

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PROCESSAMENTO DE LEITE DESNATADO  
ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE  
HOMOGENEIZAÇÃO A ULTRA  
ALTA PRESSÃO (HUAP)**

Claudia Regina Gonçalves Pinho  
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas, SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P655p Pinho, Claudia Regina Gonçalves  
Processamento de leite desnatado através da tecnologia de  
homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) / Claudia Regina  
Gonçalves Pinho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006

Orientador: Marcelo Cristianini  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Homogeneização por alta pressão. 2. Leite desnatado. 3.  
Esporos. 4. Enzimas. 5. Fluidodinâmica computacional (CFD). I.  
Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Skim milk processing by ultra high pressure homogenization (UHPH)  
Palavras-chave em inglês (Keywords): High pressure homogenization, Skim milk,  
Spores, Enzymes, Computational Fluid Dynamics (CFD)

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini  
Salvador Massaguer Roig  
Leila Spadoti  
Mirna Lúcia Gigante  
Amauri Rosenthal  
Lúcia Regina Durrant

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Cristianini  
Orientador  
FEA – UNICAMP

---

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig  
FEA – UNICAMP

---

Dr.<sup>a</sup> Leila Spadoti  
ITAL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mirna Lúcia Gigante  
FEA – UNICAMP

---

Dr. Amauri Rosenthal  
EMBRAPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Regina Durrant  
FEA – UNICAMP

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Marcelo Cristianini pela orientação.

À minha família pelo incentivo e apoio.

Aos membros da banca pelas sugestões à redação final da tese.

Aos colegas de laboratório, especialmente à aluna de Iniciação Científica Flávia Marino pela preciosa ajuda e ao Mark Franchi pela inestimável colaboração em todas as etapas do trabalho.

Aos técnicos, Judite, José Roberto e especialmente a Ana Lourdes pela prontidão em ajudar.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Doutorado.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a possibilidade da aplicação do processo de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) no processamento de leite desnatado. Inicialmente verificou-se o efeito do processo de HUAP na inativação de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus* na faixa de 100 a 300 MPa. Amostras de leite desnatado foram inoculadas de modo a se obter contagens da ordem de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL. Os ensaios referentes a cada um dos microrganismos foram realizados separadamente. Os resultados obtidos indicaram que pressões de 200, 250 e 260 MPa foram capazes de inativar totalmente as cargas inoculadas de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente. Foi avaliado o efeito da HUAP na inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus*. As amostras foram inoculadas com cerca de  $10^5$  esporos/mL de leite. Os resultados demonstraram que pressões de até 300 MPa não foram capazes de causar qualquer redução nas contagens obtidas. Verificou-se também que o processo de homogeneização a ultra alta pressão não afetou de maneira significativa a resistência térmica dos mesmos ( $p < 0,05$ ). Avaliou-se ainda o efeito da utilização de temperaturas de entrada de 45°C e da aplicação de choque térmico (100°C por 15 minutos) antes de submeter as amostras ao processo de HUAP. Nestes ensaios novamente não foram observadas reduções nas contagens de esporos. Testou-se também o efeito de pressões da ordem de 300 MPa na inativação de esporos de *Clostridium sporogenes*. Mais uma vez não foi verificado qualquer efeito. A seguir, foram realizados testes de inativação das enzimas fosfatase alcalina, lactoperoxidase e da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* pelo processo de HUAP. Os resultados demonstraram que na faixa de pressões estudada (100 a 300 MPa) a máxima redução verificada na atividade enzimática da lactoperoxidase foi de 28,48% a 300 MPa. Já a fosfatase alcalina apresentou reduções inferiores a 30% em sua atividade na faixa de pressões de 100 a 250 MPa e foi totalmente inativada por pressões iguais ou superiores a 270

