração de características sensoriais do produto após tratamento com ultrassom, usando este mesmo tempo e amplitude (MARCHESINI et al., 2015). O objetivo do presente trabalho portanto, foi averiguar a eficiência que o uso do ultrassom tem na inativação microbiana do leite cru refrigerado, realizando a contagem de enterobactérias, antes e após tratamento do leite com ultrassom em diferentes condições de termo-sonicação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficiência do tratamento por termo-sonicação na inativação microbiana no leite cru refrigerado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a análise microbiológica de Enterobactérias em leite cru refrigerado e leite tratado por termo-sonicação, em diferentes condições experimentais;
- Realizar o teste em laminocultura Nutrilab E, para determinação da presença de coliformes a 35° C e Contagem padrão em placas em leite cru refrigerado submetido a diferentes condições de termo-sonicação;
- Comparar os resultados obtidos a partir das análises microbiológicas com os parâmetros definidos pela legislação brasileira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O LEITE

Um dos alimentos considerados mais completos, ricos no quesito nutricional e de grande importância para a saúde tanto de adultos como de crianças é o leite, pois é composto por proteínas de alto valor biológico, carboidratos, vitaminas e minerais como o cálcio, importante para a saúde dos ossos (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

No Brasil o produto foi introduzido com a chegada das primeiras vacas europeias, no ano de 1532 através de Martín Afonso de Souza; contudo a atividade leiteira só foi observada pela primeira vez no ano de 1641. A modernização para o setor leiteiro no país só chegou na década de 1950, com a aprovação do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal (Riispoa), assinado por Getúlio Vargas; através deste decreto o produto se tornou mais seguro biologicamente para o consumo, pois tornou-se obrigatória a pasteurização do mesmo. Entre os anos de 1975 e 1985 a produção nacional de leite subiu de 7,9 milhões de toneladas para 12 milhões; a procura maior do consumidor pelo produto incentivou o setor a buscar por melhorias, que vieram na década de 90 onde a cadeia produtiva passou por transformações que possibilitaram a adequação da qualidade do leite brasileiro com o padrão do leite internacional, isso foi possível com a implantação da Portaria número 56/1999, do Ministério da Agricultura; ainda com relação ao crescimento da produção no país, do ano de 1961 ao ano de 2015 a produção aumentou em 30 milhões de toneladas de leite, com um aumento médio anual de 555 mil toneladas (VILELA et al., 2017); do ano de 2016 até o ano de 2018 a produção de leite no Brasil subiu de 23,17 bilhões de litros para 24,46 bilhões de litro (DA ROCHA; CARVALHO, 2019), e no ano de 2019, em comparação ao ano anterior, houve um crescimento de 2,3% na produção de leite, fechando em um volume de 25,1 bilhões de litros (ANUÁRIO LEITE, 2020).

No país, no ano de 2018, o estado brasileiro com maior produção de leite foi o estado de Minas Gerais, com um total de 8,9 bilhões de litros produzidos, em segundo lugar nesta lista está o Paraná, que atingiu uma produção anual de 4,3 bilhões de litros, seguido do Rio Grande do Sul, com 4,2 bilhões de litros produzidos; quanto às regiões, no mesmo ano, a que apresentou maior produção foi a região Sul, com 11,5 bilhões de litros, seguido das regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Norte (ZOCCAL, 2020).

No ano de 2018, houve a revogação das Instruções Normativas 51/2002, 62/2011,

07/2016 e 31/2018, que foram substituídas pelas Instruções Normativas 76 e 77, publicadas pelo MAPA em 26 de novembro de 2018; a IN 76 aprovou os regulamentos técnicos para o padrão de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, pasteurizado e tipo A (BRASIL, 2018), já a IN 77 estabeleceu os critérios para produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no sistema de inspeção oficial; a mudança proposta pelas novas Instruções Normativas é a de simplificar a maneira com que se entende as exigências da qualidade do leite e os prazos que os produtores terão para se qualificarem para tal cumprimento (BRASIL, 2018).

Nutricionalmente, o leite é composto por carboidratos, dos quais o mais relevante é a lactose, que auxilia na absorção de minerais pelo intestino; lipídeos, que tem importância no transporte de vitaminas lipossolúveis e conforme o seu teor presente origina a classificação de leite integral (mínimo total de 3%), semidesnatado (entre 0,6 e 2,9%) e desnatado (máximo total de 0,5%); é composto também por proteínas de alto valor biológico, ou seja, contém aminoácidos essenciais para suprir a necessidade do organismo humano; proteínas estas que são divididas em solúveis e não solúveis, das quais as caseínas representam um total de 80% e os outros 20% são compostos por proteínas do soro do leite, que são as α -lactoalbuminas e β -lactoglobulinas; o leite apresenta ainda em sua composição vitaminas como a A e do complexo B e minerais como fósforo, zinco, selênio, magnésio e o mais importante, o cálcio, que está presente no leite em uma média de 1200 miligramas por litro, portanto o seu consumo tem vinculação direta com a densidade óssea da população (SBAN, 2015); os parâmetros físico-químicos de carboidratos e proteínas para o leite cru, pasteurizado e destinado à beneficiação de processo UHT, são: 2,9 gramas de proteína total por 100 mL de leite e 4,3 gramas de lactose anidra por 100 mL de leite (BRASIL, 2018).

Usualmente, nas indústrias, o leite passa por processos térmicos, que por sua vez tem por objetivo conferir estabilidade microbiológica e da emulsão do produto; contudo, causam transformações químicas e nutricionais, como a desnaturação de proteínas importantes, como as albuminas e globulinas, que são sensíveis termicamente e são parte importante no que diz respeito à estabilidade da emulsão gordura-água do leite; tratamentos térmicos agressivos como as utilizadas no método UHT, do inglês, *ultra high temperature*, que emprega temperaturas iniciais de 73 à 75 °C por 15 segundos e posteriores de 130 à 150 °C por 2-4 segundos, que se não forem controladas adequadamente, podem promover além da desnaturação proteica por si só, consequências desta desnaturação, como a formação de sedimentos, perda do valor nutricional e também alterações nos carboidratos, como a reação de Maillard e de Caramelização, tais reações provocam alterações sensoriais no leite, na cor,

aroma e sabor (MARTINS et al., 2008). A temperatura aplicada ao leite também é fator determinante em sua qualidade sanitária, pois o leite cru possui uma carga microbiana altíssima, de até 600.000 UFC/mL, se refrigerado (MENEZES et al., 2014) e por ação da temperatura empregada nos tratamentos térmicos, tem sua carga microbiana diminuída, com o objetivo de atender aos limites estabelecidos pela ANVISA, apresentados na Resolução n° 331 de 23 de Dezembro de 2019 e no Artigo n° 540 do título oito do RIISPOA (BRASIL, 2019).

3.1.1 Microflora do leite

A microbiota do leite cru é determinada por diversos fatores, como a contaminação proveniente da glândula mamária do bovino e da adquirida durante a ordenha, através dos equipamentos, ordenhador e dos tetos e úbere do animal, portanto fatores como a saúde do animal, instalações com estrutura adequada para abrigar o animal, higiene do ordenhador e boas práticas de manejo são determinantes para que o leite obtido seja adequado do ponto de vista microbiológico. Outro parâmetro que reflete diretamente na carga microbiana do leite é a temperatura (MENEZES et al., 2014), por isto, segundo a Instrução Normativa n° 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o leite cru refrigerado, deve ser conservado em uma temperatura de 4 °C até o momento de ser expedido para usina de beneficiamento, após expedido deve ser mantido refrigerado de 7-9 °C até o seu recebimento e deve ser mantido em refrigeração, na temperatura de 4 °C para preservar a qualidade do mesmo, até que ele seja beneficiado (BRASIL, 2018).