MPa. A protease sofreu uma redução de 72,5% no valor de sua atividade nos processos a 300 MPa. Foram determinados os perfis de velocidade no interior da válvula do homogeneizador a ultra alta pressão na faixa de 100 a 300 MPa. Os resultados demonstraram que a velocidade é tanto maior quanto maior a pressão de homogeneização aplicada, sendo que a velocidade máxima obtida foi de 245 m/s na saída do *gap* da válvula no processo a 300 MPa. Finalmente foram avaliados as alterações de cor ( $L^*a^*b^*$ ) e viscosidade provocadas pelo processo de HUAP em amostras de leite cru desnatado. Os resultados indicaram que embora as variações nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  detectadas instrumentalmente tenham sido estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na maior parte dos casos testados, visualmente as mesmas são imperceptíveis. Com relação à viscosidade, apenas as amostras processadas a 300 MPa diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) das demais. Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, a tecnologia de processamento de leite por homogeneização a ultra alta pressão pode ser uma alternativa à indústria de laticínios para aumentar a vida de prateleira durante a estocagem de leite cru anterior a processos de produção de leite UHT, queijos, achocolatados e outros produtos na medida em que diminui consideravelmente as contagens de células vegetativas presentes e inativa parcialmente a protease produzida pelo microrganismo *Pseudomonas fluorescens*.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the use of ultra high pressure homogenization (UHPH) in skim milk processing. Firstly, the effect of UHPH process on inactivation of *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* and *Lactobacillus helveticus* at pressure range from 100 to 300 MPa was studied. Skim milk samples were inoculated in order to obtain  $10^6$ - $10^7$  CFU/mL. Tests of each microorganism were carried out individually. Results showed that pressures of 200, 250 and 260 MPa were able to inactivate all the  $10^7$  CFU/mL initially inoculated of *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* and *Lactobacillus helveticus*, respectively. UHPH effect on *Bacillus stearothermophilus* spores was also evaluated. Results demonstrated that pressures up to 300 MPa did not cause any reduction on spore counts. It was also verified that UHPH process did not affect in a significantly way ( $p < 0.05$ ) thermal resistance of spores. Effect of high inlet temperatures (45 °C) was verified as well as application of thermal chock (100 °C - 15min) before submitting samples to UHPH process. At these tests no reductions were observed again. UHPH effect on *Clostridium sporogenes* spores inactivation was tested. A pressure of 300 MPa was not able cause any reduction on spore counts. Alkaline phosphatase, lactoperoxidase and protease produced by *Pseudomonas fluorescens* inactivation by UHPH process was also studied. Results showed that at pressure range tested (100 to 300 MPa) maximum lactoperoxidase reduction activity was 28.48% at 300 MPa. Alkaline phosphatase, presented activity reductions smaller than 30% at pressures from 100 to 250 MPa but was totally inactivated at 270 MPa. A reduction of 72.5% on proteolytic enzyme activity was verified after processes at 300 MPa. Velocity profiles at ultra high pressure homogenization valve were determined using CFD (Computational Fluid Dynamics) from 100 to 300 MPa. It was demonstrated that velocity increases with homogenizing pressure. The maximum velocity value obtained was 245 m/s at the outlet of the valve gap during processes at 300 MPa. Finally, the effect of ultra high pressure homogenization process on color ( $L^*a^*b^*$ ) and viscosity of raw skim milk

was studied. Pressures varied from 100 to 300 MPa. Results showed that although variations on L\*, a\* and b\* parameters were statistically significant ( $p < 0.05$ ) at the majority of samples analyzed, visually this was not verified. Only viscosity of samples processed at 300 MPa differed in a statistically significant way from the others ( $p < 0.05$ ). Results from this work indicated that ultra high pressure homogenization processing of milk can be an alternative to dairy industry for increasing shelf life during storage of raw milk prior to production of UHT milk, cheese and other products as it reduces significantly vegetative cells counts and proteolysis due to the protease produced by *Pseudomonas fluorescens*.

**ÍNDICE GERAL**

RESUMO.....	v
ÍNDICE GERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo Geral.....	3
Objetivos Específico.....	3
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1 Revisão Bibliográfica.....	4
1.1 A Preservação de Alimentos pelo Método de Alta Pressão.....	4
1.1.1 Método de Alta Pressão Hidrostática (Isostática).....	5
1.1.2 Método de Homogeneização a Ultra Alta Pressão.....	6
1.2 A Aplicação de Alta Pressão para Inativação de Esporos Bacterianos.....	11
1.3 O Efeito da Alta Pressão sobre as Enzimas.....	19
1.4 O Leite e o tratamento térmico tradicional.....	21
1.5 Proteólise em Leite.....	24
1.6 Processamento de Leite por Alta Pressão.....	28
1.6.1 Aplicações de Alta Pressão Hidrostática em Leite.....	28
1.6.2 Aplicações de Homogeneização a Ultra Alta Pressão em Leite.....	30
1.7 Microrganismos utilizados neste estudo.....	31
1.7.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	31
1.7.2 <i>Listeria innocua</i> .....	32
1.7.3 <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	32
1.7.4 <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	32
1.7.5 <i>Clostridium sporogenes</i> (PA 3679).....	33
1.8 Fluidodinâmica Computacional (CFD).....	33
1.8.1 Métodos Numéricos.....	34

---

1.8.2 Aplicações de CFD em processos de Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	38
1.9 Referências Bibliográficas .....	39
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2 Inativação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Listeria innocua</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i> em Leite Desnatado por Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP)	49
Resumo .....	49
Abstract .....	50
2.1 Introdução.....	51
2.2 Material e Métodos .....	53
2.2.1 Amostra .....	53
2.2.2 Equipamento .....	53
2.2.3 Preparo das Culturas.....	55
2.2.4 Inativação de Microrganismos por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	56
2.3 Resultados e Discussões .....	58
2.3.1 Temperaturas de Processo .....	58
2.3.2 Inativação de Microrganismos por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	59
2.4 Conclusão.....	67
2.5 Referências Bibliográficas .....	68
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3 Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) sobre Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> em Leite Desnatado .....	70
Resumo .....	70
Abstract .....	71
3.1 Introdução.....	72
3.2 Material e Métodos .....	73
3.2.1 Amostra .....	73

3.2.2	Equipamento .....	73
3.2.3	Microrganismos .....	75
3.2.4	Estudo do Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão sobre Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	75
3.2.5	Análise Estatística .....	80
3.3	Resultados e Discussões .....	81
3.3.1	Inativação de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	81
3.3.2	Determinação do Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Resistência Térmica de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	81
3.3.3	Efeito do Choque Térmico anterior ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na inativação de esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	83
3.3.4	Efeito da Temperatura de Entrada na Resistência de Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	84
3.3.5	Efeito da Recirculação.....	84
3.3.6	<i>Clostridium sporogenes</i> (PA 3679).....	85
3.4	Conclusão.....	86
3.5	Referências Bibliográficas .....	86