Fazem parte da microbiota do leite tanto microrganismos benéficos como deterioradores e também patogênicos, mesmo com cuidados higiênicos e de boas práticas, o leite cru ainda possui uma carga microbiana alta, que pode ir de 1.000 à 1.000.000 de UFC.mL⁻¹, sendo considerado um leite com condições higiênicas insatisfatórias aquele que tiver uma contagem bacteriana total acima de 100.000 UFC.mL⁻¹. A contaminação do leite cru provém de três fontes, do interior e do exterior do úbere e dos equipamentos utilizados nos laticínios; os quais são melhor detalhados a seguir:

- Interior do úbere: Os microrganismos encontrados no interior do úbere podem ser Gram-negativos e Gram-positivos esporulados ou não, contudo estão em menor quantidade que os *Micrococcus*, *Streptococcus* e bactérias corineformes; microrganismos adicionais podem estar presentes caso o animal se apresente doente, como *Micobacterium tuberculosis* e brucelas;

- Exterior do úbere: O exterior dos tetos podem se apresentar sujos no momento da ordenha, geralmente por esterco, terra, feno, ar (caso a ordenha não seja mecânica), estas fontes, quando controladas e realizadas as limpezas anterior e posterior à ordenha, podem representar uma redução brusca na contaminação do leite cru. No ar estão presentes bactérias como as corineformes, *Micrococcus* e alguns esporos de bactérias, que podem chegar a contaminar o leite caso a ordenha realizada for manual; este tipo de ordenha também oferece o risco de contaminação cruzada do leite, através do ordenhador, que pode representar um risco de contaminação por patógenos;
- Equipamentos e utensílios: Esta contaminação está associada diretamente à higiene realizada nos equipamentos de ordenha, armazenamento do leite e de utensílios usados durante o processo; os microrganismos mais comumente encontrados em equipamentos e utensílios mal higienizados e que representam contaminação para o leite cru são as bactérias lácticas, psicrotróficas e também alguns coliformes.

Além destes fatores, há um que representa um maior ponto de controle, crucial para o crescimento microbiano do leite cru, a temperatura; na ordenha a temperatura de saída do leite é favorável para o crescimento de uma gama abrangente de microrganismos, principalmente as bactérias mesófilas, que crescem em uma temperatura de 10 a 38 °C; por isso é necessário que ele seja imediatamente refrigerado, em uma temperatura de 7 °C. Mesmo realizando este resfriamento, os microrganismos podem continuar se multiplicando, neste caso com destaque para os psicrotróficos e bactérias lácticas (ORDOÑEZ, 2004).

3.1.2 Bactérias de interesse

Os microrganismos presentes no leite, majoritariamente são bactérias lácticas, mesófilas, psicrotróficas, termodúricas e em menor escala, bactérias patogênicas; alguns por possuírem β -galactosidade e P- β -galactosidade, metabolizam a lactose, outros sintetizam proteases e por isto degradam as proteínas e ainda outras sintetizam lipases, que agem sobre os lipídeos, degradando-os; a seguir serão abordados os principais grupos de microrganismos encontrados no leite e de interesse neste estudo.

- Bactérias psicrotróficas: Dentro desta classificação estão bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, que possui mais de 15 gêneros de microrganismos incluído, contudo, as que mais se destacam nesta classificação são: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*,

Acinetobacter e algumas enterobactérias, porém em menor proporção. Tais bactérias encontram um meio favorável de crescimento quando o leite é resfriado na pós ordenha e sintetizam enzimas que produzem efeitos indesejáveis ao leite; as bactérias pertencentes à este grupo são termolábeis, ou seja, são facilmente eliminadas com tratamentos térmicos, contudo, as enzimas proteases e lipases sintetizadas por algumas cepas, são resistentes aos tratamentos térmicos mais efetivos, sendo, segundo Ordoñez (2004), mais resistentes à temperatura que os esporos termo resistentes; esta característica das enzimas dá margem de ação à elas mesmo no produto já pronto, após processos térmicos, se as condições forem favoráveis (pH, temperatura) e isto terá reflexo na degradação das proteínas e lipídeos do leite, por sua vez, tais nutrientes, se degradados, alteram as características sensoriais e consequentemente a aceitação pelo consumidor;

- Bactérias lácticas: As bactérias pertencentes a este grupo agem no leite tanto de modo benéfico, como de modo deteriorador; através de sua capacidade de metabolizar a lactose, produzindo ácido láctico; com a produção de ácido láctico o pH do meio torna-se ácido, quando este chega próximo ao valor de 4,6 à uma temperatura ambiente, há a precipitação das caseínas. A degradação das caseínas, portanto, pode ser de interesse ou não para a indústria; de interesse para a produção de queijos e desinteressante para o leite comercializado, pois haveriam caseínas precipitadas no produto. Contudo o leite cru é o mais afetado, pois estas bactérias são abundantes nele, por serem em sua maioria mesófilas e termófilas; portanto para reduzir sua atividade no leite é necessário baixar a temperatura do leite até 8 ou 10 °C. Dentro desta classificação, as espécies mais importantes são: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; mais importantes pois estão em maior quantidade no leite, quando relacionada às demais espécies abrangidas na classificação e também porque o seu tempo de geração é mais curto no pH normal do leite, em torno de 6,8 (ORDOÑEZ, 2004). Dentro da classificação de bactérias lácticas está o gênero *Streptococcus*, que também é de grande importância; além dos motivos já citados acima, este gênero de bactérias, com algumas espécies naturalmente presentes nos tecidos mamários, como *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, podem ser agentes causadores de mastite bovina. A mastite é uma inflamação da glândula mamária, causada por infecção bacteriana e que tem suas consequências refletidas na produção e qualidade do leite cru; a enfermidade manifesta-se de duas maneiras: na forma clínica, onde o animal apresenta sintomas visíveis, como febre, inflamações visíveis da mama, depressão e falta de apetite; e na forma subclínica, onde o animal não aparenta sintomas da enfermidade, apenas apresenta alterações na composição do leite, esta segunda é mais frequente que a forma clínica da doença. A doença ainda pode ser

classificada de duas maneiras, segundo a origem da contaminação do tecido mamário sendo: mastite ambiental e mastite contagiosa; a forma ambiental de transmissão se dá através da ação de microrganismos cujo habitat é o ambiente de ordenha, entre as espécies abrangidas nesta classificação estão os *Streptococcus uberis*, *S. faecalis*, *S. faecium*, entre outros estreptococos e a transmissão se dá durante o período de ordenha, pois os microrganismos ficam na pele e tetos do animal, após contato com o feno contaminado; já na forma contagiosa de transmissão, as espécies de estreptococos envolvidos são *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* e são altamente contagiosos e obrigatórios na glândula mamária (SILVA et al., 2010);

- Bactérias mesófilas: Esta classificação abrange vários gêneros e espécies de microrganismos, que são indicadoras de qualidade e segurança nos alimentos de origem animal, por isto de grande importância; tais microrganismos crescem em uma faixa de temperatura de 10 a 45 °C, por crescerem em temperatura mais próxima à temperatura ambiente, a presença destes microrganismos no leite indicam se etapas como a de limpeza e desinfecção de equipamentos estão sendo realizadas de modo eficiente, indicam também se os tratamentos térmicos aplicados ao alimento estão sendo controlados e se o armazenamento e transporte do leite estão sendo realizados de forma correta (FERREIRA; LIMA; COELHO, 2014). Microrganismos mesófilos estão amplamente distribuídos na natureza e agrupam espécies e gêneros de bactérias que deterioram, de forma rápida o leite e também bactérias patogênicas veiculadoras de infecções e intoxicações alimentares (CLAUDINO-FILHO et al., 2015); dentre os deterioradores e patogênicos, podem ser citados as espécies *Staphylococcus aureus* que produz uma toxina, pré-formada no alimento, causadora de intoxicação alimentar, *Bacillus cereus* que igualmente é produtor de toxina, formada após a ingestão do alimento contaminado pelo microrganismo ou por seus esporos, causando duas formas diferentes de manifestação da intoxicação e *Salmonella* spp, que causa, a partir da ingestão do alimento contaminado com o microrganismo, infecção alimentar; sendo estes os mais importantes patógenos dentro da classificação (MATSUMOTO, 2010).

- Enterobactérias: Nesta classificação encontram-se as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que são microrganismos Gram-negativos, possuem forma de bastão reto, não são produtores de esporos e são anaeróbios facultativos, fermentam a glicose e formam ácido e gás carbônico, sendo algumas espécies redutoras de nitrato e nitrito. Os microrganismos pertencentes à esta família são encontrados na natureza, animais, frutas, vegetais e também no homem, sendo que esta classificação abrange gêneros como: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*,

bactérias dos grupos coliformes à 35° C e termotolerantes; alguns gêneros são causadores de alterações em alimentos como *Erwinia* e *Pectobacterium*, ou causadoras de doenças em animais como *Yersinia* e *Edwardsiella* em peixes tropicais ou *Klebsiella* e *Citrobacter* que causam mastite em bovinos, a classificação ainda abrange gêneros que causam doenças em humanos, como a *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Cronobacter*, *E. coli* enteropatogênica, enterohemorrágica e *E. coli* O157:H7. Os microrganismos pertencentes à esta classificação são mesófilos e alguns gêneros psicrótróficos, portanto possuem temperatura de crescimento entre 7 à 45 °C (OLIVEIRA, 2005) e são considerados microrganismos indicadores de condições higiênico-sanitárias, pois são facilmente eliminados com a sanitização realizada nos equipamentos, portanto se constatado sua presença em alimentos, significa que os processos de sanitização não estão sendo realizados com eficiência (SILVA et al., 2017).

3.2 O ULTRASSOM

O ultrassom é um equipamento, utilizado como método térmico ou não térmico, que emite ondas mecânicas com frequências acima de 16 kHz, podendo ser de baixa intensidade ou de alta intensidade; as ondas de baixa intensidade são aquelas que atingem até 1 W/cm² e uma frequência maior que 100 kHz, já as de alta intensidade trabalham com ondas de intensidade maior que 10 W/cm² e de frequência entre 20 e 100 kHz. Quando as ondas ultrassônicas passam por um alimento líquido, suas moléculas sofrem ação mecânica; tais ondas são transmitidas em ciclos, sendo elas ondas de alta pressão ou compressão e de baixa pressão ou rarefação. Durante este ciclo, o líquido atinge o ponto de tensão de vapor e passa para o estado gasoso e então são formadas cavidades no líquido, resultantes da reação entre a rarefação e a força atrativa das moléculas; conforme as mudanças de pressão continuam as cavidades se tornam bolhas de vapor e crescem até que seu tamanho seja instável e ocorra uma ruptura, fazendo com que as bolhas entrem em colapso e liberem energia, este fenômeno é conhecido como cavitação (MOHAMMADI et al., 2014), tal colapso ocorre porque durante o ciclo de alta pressão, a difusão dos gases aumenta e expande as bolhas; com essa expansão a energia ultrassônica não retém a fase de vapor na bolha, resultando na sua condensação; as bolhas condensadas então colidem umas com as outras, formando regiões de temperatura de até 5.500 °C e de pressões de até 50 Mpa; tais parâmetros são responsáveis pela inativação microbiana e enzimática através do uso do ultrassom (VILLADIEGO et al., 2012).

As ondas propagadas pelo ultrassom estão em uma frequência acima da frequência da audição humana e o efeito produzido pela cavitação no meio em questão é útil na conservação do alimento, porém, segundo a *Food and Drug Administration*, o método quando usado sozinho, não é suficiente para inativar toda uma gama de microrganismos (GUERRERO et al., 2017).

O objetivo do uso do ultrassom na indústria é o de economizar energia, já que o seu uso diminui o tempo de processamento do alimento, melhora a sua qualidade e aumenta sua vida útil. O equipamento de ultrassom pode ser usado na indústria de três maneiras: sendo aplicado diretamente no produto; acoplado à um dispositivo ou onde o produto é submerso em um banho ultrassônico; segundo a sua classificação de ondas, o equipamento que emite ondas de baixa intensidade são utilizadas geralmente em análises físico-químicas, com o intuito de obter informações sobre composição, estrutura e estado físico dos alimentos, já que as ondas de baixa intensidade não são destrutivas, ou seja, não modificam as propriedades físicas ou químicas de um produto; já o de alta intensidade é aplicado em etapas do processamento dos alimentos, pois promovem mudanças em sua estrutura, como a destruição física de componentes e aceleração de reações químicas. O ultrassom é aplicado nos alimentos sozinho ou combinado a outros métodos, como pressão e calor; é passível de ser aplicado em sistemas líquidos, sólidos e gasosos, substituindo na indústria etapas como: extração, secagem, cristalização, filtração, homogeneização (PANIWNYK, 2017), amaciamento de carnes (ERCAN; SOYSAL, 2013) e mais especificamente na indústria láctea nas etapas de homogeneização, filtração, extração, dissolução, fermentação, desnaté, corte e ainda na monitoração dos processos (MOHAMMADI et al., 2014).

3.2.1 O Ultrassom na inativação microbiana

O impacto que a temperatura aplicada ao leite provoca, pode levar a diminuição da qualidade dos produtos; o ultrassom por sua vez, pode ser uma ferramenta alternativa para a resolução destes problemas (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Podendo ser um método não térmico, o ultrassom é amplamente utilizado para conservar os alimentos biologicamente; no leite mais especificamente, os principais métodos para conservação são térmicos e abrangem a pasteurização e a ultrapasteurização ou UHT; contudo alguns microrganismos são mais resistentes quando tratados somente pelo ultrassom, por isso o método pode ser usado em combinação com outros, como por exemplo, o uso de pressão e de calor. O efeito

antimicrobiano do ultrassom se dá pela cavitação formada através das mudanças de pressão no meio, provocadas pelas ondas ultrassônicas; estas mudanças de pressão e a temperatura resultante do colapso das bolhas provocam o rompimento e afinamento da parede celular dos microrganismos e também causa danos no DNA dos mesmos; dentro da grande gama de microrganismos os Gram-negativos são mais susceptíveis à destruição do que os Gram-positivos, já que sua membrana celular é mais fina e, portanto, mais fácil de ser destruída; outras variáveis que têm influência na eficiência da inativação microbiana através do ultrassom, além da espessura da membrana celular são: tempo de exposição, volume de alimento, composição do alimento, tipo de microrganismo a ser inativado, amplitude das ondas, temperatura atingida, entre outros. Microrganismos mais resistentes à temperatura como o *Clostridium* e *Bacillus* e também seus esporos, apresentarão resistência ao tratamento por ultrassom, por isso, neste caso, o uso do ultrassom combinado à outros métodos de conservação, resulta numa eficácia maior de inativação (ERCAN; SOYSAL, 2013). O uso desta tecnologia vem sendo estudado na área da inativação microbiana através de vários estudos em escala laboratorial, como o de Ercan e Soysal (2013), que demonstraram que o ultrassom foi eficiente na inativação de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, se combinado com outros métodos de conservação, como o calor e a pressão por exemplo; D'amico (2006), demonstrou em seu estudo que com o uso do ultrassom e calor moderado, houve uma redução de 5 log de UFC.mL⁻¹ de *Listeria monocytogenes* em leite, bactéria esta de grande importância no alimento e que faz parte das bactérias psicrófilas, as quais se reproduzem em temperaturas de refrigeração, grupo também relevante no leite.

3.2.2 Banho ultrassônico

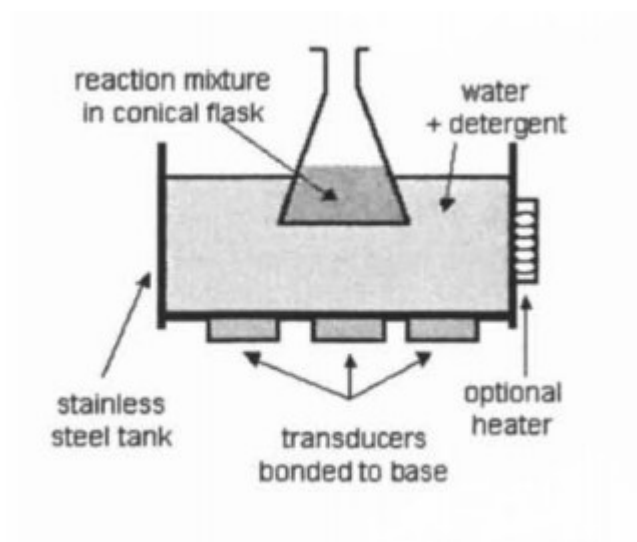
O equipamento de ultrassom é encontrado em duas formas de funcionamento, a sonda ultrassônica e o banho ultrassônico, os aparelhos ultrassônicos do tipo banho são tanques de aço inoxidável que se diferem quanto à posição dos transdutores, que são a parte do equipamento que emite as ondas ultrassônicas e que se apresentam das seguintes formas:

- Onde os transdutores estão ligados à base do tanque, do lado de fora, ou seja, não entram em contato com o líquido do banho;
- Onde os transdutores estão ligados à base do tanque, do lado de dentro do aparelho e ficam em contato com o líquido do banho;

- Onde o transdutor é um dispositivo submersível e é projetado para ser mergulhado no líquido do banho;
- Onde o transdutor é um sistema de sondagem.