## **CAPÍTULO 4**

4	Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Atividade Enzimática de Fosfatase Alcalina e Lactoperoxidase em Leite Cru Desnatado....	90
	Resumo .....	90
	Abstract .....	91
4.1	Introdução.....	92
4.2	Material e Métodos .....	93
4.2.1	Amostra .....	93
4.2.2	Equipamento .....	93
4.2.3	Inativação Enzimática por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	94
4.2.4	Determinação da Atividade da Enzima Fosfatase Alcalina .....	95

4.2.5	Determinação da Atividade da Enzima Lactoperoxidase .....	96
4.2.6	Análise Estatística .....	97
4.3	Resultados e Discussões .....	97
4.3.1	Temperaturas de Processo .....	97
4.3.2	Inativação Enzimática por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	98
4.4	Conclusão.....	105
4.5	Referências Bibliográficas .....	105

## **CAPÍTULO 5**

5	Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Atividade de Protease Produzida por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	108
	Resumo .....	108
	Abstract .....	109
5.1	Introdução.....	110
5.2	Material e Métodos .....	112
5.2.1	Amostra .....	112
5.2.2	Equipamento .....	112
5.2.3	Enzima .....	113
5.2.4	Determinação da Atividade Proteolítica sobre as Amostras Processadas .....	115
5.2.5	Avaliação da Redução da Atividade Proteolítica por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	117
5.2.6	Análise Estatística .....	118
5.3	Resultados e Discussões .....	118
5.3.1	Produção da Protease por <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	118
5.3.2	Temperaturas de Processo .....	119
5.3.3	Avaliação da Redução da Atividade Proteolítica por Homogeneização a Ultra Alta Pressão .....	120
5.4	Conclusão.....	124
5.5	Referências Bibliográficas .....	124

**CAPÍTULO 6****6 Cálculo do Perfil de Velocidade de Escoamento do Fluido no Interior do Homogeneizador a Ultra Alta Pressão através de Fluidodinâmica Computacional**

127

Resumo .....	127
Abstract .....	128
6.1 Introdução.....	129
6.2 Material e Métodos .....	132
6.2.1 Mecanismo de Homogeneização .....	132
6.2.2 Regime do Fluxo .....	134
6.2.3 <i>Gap</i> da válvula x pressão de operação .....	137
6.2.4 Método Numérico .....	138
6.3 Resultados e Discussões .....	142
6.3.1 Cálculo do <i>gap</i> .....	142
6.3.2 Simulações.....	143
6.3.3 Perfis de Velocidade.....	145
6.4 Conclusão.....	151
6.5 Referências Bibliográficas .....	151

**CAPÍTULO 7****7 Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Cor e na Viscosidade de Leite Cru Desnatado .....**

Resumo .....	153
Abstract .....	154
7.1 Introdução.....	155
7.2 Material e Métodos .....	156
7.2.1 Amostra .....	156
7.2.2 Equipamento .....	156
7.2.3 Processos Realizados .....	157
7.2.4 Cor.....	158
7.2.5 Viscosidade .....	158

7.2.6	Análise Estatística .....	158
7.3	Resultados e Discussões .....	159
7.3.1	Cor.....	159
7.3.2	Viscosidade .....	160
7.4	Conclusão.....	161
7.5	Referências Bibliográficas .....	161
	CONCLUSÃO.....	163
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	165

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 2.1: Temperaturas verificadas em cada umas das pressões .....	59
Tabela 2.2: NRD observado nos ensaios preliminares de HUAP.....	60
Tabela 2.3: NRD observado nos ensaios de inativação de <i>Pseudomonas fluorescens</i> por HUAP .....	61
Tabela 2.4: NRD observado nos ensaios de inativação de <i>Listeria innocua</i> por HUAP .....	63
Tabela 2.5: NRD observado nos ensaios de inativação de <i>Lactobacillus helveticus</i> por HUAP .....	65
Tabela 3.1: Parâmetros empregados na realização do teste TDT .....	78
Tabela 3.3: Resistência Térmica de esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> antes e após o processo de HUAP .....	82
Tabela 3.4: Efeito da recirculação na inativação de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> .....	85
Tabela 4.1: Temperaturas verificadas em cada umas das pressões nos ensaios de HUAP .....	98
Tabela 4.2: Atividade Enzimática (A. E.) observada nos ensaios de inativação de fosfatase por HUAP.....	99
Tabela 4.3: Atividade Enzimática (A. E.) observada nos ensaios de inativação de lactoperoxidase por HUAP .....	102
Tabela 5.1: Confirmação da presença de protease no caldo .....	119
Tabela 5.2: Temperaturas realizadas em cada umas das pressões nos ensaios de HUAP .....	119
Tabela 5.3 Absorbâncias (a 570 nm) verificadas nos ensaios de avaliação da redução da atividade enzimática pelo processo de HUAP .....	121
Tabela 5.4 Atividade Enzimática verificada após o processo de HUAP.....	118
Tabela 6.1: Temperatura, densidade, viscosidade e número de Reynolds correspondentes.....	136
Tabela 6. 2: Resultados de pressão e vazão obtidos nas duas etapas de simulação .....	143

Tabela 7.1: Efeito do processo de HUAP nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  ..... 159  
Tabela 7.2: Efeito do processo de HUAP na viscosidade de leite cru desnatado 160

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.1: Representação do sistema plasmina no leite.....	26
Figura 2.1: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para <i>Pseudomonas fluorescens</i> 62	
Figura 2.2: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para <i>Listeria innocua</i> .....	64
Figura 2.3: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para <i>Lactobacillus helveticus</i> ...	66
Figura 4.1: Atividade Enzimática Percentual de Fosfatase Alcalina e Lactoperoxidase em função da Pressão .....	104
Figura 6.1: Válvula de Homogeneização STANSTED – dimensões em mm ..	133
Figura 6.2: Malha hexaédrica utilizada.....	141
Figura 6.3: Valores preditos pela correlação de Nakayama para o tamanho do <i>gap</i> em função da queda de pressão no interior da válvula de homogeneização	143
Figura 6.4: Sistema de coordenadas utilizado.....	144
Figura 6.5: Velocidade na entrada do <i>gap</i> .....	145
Figura 6.6: Perfis de pressão ao longo do <i>gap</i> .....	146
Figura 6.7: Perfis de velocidade ao longo do <i>gap</i> – pressão de 300 MPa .....	146
Figura 6.8: Perfis de velocidade na saída do <i>gap</i> .....	147
Figura 6.9: Pressão de homogeneização x velocidade máxima (saída do <i>gap</i> ) .	147
Figura 6.10: Velocidade na saída do <i>gap</i> .....	148
Figura 6.11: Linhas de fluxo – simulação a 300 MPa.....	149
Figura 6.12: Perfil de pressão na saída do <i>gap</i> .....	150

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo produtor mundial de leite, tendo produzido cerca de 23320 mil toneladas em 2005 (CNPGL, 2006). A produção brasileira de leite fluido cresceu aproximadamente 43% nos últimos 10 anos, sendo que a produção total em 2005 foi de 6,5 bilhões de litros segundo a Associação Brasileira do Leite Longa Vida. Considerando o total de leite fluido produzido no país, a participação de mercado do leite longa vida passou de cerca de 37,5% em 1996 para 73,9% em 2005. Isto ocorreu principalmente devido a maior praticidade e vida de prateleira do produto longa vida em relação ao leite pasteurizado (ABLV, 2006).

O leite é um produto de grande importância na alimentação humana, porque fornece uma proporção equilibrada de nutrientes. É um dos produtos alimentícios em estado líquido de maior volume atualmente vendido em todo o mundo. Sendo um produto muito complexo e altamente perecível, constitui-se num sistema cujo equilíbrio pode ser rompido em inúmeras situações, tanto decorrentes da inadequação da matéria-prima quanto dos processos tecnológicos (PETRUS, 2004).

O processo de esterilização UHT (Ultra High Temperature) é um dos métodos que permite a conservação e o prolongamento da durabilidade do leite à temperatura ambiente, eliminando todas as células vegetativas presentes e parte considerável dos microrganismos esporulados. As alterações nutricionais e organolépticas provocadas no produto por este tipo de processamento são menores do que aquelas advindas do processo de esterilização em batelada, mas ainda assim estas alterações existem. Além disso, o leite sofre algumas alterações durante o período de armazenamento que limitam o período de conservação. A principal causa destas alterações é a ação de lipases e proteases, próprias do leite (nativas) ou de origem bacteriana, que permanecem ativas após o tratamento térmico (GOMES, 1995).

A atividade proteolítica é responsável pelo encurtamento do período de estocagem por estar intimamente associada à desestabilização do produto.

Promove rarefação ou aumento da transparência, gelificação ou coagulação, e aparecimento de sabor amargo ou aumento gradual do nitrogênio não protéico (PRATA, 1991).

A aplicação da tecnologia de alta pressão como método não térmico de preservação de alimentos, vai ao encontro da crescente preferência do consumidor por alimentos minimamente processados e de alta qualidade, cujas alterações sejam mínimas em relação ao produto fresco. Entretanto, para que o processo seja adotado pela indústria de alimentos a segurança microbiológica do mesmo deve ser garantida (MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON, M. F., 1998).

Segundo Sizer, Balasubramaniam e Ting (2002), a validação do processamento de alimentos por alta pressão requer conhecimentos multidisciplinares, integrando microbiologia, física, química e engenharia para demonstrar a uniformidade e segurança do processo. Várias questões permanecem sem resposta com relação ao mecanismo de ação da pressão, injúria de esporos e uniformidade do tratamento aplicado. A composição do alimento pode exercer um efeito protetor, por isso é importante que a avaliação da resistência microbiana à alta pressão seja realizada em alimentos reais ao invés de soluções tampão. Desta forma, cada tipo de alimento deve ser investigado separadamente até que se tenha experiência suficiente para a construção de modelos generalizados.

A tecnologia de processamento de leite por homogeneização a ultra alta pressão pode ser uma alternativa à indústria de laticínios para aumentar a vida de prateleira durante a estocagem do leite cru anterior a processos de produção de leite UHT, queijos, achocolatados e outros produtos, já que inativa microrganismos e reduz a atividade de algumas enzimas. Como ocorreu com o tratamento térmico, é provável que a tecnologia comece a ser usada comercialmente antes que tenha sido totalmente compreendida cientificamente (SIZER; BALASUBRAMANIAM; TING, 2002).

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar o processamento de leite desnatado pela tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão.

### Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da homogeneização a ultra alta pressão na inativação de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium sporogenes* em leite desnatado.
- Avaliar o efeito da combinação de homogeneização a ultra alta pressão e tratamento térmico na destruição de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em leite desnatado.
- Avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase em leite cru desnatado.
- Avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* em leite desnatado.
- Calcular através de fluidodinâmica computacional (CFD) o perfil de velocidade do fluido no interior da válvula de homogeneização a ultra alta pressão, variando-se a pressão aplicada.
- Avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) e na viscosidade de leite cru desnatado.

## 1 Revisão Bibliográfica

### 1.1 A Preservação de Alimentos pelo Método de Alta Pressão

A aplicação de alta pressão apresenta-se como uma tecnologia atrativa de processamento para preservação de alimentos. À temperatura ambiente, pressões na faixa de 200 a 600 MPa em processos hidrostáticos reduzem o número de microrganismos e inativam enzimas envolvidas na deterioração de alimentos, enquanto o produto retém seu frescor ou aparência de recém preparado, características organolépticas e qualidade nutricional (HEIJI et al, 2003).

Desde a introdução no mercado de produtos processados por alta pressão hidrostática, em 1990, a gama de produtos foi se expandindo gradualmente e atualmente inclui: geléias de frutas, molhos, sucos de fruta, purê de abacate e presunto. O efeito da alta pressão sobre os microrganismos é comparável ao da pasteurização e os produtos apresentam vida útil prolongada sob refrigeração. Para que a esterilidade comercial seja atingida e o produto possa ser armazenado à temperatura ambiente os esporos bacterianos também precisam ser inativados (HEIJI et al, 2003). Sendo assim, alimentos de baixa acidez esterilizados por alta pressão ainda não estão disponíveis no mercado. Com a maturação da tecnologia e conseqüente redução do custo, certamente a mesma passará a ser aplicada comercialmente em produtos como suco de laranja e leite (SIZER; BALASUBRAMANIAM; TING, 2002).

É provável que a aplicação comercial da alta pressão em alimentos seja utilizada em combinação com outro método de processamento quando a finalidade do tratamento for a inibição de microrganismos ou inativação enzimática. Isto porque a maior parte dos esporos bacterianos é pouco afetada pela alta pressão hidrostática e as enzimas são parcialmente afetadas, podendo ser necessário inativá-las pelo calor para impedir perda de qualidade dos alimentos. O acúmulo de dados nestas áreas permitirá o estabelecimento de padrões para tempos de exposição e demais parâmetros de processo (HOOVER et al, 1989).

Existem dois métodos utilizados para o processamento de alimentos por alta pressão: o método de alta pressão hidrostática (isostática), no qual o produto é processado já dentro da embalagem final, e o método de homogeneização a ultra alta pressão ou alta pressão dinâmica, onde o produto é processado de forma contínua e depois embalado de forma asséptica (MERMELSTEIN, 1999).

### **1.1.1 Método de Alta Pressão Hidrostática (Isostática)**

A aplicação do processo de alta pressão hidrostática em alimentos é reconhecida desde 1890 como um método potencial de preservação de alimentos pela sua habilidade em inativar microrganismos, certas enzimas e modificar as propriedades funcionais de alguns constituintes do alimento (CHEFTEL, 1992 apud MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON. M. F., 1998).

O princípio fundamental da técnica é sua habilidade em romper as ligações secundárias e terciárias das moléculas enquanto as ligações covalentes não são afetadas, proporcionando maior retenção das características sensoriais e nutricionais do produto (MACFARLANE, 1985 apud MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON. M. F., 1998).

O processo de Alta Pressão Hidrostática consiste em submeter o produto a alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio que transfere pressão ao produto. Baseia-se no princípio de Le Chatelier, segundo o qual qualquer fenômeno acompanhado por uma redução de volume é favorecido pelo aumento de pressão e vice-versa, e no princípio isostático, que indica que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através de uma amostra biológica (CHEFTEL, 1995).

No processamento hidrostático, o produto é embalado em uma garrafa ou bolsa plástica e colocado no interior do vaso de pressão para ser processado. O processamento de produtos líquidos pode ser realizado através de um sistema semicontínuo (fora da embalagem) utilizando três vasos de pressão e um sistema de válvulas automáticas de modo que na primeira câmara a pressão do produto é

aumentada até a pressão de processo, quando é liberado; na segunda câmara o produto fica sob pressão e tempo especificados para o processo; na terceira câmara o produto é descomprimido e encaminhado para o envase asséptico (MERMELSTEIN, 1999).

A literatura apresenta diversos trabalhos em que os autores investigaram os efeitos da alta pressão hidrostática na inativação de microrganismos (HOOVER,1993; PATTERSON et al, 1995; GERVILLA et al, 1997a; GERVILLA et al, 1997b; GERVILLA et al, 1999a; GERVILLA et al, 1999b; RITZ et al,2000).

### **1.1.2 Método de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

O processo de homogeneização tem sido aplicado na indústria de alimentos desde a metade do século XX na redução do tamanho de partículas de emulsões e suspensões, aumentando sua estabilidade. Com o passar dos anos, a demanda por produtos de maior vida de prateleira e com maior estabilidade estimulou o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de emulsões. Esta tecnologia é baseada na utilização de pressões muito elevadas e em equipamentos com novo desenho. O desenvolvimento de aplicações do processo de homogeneização a alta pressão permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na medida em que causa inativação microbiana. Inicialmente desenvolvido para a indústria de laticínios, atualmente o processo é aplicado pela indústria farmacêutica, química e de biotecnologia para dispersar, misturar e processar emulsões e suspensões (DIELS et al, 2004).

O processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) é também chamado de Alta Pressão Dinâmica (APD). Neste trabalho optou-se por utilizar a denominação Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP). O referido processo é de base contínua e utiliza fundamentalmente um homogeneizador de ultra alta pressão com o intuito de romper células. O produto é bombeado por dois intensificadores de pressão, sendo forçado a fluir através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muito elevada através do orifício (200 m/s a 300 MPa, FLOURY et al, 2004), e a expansão resultante é considerada

como um dos fatores responsáveis pela ruptura das células dos microrganismos, causando mínimas alterações nas células dos alimentos.

Na literatura há muita controvérsia sobre o mecanismo real de destruição das células pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão. Alguns autores propuseram a cavitação e as ondas de choque e impulsos de pressão gerados no colapso das cavidades (SAVE et al, 1994 apud DIELS et al, 2004). Outros acreditam que o impacto das células contra as paredes da válvula do homogeneizador é a principal causa para a ruptura das mesmas (ENGLER; ROBINSON, 1981; MOORE; HOARE; DUNNILL, 1990). Mecanismos como turbulência, velocidade e magnitude da queda de pressão e viscosidade dinâmica também foram propostos (DOULAH; HAMMOND; BROOKMAN, 1975). Dois parâmetros afetam fortemente a inativação microbiana pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão: a viscosidade do fluido e a temperatura (MILLER; ROGOWSKI; KELLY, 2002).

A viscosidade é inversamente proporcional a inativação, níveis mais baixos de inativação são obtidos em fluidos mais viscosos. Isto pode ser explicado pela redução da cavitação, turbulência e pressão de impacto de fluidos viscosos. Um aumento na temperatura de entrada da amostra (de 4 para 24 °C) a um certo nível de pressão resulta em aumento na inativação microbiológica pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão. Como a viscosidade do fluido geralmente diminui com o aumento de temperatura e vice-versa, este efeito da temperatura na inativação microbiana pode ser parcialmente explicado como um efeito indireto da viscosidade do fluido (THIEBAUD et al, 2003).

Comparando-se as formas de ação do tratamento por alta pressão hidrostática e homogeneização a ultra alta pressão foram observadas ações distintas. A alta pressão hidrostática estabiliza pontes de hidrogênio, induz mudanças irreversíveis como a dissociação de complexos protéicos e mudanças de conformação. O tratamento por homogeneização a ultra alta pressão ativa hidrogenases, provoca mudanças conformacionais e estresse protéico, induzindo

as células dos microrganismos a várias mudanças físico-químicas (FANTIN et al, 1996).

Na prática, o tratamento por homogeneização a ultra alta pressão tem a capacidade de desintegrar células a pressões mais baixas do que o processo por alta pressão hidrostática, minimizando os danos causados nos alimentos pela pressão. A destruição dos microrganismos, segundo Popper e Knorr (1990), se dá pela repentina perda de pressão que ocorre na válvula de expansão, pela torção e por estresse causado pelo choque das ondas de cavitação. Bactérias Gram positivas são menos susceptíveis à ação da pressão, uma vez que apresentam uma parede mais rígida do que as Gram negativas.

Lanciotti et al (1994) estudaram o efeito da homogeneização a alta pressão entre 15 e 200 MPa nas reduções das contagens de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *B. subtilis* e *Yarrowia lipolytica* em emulsões de água/óleo e óleo/água e observaram que o tratamento pode causar reduções instantâneas nas contagens iniciais desses microrganismos podendo provocar danos celulares irreversíveis. O tratamento a altas pressões somado ao armazenamento a baixas temperaturas (3-4°C) fez com que as células de *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* e *Y. lipolytica* que não foram inativadas pelo tratamento a alta pressão, apresentassem uma fase lag mais extensa, dependente do número de sobreviventes.

Fantin et al (1996) compararam o efeito da alta pressão hidrostática e da homogeneização a ultra alta pressão na redução de células viáveis de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Y. lipolytica* e observaram que este último microrganismo apresentou-se mais susceptível a alta pressão hidrostática com uma destruição de 2 ciclos logarítmicos quando submetida ao tratamento a 400 MPa, enquanto a *S. cerevisiae* apresentou apenas a redução de 1 ciclo nas mesmas condições de tratamento. Quando tratadas por homogeneização a 150 MPa, foi observada uma redução aproximada de 3 ciclos logarítmicos para as duas leveduras.

Lanciotti et al (1996) avaliaram o efeito da temperatura de crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *Y. lipolytica* na resistência dos mesmos ao tratamento com homogeneizador a alta pressão entre 10 e 160 MPa. Os autores verificaram que *L. monocytogenes* e *Y. lipolytica* apresentaram maior resistência quando cultivadas a 13°C; enquanto, *E. coli* e *S. aureus* apresentaram melhor crescimento quando cultivadas a 20°C ou temperaturas superiores. Segundo os autores, a composição do alimento também influencia a resistência a altas pressões da população bacteriana.