Dentre os modelos disponíveis no mercado, o mais amplamente utilizado em laboratórios é o modelo onde os transdutores estão ligados à base do tanque de aço, em sua parte exterior, pois é uma fonte mais disponível e mais barata; além disso, os equipamentos mais modernos possuem um termostato para regular a temperatura do banho e alguns possuem um dispositivo que permite ajuste de potência de funcionamento, como mostra a Figura 1:

Figura 1: Banho ultrassônico



Fonte: MASON; PETERS (2002, p. 50).

São encontrados equipamentos que suportam 1,5 litros de líquido até de tamanhos maiores que suportam 50 litros de líquido e podem trabalhar com temperaturas de até 100 °C; para um melhor funcionamento do banho no quesito temperatura e eficácia de propagação de ondas, faz-se necessário determinar uma temperatura de equilíbrio do banho, para que o aparelho trabalhe em uma condição contínua de funcionamento; esta temperatura ideal, na maioria dos casos é de 45 °C. O uso deste tipo de equipamento possui algumas vantagens, como: preço acessível, dispersão homogênea das ondas pelo líquido do banho, pode ser usado como o próprio recipiente de deposição de amostra caso seja desejável alcançar um poder maior de propagação das ondas, entre outras; entretanto, algumas desvantagens também são observadas, como: pouca energia dissipada no banho (máximo de 5 W/cm²), a eficácia da

propagação das ondas em uma amostra depende do recipiente usado e de sua espessura e posição em que é colocada no equipamento, a frequência que o equipamento opera não é universal, ou seja, encontram-se equipamentos que trabalham com frequências de 40 kHz e também com frequências de 20 kHz, o que pode afetar os resultados de uma pesquisa em que se reproduz estudos encontrados em literatura; dificuldade de controle de temperatura já que a temperatura do equipamento sobe lentamente durante o seu funcionamento, o que leva a resultados inconsistentes, entre outros. Um problema a ser considerado quanto à temperatura utilizada é o de se trabalhar com temperatura ambiente, pois como já mencionado antes, o equipamento aquece lentamente durante o uso; portanto para controlar esta temperatura pode-se adicionar gelo durante o tempo de uso, circular água de resfriamento ou ainda operar por curtos espaços de tempo em que se presume que a temperatura não subirá além da temperatura ambiente; entretanto no mercado existem banhos ultrassônicos mais modernos que possuem camisa dupla para controle de temperatura, dispositivo para controle de potência e temperatura e tampas à prova de vapor, partes estas que permitem a obtenção de resultados mais confiáveis e mais rápidos se comparados com um banho simples, sem tais acessórios (MASON; PETERS, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O leite cru refrigerado foi adquirido na Feira do Produtor da cidade de Medianeira e imediatamente transportado até o laboratório da UTFPR para manter a temperatura de refrigeração (7 °C), onde permaneceu refrigerado por aproximadamente 1 hora, até o momento do uso no estudo. Os equipamentos necessários para a realização do estudo, assim como os meios de cultura e reagentes, foram disponibilizados pelo Departamento de Alimentos da UTFPR, Câmpus Medianeira e os testes rápidos em laminocultura foram cedidos pela Laborclin.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo de meios

O preparo dos meios de cultura utilizados neste estudo seguiu a metodologia da Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1993). Para a realização da análise de contagem de Enterobactérias, foram utilizados os meios de cultura: Água peptonada 0,1% e Ágar vermelho violeta bile com glicose (VRBG).

4.2.2 Tratamento do leite

Os tratamentos de termo-sonicação foram realizados em três dias, sendo que, para cada dia foi adquirida uma amostra de leite cru refrigerado, diretamente do produtor rural. Este leite foi submetido à três tratamentos de termo-sonicação por dia, portanto, foram realizados as análises para os três tratamentos e também a análise para o leite cru refrigerado. Para o tratamento do leite cru refrigerado foi montado um sistema, como mostram as Figuras 2 e 3, utilizando banho termostatizado (Tecnal®, modelo TE-184), que promoveu o aquecimento do leite nas temperaturas dos tratamentos utilizados, usando-se de um copo

encamisado que recebeu 200 mL de leite por tratamento e foi comportado dentro do banho ultrassônico (Elma®, modelo E 30H), à uma frequência de 37 kHz e uma potência de 320 W, que forneceu o tratamento ultrassônico para o leite. O leite cru refrigerado foi submetido à três temperaturas (15, 35 e 55 °C) e três tempos de tratamento distintos (0, 10 e 20 minutos), desta forma, o trabalho se caracterizou por um planejamento com experimento fatorial completo, de 3 níveis e 2 fatores (3^2), totalizando nove tratamentos, conforme apresentado na Tabela 1. Após os tratamentos, as amostras foram submetidas à análise microbiológica em duplicata e os resultados destas, comparadas entre si e com aqueles obtidos para a amostra controle (leite cru refrigerado sem tratamento).

Figura 2: Sistema de tratamento ultrassônico com banho termostaticado.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 3: Sistema de tratamento por termo-sonicação.



Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 1- Planejamento experimental aleatorizado para tratamento de termo-sonicação do leite cru refrigerado.

Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo (min)
A	15	0
B	15	10
I	55	20
F	35	20
G	55	0
H	55	10
D	35	0
E	35	10
C	15	20

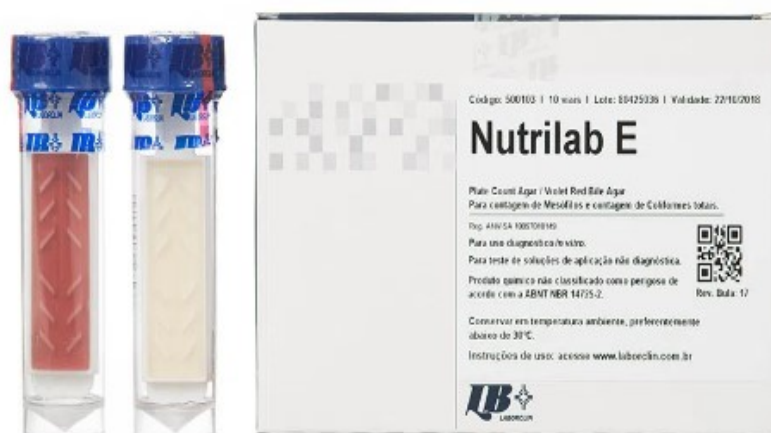
Fonte: Autoria própria (2020).

4.2.3 Análises microbiológicas

A realização da análise de Enterobactérias seguiu a metodologia da Portaria n° 101, de 11 de agosto de 1993, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1993), bem como a expressão de seus resultados, expressos conforme o anexo 1 contido nesta mesma Portaria. Após o leite cru refrigerado ser homogeneizado dentro do seu recipiente original, com movimentos circulares, foi retirada uma alíquota de 500 mL e destinada à análise microbiológica padrão de Enterobactérias, sem receber tratamento ultrassônico e/ou tratamento térmico. Para os tratamentos de termo-sonicação, a alíquota utilizada foi de 200 mL, por tratamento; as amostras colhidas foram acondicionadas em frascos adequadamente esterilizados; no caso da análise realizada antes do tratamento (BRASIL, 1993).

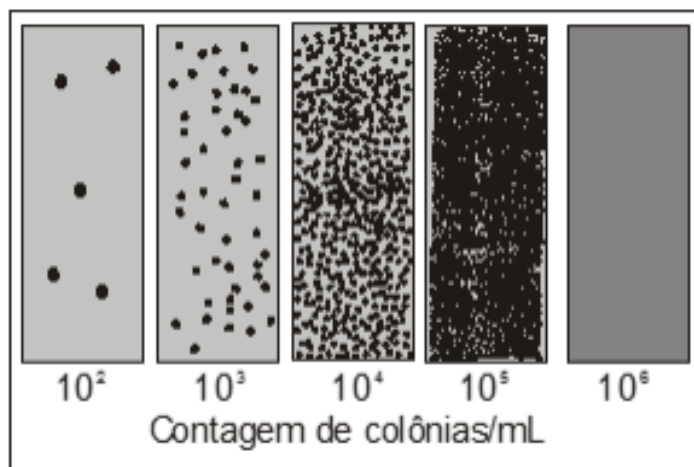
Foi realizada a análise em laminocultivo, o teste Nutrilab, modelo E, da Laborclin®, apresentado na Figura 4, que é um laminocultivo utilizado para contagem microbiana em amostras líquidas, sólidas e superfícies; este modelo apresenta uma pá com duas faces de ágar, em uma face está o ágar PCA, para contagem de microrganismos totais e na outra face o ágar VRBA, para isolamento e contagem de coliformes à 35 °C, que são inclusos na classificação das Enterobactérias. A análise com o laminocultivo seguiu as orientações contidas na bula do fabricante, foi realizada em duplicata e deu-se da seguinte forma: em cabine de fluxo laminar, o lacre foi rompido e a pá retirada do viés, sendo em seguida mergulhada nas amostras de leite tratada por termo-sonicação, após o excesso de líquido ser retirado, a pá foi rosqueada novamente no viés e encubada à 35 °C por 48 horas, sua contagem baseia-se no modelo de comparação contido na bula do fabricante, como apresentado na Figura 5.

Figura 4: Teste em laminocultivo Nutrilab E.



Fonte: Laborclin (2020).

Figura 5 – Contagem modelo para o Nutrilab E.



Fonte: Laborclin (2020).

4.2.4 Tratamento dos dados

As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata. Os resultados obtidos a partir da determinação de Enterobactérias foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando detectada diferença significativa (ao nível de 5% de significância) foi aplicado o teste de Tukey, empregando o programa estatístico Minitab (Minitab Inc., Pensilvânia – EUA), versão 18.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CONTAGENS DE ENTEROBACTÉRIAS, COLIFORMES À 35 °C E CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

Os resultados obtidos nas análises realizadas em leite cru refrigerado e tratado por termo-sonicação estão expressos na Tabela 2, agrupados por tratamentos realizados no mesmo dia, sendo que, o resultado apresentado é a média das análises realizadas em duplicata.

Tabela 2 - Contagem de enterobactérias em leite cru refrigerado com e sem tratamento de termo-sonicação.

Sequência de análise	Tratamento	Parâmetros de tratamento	Contagem de Enterobactérias (UFC.mL ⁻¹)	Contagem de Enterobactérias (10 ³ UFC.mL ⁻¹)
Primeiro dia	Leite cru refrigerado 1	-	1,0 x 10 ⁴	11 ± 0,0 ^b
	A	15 °C/0 min	3,0 x 10 ⁴	33 ± 5,7 ^{a b}
	B	15 °C/10 min	5,0 x 10 ⁴	50 ± 0,0 ^{a b}
	I	55 °C/20 min	<1,0 x 10 ³	0 ± 0,0 ^b
Segundo dia	Leite cru refrigerado 2	-	1,5 x 10 ⁴	15 ± 7,1 ^b
	F	35 °C/20 min	1,0 x 10 ⁵	106,5 ± 75,7 ^a
	G	55 °C/0 min	<1,0 x 10 ³	0 ± 0,0 ^b
	H	55 °C/10 min	<1,0 x 10 ³	0 ± 0,0 ^b
Terceiro dia	Leite cru refrigerado 3	-	1,0 x 10 ⁴	11 ± 0,7 ^b
	D	35 °C/0 min	3,0 x 10 ⁴	32,5 ± 0,7 ^{a b}
	E	35 °C/10 min	2,0 x 10 ⁴	19 ± 1,4 ^b
	C	15 °C/20 min	2,0 x 10 ⁴	19,5 ± 0,7 ^{a b}

*Média ± Erro padrão da média.

**Letras iguais, na mesma coluna, indicam não haver diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as amostras.

Fonte: Aatoria própria (2020).

O leite cru refrigerado foi submetido à análise microbiológica para contagem de Enterobactérias juntamente com as amostras de leite tratado por termo-sonicação, com o fim de proporcionar um parâmetro inicial de comparação para as amostras submetidas à termo-sonicação. No primeiro circuito foram analisadas as amostras de leite submetidas aos tratamentos A (15 °C/0 min), B (15 °C/10 min) e I (55 °C/20 min), comparando tais resultados com aquele encontrado para o do leite cru refrigerado utilizado neste circuito, não se observou diferença estatística ($p > 0,05$) entre estes tratamentos. Levando em consideração o tempo do tratamento B (10 minutos) e o tempo do tratamento A (0 minutos) é possível observar que a exposição do leite ao ultrassom, nas condições testadas, não apresentou influência na diminuição da contagem de Enterobactérias. Já o resultado do tratamento I, apresentou-se menor que o resultado obtido para o leite cru e para o tratamento A e B, sendo um resultado coerente, pois neste tratamento o leite foi exposto à temperatura mais elevada

(55 °C), sendo uma temperatura de pasteurização branda, e por um intervalo de tempo prolongado (20 min).

No segundo circuito de análises foram realizados os tratamentos F (35 °C/20 min), G (55 °C/0 min) e H (55 °C/10 min). Comparando o resultado da análise do leite cru refrigerado com o resultado do tratamento F, observa-se que este apresentou uma contagem para Enterobactérias superior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$), inclusive para os demais tratamentos deste grupo, contudo nas condições testadas, a termo-sonicação pareceu não ter efeito na redução da contagem de Enterobactérias no leite. Ainda, podemos inferir que o binômio tempo/temperatura utilizado favoreceu o desenvolvimento destes microrganismos. No tratamento I, que utilizou a mesma temperatura, porém tempo diferente (20 minutos) dos tratamentos G e H, o resultado obtido foi o mesmo, não houve contagem microbiana e conseqüentemente, não se observou diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos, não sendo possível assim observar influência da sonicação. Entretanto, a temperatura utilizada nestes tratamentos favoreceu a diminuição de contagem das Enterobactérias; segundo Oliveira (2005) acima da temperatura de 50 °C apenas algumas bactérias termófilas se desenvolvem, porém no leite não é comum haver crescimento destas bactérias; os resultados das análises dos tratamentos que utilizaram 55 °C apresentaram-se inferiores ao resultado das análises com leite cru refrigerado, apesar de não diferirem estatisticamente.

No terceiro circuito de análises foram realizados os tratamentos D (35 °C/0 min), E (35 °C/10 min) e C (15 °C/20 min), não sendo detectada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados destes tratamentos; comparando o resultado da contagem para Enterobactérias do tratamento D e E, observou-se que o tratamento D, tendo o menor tempo de termo-sonicação utilizado (0 min), apresentou contagem superior ao tratamento E, indicando que a exposição do leite cru à termo-sonicação em tempo maior que 0 minutos foi capaz de diminuir a contagem de Enterobactérias até os primeiros 10 minutos, nestas condições, pois o tratamento F, que utilizou 20 minutos de tratamento apresentou contagem superior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) ao tratamento E.