O efeito da homogeneização de leite integral, leite desnatado e gordura láctea na atividade da nisina contra *Listeria innocua* foi avaliado por Zapico et al (1999). Amostras inoculadas com 10<sup>5</sup> UFC/mL foram tratadas a 30°C com 100 IU/mL de nisina, homogeneizadas a 20 MPa ou ambos os procedimentos. A homogeneização de amostras de leite desnatado contendo nisina resultou na redução de cerca de 20% de atividade da mesma, entretanto ainda assim uma redução de cerca de 3 ciclos logarítmicos nas contagens de *Listeria innocua* foi verificada.

Kheadr et al (2002) estudaram o efeito da aplicação de homogeneização a ultra alta pressão em leite (5 ciclos a 200 MPa). Os autores verificaram a inativação de 3 a 4 ciclos de *Listeria innocua*, além de reduções consideráveis no tamanho das micelas de caseína e glóbulos de gordura.

Wuytack et al (2002) compararam a resistência de diversas bactérias pertencentes aos dois grandes grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, à homogeneização a ultra alta pressão (100-300 MPa) e à alta pressão hidrostática (200-400 MPa). Nos tratamentos com alta pressão hidrostática foram observadas grandes diferenças com relação à resistência dos microrganismos de um mesmo grupo, o que não ocorreu quando submetidos à homogeneização a ultra alta pressão.

A injúria que ocorre em *Salmonella enterica* Sorovar Typhimurium após ser submetida a tratamentos a alta pressão hidrostática (300 MPa) e homogeneização

a ultra alta pressão (100 e 200 MPa) foi comparada por Wuytack et al (2003). Os resultados apontaram que o processo de alta pressão hidrostática causa injúria nas células, o que não ocorre com o processo de homogeneização a ultra alta pressão. Isto é atribuído ao fato do processo hidrostático ter múltiplos alvos de ação, sendo que para que ocorra a inativação completa é necessário que alguns destes alvos sejam atingidos. Já no processo de homogeneização, a inativação ocorre em função de danos físicos ou estruturais e não fisiológicos ou metabólicos, resultando em pouca ou nenhuma injúria.

Dosualdo e Cristianini (2003) avaliaram o efeito da homogeneização a ultra alta pressão nas atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase em água de coco na faixa de 50 a 300 MPa. Os resultados demonstraram que mesmo a 300 MPa, a redução nas atividades enzimáticas é pequena, 9,3% para a polifenoloxidase e 4,0% para a peroxidase. O mesmo autor verificou que pressões superiores a 250 MPa foram capazes de inativar mais de 7 ciclos logarítmicos de *Lactobacillus fructivorans* enquanto que pressões superiores a 200 MPa inativaram cargas da ordem de  $10^5$  UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* em água de coco.

Campos (2004) analisou o efeito da homogeneização a ultra alta pressão na destruição de *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* em suco de laranja e verificou que pressões superiores a 250 MPa são capazes de reduzir 7 ciclos logarítmicos do *Lactobacillus* e 5,6 ciclos da levedura. O autor verificou ainda que pressões da ordem de 300 MPa foram capazes de causar uma inativação de cerca de 67% na enzima Pectinametilesterase.

Diels et al (2004) avaliaram o efeito da temperatura na inativação de *Escherichia coli* por homogeneização a ultra alta pressão somente através da viscosidade do fluido. Nos ensaios, a pressão variou de 100 a 300 MPa e a temperatura inicial de 5 a 50 °C. A viscosidade foi ajustada com etilenoglicol para que fosse sempre a mesma independente da temperatura (abaixo de 45 °C). Os resultados demonstraram que a influência da temperatura na inativação microbiológica por homogeneização a ultra alta pressão deve-se exclusivamente à

viscosidade do fluido. Os autores desenvolveram e validaram um modelo matemático que descreve a inativação como função da pressão de homogeneização e da viscosidade. O efeito da temperatura está implícito no efeito da viscosidade.

O efeito da homogeneização a ultra alta pressão na atividade antimicrobiana das enzimas lisozima e lactoperoxidase contra uma seleção de microrganismos Gram positivos e Gram negativos inoculados em leite desnatado foi avaliado por Vannini et al (2004). Os autores concluíram que a adição das enzimas aumentou o efeito instantâneo da pressão em praticamente todas as espécies testadas. Além disso, a combinação de enzima e homogeneização a alta pressão afetou significativamente a recuperação e o crescimento de várias das espécies testadas. A hipótese formulada pelos autores é que a interação entre homogeneização a ultra alta pressão e lisozima ou lactoperoxidase está associada a modificações conformacionais das duas proteínas e conseqüente aumento de sua atividade.

## **1.2 A Aplicação de Alta Pressão para Inativação de Esporos Bacterianos**

Os esporos são formas dormentes das bactérias esporuladas que se desenvolvem em condições desfavoráveis ao crescimento de células vegetativas. A estabilidade dos mesmos é função da microestrutura e composição que são diferentes das da célula vegetativa. A alta resistência térmica dos esporos é atribuída à baixa quantidade de água e à mineralização do *core* que tem um papel importante na manutenção do estado de desidratação do esporo (DEETH; DATTA, 2002).

Algumas bactérias produtoras de esporos, por exemplo, *Clostridium botulinum*, são patogênicas e representam os maiores riscos à saúde pública se as condições de esterilização forem inadequadas. Outros, entretanto, são organismos capazes de provocar deteriorações sérias se não forem destruídos. Os esporos de algumas bactérias deteriorantes são extremamente resistentes ao calor e são somente parcialmente destruídos pelas condições de aquecimento

empregadas no processo UHT. Os esporos mais resistentes ao calor são os de algumas espécies de *Bacillus* como *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Em alguns casos a intensidade dos tratamentos térmicos que seriam necessários para a inativação total dos esporos levaria a alterações químicas inaceitáveis no produto (DEETH; DATTA, 2002).