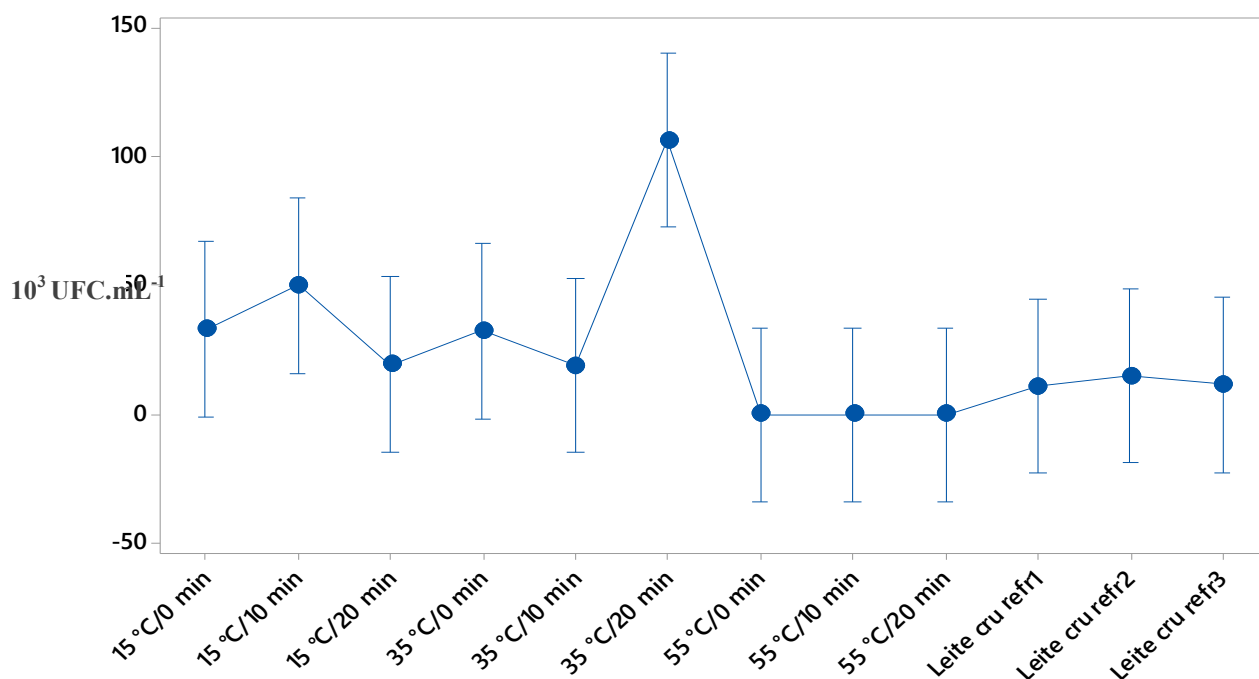
Avaliando os resultados para os três tratamentos utilizando 15 °C (A, B e C), observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os três tratamentos para a contagem de Enterobactérias. Já nos tratamentos que se utilizaram da temperatura de 35 °C (D, E e F) percebeu-se que, apenas entre os tratamentos E (10 minutos de sonicação) e F (20 minutos de sonicação) houve diferença estatística ($p < 0,05$), enquanto que, o tratamento D, o qual não foi submetido a sonicação, apresentou-se estatisticamente igual ($p > 0,05$) aos tratamentos E e F.

Estes padrões de comportamento impossibilitam estabelecer uma relação entre a termo-sonicação e a destruição de microrganismos do grupo das Enterobactérias.

Nas análises que utilizaram a temperatura de 55 °C, observou-se que houve diminuição na contagem de Enterobactérias, comparando os resultados com as do leite cru de seus respectivos circuitos de análise, contudo as médias não diferiram estatisticamente ($p>0,05$).

Nas análises de 55 °C o resultado apresentou-se positivo para o objetivo do estudo, de inativar as enterobactérias através de termo-sonicação em temperatura inferior à de pasteurização lenta (62-65 °C). Nesta faixa de temperatura as bactérias termófilas se desenvolvem no leite, tendo sua faixa ótima de crescimento entre 55-65 °C, contudo Oliveira (2005) comenta que no leite cru há pouca incidência de bactérias termófilas. A partir da análise do gráfico de intervalos apresentado na Figura 6, pode-se observar e comparar as diferenças das médias para contagem de Enterobactérias em leite cru refrigerado e leite submetido aos tratamentos de termo-sonicação.

Figura 6 – Médias para contagem de Enterobactérias em leite cru refrigerado e leite submetido a tratamentos de termo-sonicação.



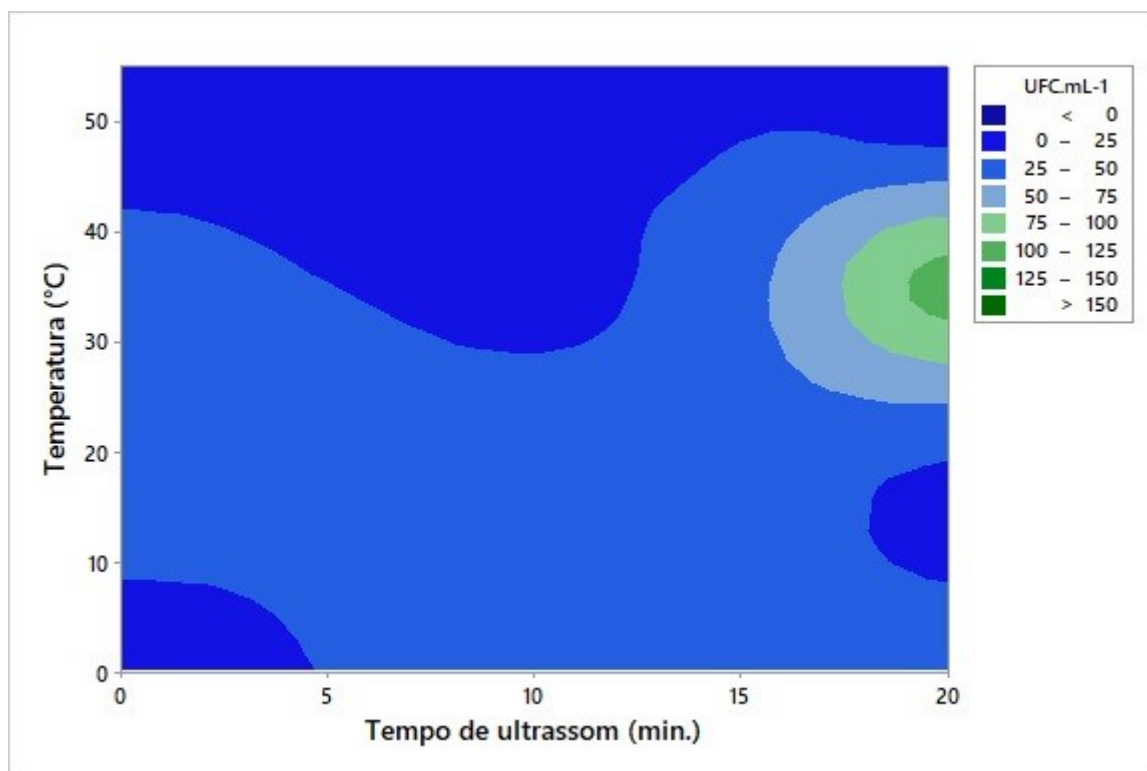
*O erro padrão combinado foi usado para calcular os intervalos.

Fonte: Autoria própria (2020).

Observando a Figura 6 e a Tabela 2, percebe-se que com exceção dos tratamentos que utilizaram 55 °C, os demais tratamentos e as análises do leite cru apresentaram contagens consideradas superiores quando levado em consideração o limite de contagem para Enterobactérias, apresentado pela Instrução Normativa 76 do MAPA, de 5 UFC.mL⁻¹.

Na Figura 7 é apresentado o gráfico de contorno para a contagem de Enterobactérias por tempo de sonicação e temperaturas utilizadas.

Figura 7 – Gráfico de contorno para contagem de Enterobactérias em leite cru refrigerado e leite submetido à tratamentos de termo-sonicação.



Fonte: Autoria Própria (2020).

A partir da análise da Figura 7 é possível observar e estimar a relação da variável resposta (contagem de Enterobactérias) e as variáveis preditoras (temperatura e tempo de termo-sonicação). A área de contorno com maior contagem neste estudo se situou na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C e tempo entre 15 e 20 minutos, concluindo através disto que tais combinações de variáveis não resultaram na diminuição da população microbiana, conforme esperado. A área com menor contagem microbiana se concentrou em torno dos 50 °C, independente do tempo de tratamento utilizado, contudo, considerando o resultado geral das contagens, entende-se que tal diminuição deriva da temperatura à que o leite foi submetido e não ao tratamento de sonicação, já que, segundo Menezes (2014) as bactérias da família

Enterobacteriaceae são sensíveis à altas temperaturas, como as utilizadas na pasteurização do leite, por serem em suma, bactérias mesófilas.

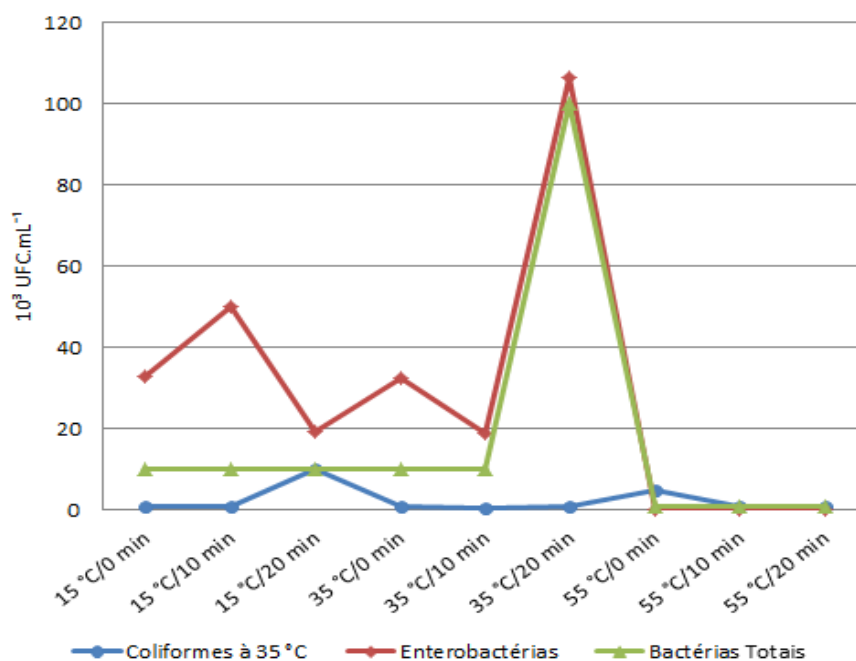
Os resultados encontrados para a análise com o teste Nutrilab E estão representados Tabela 3.

Tabela 3 – Contagem de Coliformes à 35 °C e Contagem padrão em placas em leite cru refrigerado submetido à tratamento de termo-sonicação.

Tratamentos	Coliformes à 35 °C (UFC.mL ⁻¹)	Contagem padrão em placas (UFC.mL ⁻¹)
15 °C/0 min	10 ³	10 ⁴
-	10 ³	10 ⁴
15 °C/10 min	10 ³	10 ⁴
-	10 ³	10 ⁴
15 °C/20 min	10 ²	10 ⁴
-	10 ²	10 ⁴
35 °C/0 min	10 ³	10 ⁴
-	10 ³	10 ⁴
35 °C/10 min	10 ²	10 ⁴
-	10 ³	10 ⁴
35 °C/20 min	10 ³	10 ⁵
-	10 ³	10 ⁵
55 °C/0 min	10 ⁴	10 ³
-	10 ³	10 ³
55 °C/10 min	10 ³	10 ³
-	10 ³	10 ³
55 °C/20 min	10 ³	10 ³
-	10 ³	10 ³

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 8 – Médias das análises de coliformes à 35 °C, enterobactérias e contagem padrão em placas.



Fonte: Autoria Própria (2020).

Analisando os resultados de contagem para Coliformes à 35° C, para os tratamentos de termo-sonicação realizados à 15 °C, observou-se que com o tempo de 20 minutos o tratamento foi o menos efetivo, apresentando uma redução decimal, quando comparado aos tratamentos à mesma temperatura e em diferentes tempos. Já para a contagem de Contagem padrão em placas não houve variação quando a temperatura de termo-sonicação foi de 15 °C.

Nas análises realizadas para quantificação de Contagem padrão em placas no leite submetido à tratamento de termo-sonicação à 35 °C por 20 foi possível observar a menor eficiência na inativação microbiana entre todas as combinações de variáveis do estudo. O grupo de bactérias totais engloba uma gama grande de microrganismos mesófilos, que se submetidos à temperatura agradável para seu crescimento (± 32 °C) e por um período de tempo maior, irão ter condições de se multiplicar (CLAUDINO-FILHO, et al., 2015), fato este que se demonstra na comparação entre os resultados de coliformes à 35 °C e Contagem padrão em placas com a mesma temperatura e tempo, pois o resultado para Contagem padrão em placas foi superior ao resultado para coliformes à 35 °C.

No tratamento à 55 °C/ 0 minutos, a análise para coliformes à 35 °C apresentou um crescimento superior em um dos testes (10^4 UFC.mL⁻¹), em comparação com 10 e 20 minutos de tratamento, porém entre os dois últimos tempos não houve diferença no crescimento (10^3 UFC.mL⁻¹). Para a análise de Contagem padrão em placas também não houve diferença de crescimento entre os tempos para o tratamento com temperatura de 55 °C (10^3 UFC.mL⁻¹); contudo as contagens de Contagem padrão em placas nesta temperatura são menores se comparados com os resultados das demais temperaturas do estudo; resultado semelhante foi obtido no estudo de Schuina (2014), que utilizou a termo-sonicação em suco de laranja, demonstrando que em temperatura de 50-60 °C a população de mesófilos totais sofreu redução de 3 ciclos logarítmicos de contagem, portanto, segundo Ordoñez (2004) a maioria das bactérias mesófilas são termolábeis, por isto não resistem à tratamento térmico.

Observando o resultado para coliformes à 35 °C no teste rápido e o resultado encontrado na análise de Enterobactérias, que utilizaram-se do tratamento de termo-sonicação em temperatura de 55 °C, percebe-se que no teste rápido houve contagem para coliformes à 35 °C para a diluição 10^3 enquanto que as análises de Enterobactérias não apresentaram contagem para a mesma diluição; segundo Franco (1996), a confiabilidade da análise microbiológica de Enterobactérias depende do número e tamanho das amostras realizadas, do grau de sensibilidade do método utilizado e do número de coliformes, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* e patógenos presentes na amostra. Quanto à abrangência dos grupos de bactérias, o grupo coliformes, segundo Anand e Griffiths (2011) é reconhecido dentro da

classificação das enterobactérias, principalmente os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, que se desenvolvem em temperatura de 35-37 °C, enquanto que o grupo *Enterobacteriaceae* compreende cerca de 27 gêneros de bactérias, que se desenvolvem em temperaturas de 22-37 °C, sendo algumas espécies psicrotróficas. Considerando isto, esperava-se que as análises de Enterobactérias apresentassem contagem superior às análises com teste rápido de Coliformes à 35 °C, entretanto, as metodologias empregadas nas análises foram diferentes, o que pode ter sido a causa da divergência nos resultados esperados.

A Instrução Normativa 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento determina o limite de contagem para Enterobactérias em leite pasteurizado, como sendo de 5 UFC.mL⁻¹. Utilizando-se deste parâmetro neste estudo, conclui-se que apenas as análises que se utilizaram da temperatura de 55 °C estão em concordância com este limite de contagem, contudo deve-se levar em consideração que o estudo utilizou uma diluição de 1:1000, frequência ultrassônica de 37 kHz e 320 W de potência; estudos como o de Sarkinas et al. (2018) demonstram que utilizando uma potência ultrassônica de 600 W há maior redução na população microbiana se comparado com resultados obtidos utilizando 300 W de potência, em bactérias como *E. coli*, *B. cereus* e *S.tiphymurium*; observando então o anexo 1 da Portaria 101/93 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que demonstra o cálculo e registro de contagens prováveis em uma análise microbiológica, nota-se que se na diluição 10⁻³ utilizada neste estudo o resultado de contagem for zero, nas diluições 10⁻² o resultado também tende a ser zero, o que torna o resultado da análise feita neste estudo, mais próxima do limite aceitável da Instrução Normativa 76. Considerando também o limite para contagem total microbiana, antes de receber tratamento térmico, também apresentado pela Instrução Normativa 76, cujo valor é de 9,0 x 10⁵ UFC.mL⁻¹, pode-se estimar, baseando-se no resultado da análise com o teste rápido da Laborclin, que utilizou a face contendo meio PCA, que o leite utilizado possivelmente não estivesse dentro deste limite microbiológico, pois os testes com Nutrilab realizados demonstraram resultados muito próximos do limite estabelecido pela Instrução Normativa 76.

6 CONCLUSÃO

Tendo o estudo como objetivo verificar a inativação microbiana no leite cru refrigerado utilizando tratamentos de termo-sonicação, não foi possível estabelecer uma relação positiva entre o tempo de termo-sonicação e a diminuição de microrganismos dos grupos das Enterobactérias, Coliformes a 35° C e Contagem padrão em placas. Contudo, tendo como referência a Instrução Normativa 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de 26 de Novembro de 2018 e a Portaria 101 de 11 de Agosto de 1993 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, observou-se nos resultados obtidos nas análises deste estudo, que os tratamentos que utilizaram temperatura de 55 °C, foram os únicos que alcançaram resultado positivo na inativação das enterobactérias, independente do tempo de termo-sonicação do leite cru refrigerado. Os demais tratamentos, incluindo os testes rápidos de Contagem padrão em placas não apresentaram resultado dentro do limite estabelecido pelas legislações vigentes, antes e após tratamento térmico. Muito ainda tem-se a estudar neste campo para que se encontre uma alternativa viável para substituir os processos de pasteurização e ultrapasteurização do leite a nível industrial e que apresentem resultados microbiológicos confiáveis, dentro das normas estabelecidas pelos órgãos responsáveis e que entregue ao consumidor um produto de qualidade cada vez melhor, não oferecendo riscos à saúde, portanto, novas análises podem ser feitas, criando um sistema de tratamento para o leite diferente do utilizado neste estudo, utilizando um número maior de tratamentos com temperatura e tempo de tratamento diferentes dos determinados para este estudo; acrescentando outras diluições a serem analisadas e empregando metodologias padrão entre as análises, para detecção de grupos de microrganismos relevantes para o leite tratado por termo-sonicação, a fim de que a comparação dos resultados possam ser avaliados com maior confiabilidade.

7 REFERÊNCIAS

- ANAND, S. K.; GRIFFITHS, M. W. Pathogens in Milk | Enterobacteriaceae. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, [S.I.], v.2, p. 67-71, 2011.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G.; MAWSON, R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S.I.], v. 10, n. 2, p. 172–178, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 331 de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 nov. 2018. Disponível em:<https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/d01-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 77 de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 nov. 2018. Disponível em:<https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750141/d01-2018-11-30-instrucao-normativa-n-77-de-26-de-novembro-de-2018-52749887>. Acesso em: 20 abr. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101 de 11 de agosto de 1993. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 ago. 1993. Disponível em: <<https://www.crmvgo.org.br/legislacao/OVOS/POR00000101.pdf>>. Acesso em: 12 mai. 2020
- CLAUDINO-FILHO, S. C.; SILVA, E. O.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; CASTANHA, E. R. Avaliação microbiológica de bactérias aeróbias mesófilas no leite in natura produzido em uma associação rural em Garanhuns-PE. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, [S.I.], v. 5,n. 1, p. 87-93, 2015.
- D'AMICO, D. J.; SILK, T. M.; WU, J. R.; GUO, M. R. Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. **Journal of food protection**, [S.I.], v. 69, p. 556-563, 2006.
- DA ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R. Mercado do leite: Fatores que afetam os indicadores. **Revista Anuário Leite Embrapa**. São Paulo, [s.n.], p. 14-16, 2019.
- ERCAN, S. Ş.; SOYSAL, Ç. Use of ultrasound in food preservation. **Natural Science**, [S.I.] v. 5, n. 8, p. 5–13, 2013.
- FERREIRA, H.; LIMA, H.; COELHO, T. **Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal**. 2014. 10f. Apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2014.
- FRANCO, D. B. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, D. B. G. M. et al. (Org.). **Microbiologia dos Alimentos**. 1º ed. São Paulo: Atheneu , cap. 3, 1996. p. 28.
- GUERRERO, S. N.; FERRARIO, M.; SCHENK, M.; CARRILLO, M. G. Hurdle technology using ultrasound for food preservation. **Ultrasound: Advances for Food Processing and**

Preservation. Buenos Aires: [s.n], cap. 3, 2017. p. 39-99 .

LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C.; STOCK, L. A. Desempenho do mercado brasileiro de lácteos. **Revista Anuário Leite Embrapa**. São Paulo, [s.n], p. 26-27, 2019.

MARCHESINI, G.; FASOLATO, L.; NOVELLI, E.; BALZAN, S.; CONTIERO, B.; MONTEMURRO, F.; ANDRIGHETTO, I.; SEGATO, S. Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [S.I], v. 29, p. 215–221, 2015.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, E. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRQUER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 295–298, 2008.

MASON, T.; PETERS, D. The ultrasonic bath. In: MASON, T. et al. (Org.). **Practical Sonochemistry: Power ultrasound uses and applications**. 2° ed. [S.I]: Woodhead Publishings, cap. 2, 2002, p. 49–63.

MATSUMOTO, L. S.; SAEKI, E. K. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite pasteurizado e uht. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, [Juiz de Fora], v. 65, n. 377, p. 29–35, 2010.

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e conservação do leite. **Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas**, Santa Maria, v. 18, p. 76–89, 2014.

MOHAMMADI, V.; GHASEMI-VARNAMKHAZI, M.; EBRAHIMI, R.; ABBASVALI, M. Ultrasonic techniques for the milk production industry. **Measurement**, [S.I], v. 58, n. 2, p. 93–102, 2014.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ORDOÑEZ, J. A. Microbiologia do leite. In: ORDOÑEZ, J. A. et al. (Col.). **Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal**. 2° ed. [S.I]: Artmed, cap. 2, 2004, p. 41-48.

PANIWNYK, L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.I], v. 38, n. 12, p. 794–806, 2017.

REVISTA ANUÁRIO LEITE. São Paulo: Embrapa, p. 28-30, 2020-.

SARKINAS, A.; SAKALAIUSKIENE, K.; RAISUTIS, R.; ZEIME, J.; SALASEVICIENE, A.; PUIDAITE, E.; MOCKUS, E.; CERNAUSKAS, D. Inactivation of some pathogenic bacteria and phytoviruses by ultrasonic treatment. **Microbial Pathogenesis**, [S.I], v. 123, p. 144-148, 2018.

ŞENGÜL, M.; ERKAYA, T.; BAŞLAR, M.; ERTUGAY, M. F. Effect of photosonation treatment on inactivation of total and coliform bacteria in milk. **Food Control**, [S.I], v. 22, n. 11, p. 1803–1806, 2011.

SCHUINA, G. L. **Efeito da sonicação e da termossonicação sobre mesófilos totais e bolores e leveduras em suco de laranja**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

SILVA, M. V. M.; NOGUEIRA, J. L.; PASSOS, C. C.; FERREIRA, A. O.; AMBRÓSIO, C. E. A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária.

Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária, Garça: FAEF, v. 3, n. 14, p. 1–10, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES R. A.R.; OKAZAKI, M. M. Contagem de Enterobactérias. In: SILVA, N. et al. (Org.). **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5° ed. São Paulo: Blucher, cap. 8, 2017, p. 132-142.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro**. [S.I.: s.n.], 2015.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características do leite. **Boletim Técnico do Programa Institucional de Extensão da Universidade Federal do Espírito Santo**, Vitória, v. 1, p. 1–6, 2007.

VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. **Ultrassom na indústria de alimentos: Aplicações no processamento e conservação**. Ponta Grossa: Editora Atena, 2018 .

VILELA, D.; RESENDE, J. C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Política agrícola**, [S.I.], v. 26, n. 1, p. 5–24, 2017.

VILLADIEGO, A. M. D.; GARRUTI, D. S.; BRITO, E. S.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J. A. F.; BRUNO, L. M.; MATTOSO, L. H. C.; BASTOS, M. S. R.; SILVEIRA, M. F. A.; ROSA, M. F.; MELO, N. R.; WURLITZER, N. J.; SOARES, N. F. F.; RODRIGUES, P. P. C. F.; AZEREDO, R. M. C.; CRUZ, R. S.; GERALDINE, R. M.; FURTADO, R. F.; SILVA, W. A. Fundamentos dos principais métodos não convencionais de conservação de alimentos. In: AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2° ed. Brasília: Editora Técnica, cap. 6, 2012, p. 202-203.

ZOCCAL, R. Estados e regiões: Destaques em produção. **Revista Anuário Leite Embrapa**, São Paulo, [s.n], p. 38-39, 2020.