As tecnologias não térmicas de preservação de alimentos apresentam grande potencial na redução do número de esporos e podem ser divididas em duas grandes categorias:

- Tecnologias de alta energia: alta pressão, pulso elétrico, ultra-som.
- Tecnologias de separação: microfiltração, centrifugação/bactofugação.

Entretanto, os esporos bacterianos conhecidos por sua resistência a tratamentos físicos e químicos como calor e irradiação são também resistentes ao tratamento por alta pressão (MAGGI et al, 1996).

A maior parte dos dados publicados trata da resistência à pressão de esporos de *Bacillus*, e de tratamentos envolvendo exclusivamente o uso de alta pressão hidrostática juntamente com um tratamento térmico brando propostos para a sua inativação (GOULD, 1973).

Segundo Deeth e Datta (2002), vários autores relataram a inviabilidade da aplicação de alta pressão a temperaturas iguais ou inferiores à temperatura ambiente para a inativação de esporos, sendo que o efeito esporicida aumenta com a temperatura, pressão e tempo de tratamento. O maior efeito da alta pressão no tratamento de esporos é a redução de sua estabilidade ao calor. Uma razão para isto é a germinação induzida pela pressão que confere a eles maior susceptibilidade ao calor. Por exemplo, tratamentos a 300 MPa e 500 MPa a 60°C por 1 minuto reduziram a resistência térmica ( $D_{100^\circ\text{C}}$ ) de esporos de *C. pasteurianum* em 33 e 50%, respectivamente. A pressurização a 200 MPa com rápida descompressão (< 2 ms) reduziu drasticamente o tempo de redução decimal (D) de esporos de *B. stearothermophilus* de 3000 min a 100°C para 6 min

a 95 °C (HAYAKAWA et al 1998). Os autores verificaram que a resistência térmica dos esporos não está relacionada com sua resistência à pressão. Além disso, ocorre redução da resistência térmica de esporos tratados por alta pressão, o que pode permitir a esterilização de produtos de baixa acidez a temperaturas inferiores às normalmente empregadas, melhorando a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos.

Demonstrou-se também que a germinação de esporos pode ser induzida a pressões relativamente baixas (60 a 100 MPa). Assim, um tratamento inicial com baixa pressão seguido por um tratamento a pressões moderadas (300 MPa) para inativar os esporos germinados foi proposto por diversos autores (CLOUSTON; WILLS, 1969; SALE et al, 1970 apud MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON. M. F., 1998).

Esta indução da iniciação ou estímulo à germinação pela pressão pode ser comparada àquela produzida pelo choque térmico. Ambos os tratamentos podem sensibilizar uma parte da população de esporos para um tratamento de preservação subsequente, reduzindo a severidade total do tratamento necessário para a inativação dos esporos (GOULD, 1973).

Mills, Earnshaw e Patterson (1998) avaliaram o efeito de vários tratamentos com pressão (incluindo pressão apenas e combinada com outros fatores) em *Clostridium sporogenes*, um organismo diretamente relacionado e com propriedades fisiológicas semelhantes ao *Clostridium botulinum*. Os esporos resistiram à alta pressão, com tratamentos de 600 MPa por 30 min a 20 °C não sendo capazes de causar inativação significativa. Combinações de tratamentos incluindo calor e pressão aplicados simultânea ou seqüencialmente foram mais efetivos na inativação de esporos. Assim, a aplicação de 400 MPa a 60 °C por 30 min resultou em 80,6% de germinação, já 80 °C por 10 min seguido de 400 MPa por 30 min resultou em 84,6% de germinação. Um ciclo de pressão de 60 MPa seguido por 400 MPa a 60 °C produziram 92,8% de germinação. De modo geral os processos resultaram em menos de 3 ciclos logarítmicos de destruição microbiana e verificou-se que esporos deste microrganismo não podem ser inativados apenas

pela aplicação de pressão, demonstrando que para a inativação de esporos, a alta pressão deve ser combinada com outros métodos de preservação.

Apesar do nível de inativação alcançado com um único ciclo de pressão não ser da magnitude requerida para a esterilização de alimentos, isto pode ser aumentado pelo uso de ciclos múltiplos de baixa e alta pressão. Este tipo de processo pode eliminar esporos superdormentes pela repetição de indução à germinação seguida por inativação dos esporos sensibilizados. Esporos superdormentes normalmente estão presentes em qualquer população e vão apresentar atraso na germinação, sendo considerados o principal limite da aplicação de tratamentos de preservação como a alta pressão (GOULD, 1973). Segundo Mills, Earnshaw e Patterson (1998) o uso de ciclos múltiplos de baixa e alta pressão provavelmente será mais aceito pela indústria de alimentos do que a aplicação de um pré-tratamento térmico subletal para a inativação de esporos.

Lechowich (1993) estudou o efeito da alta pressão hidrostática sobre esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus coagulans* e constatou que a eficiência do processo é baixa e condicionada ao tempo e temperatura de tratamento, sugerindo que o uso de alta pressão deva ser somado a outro método de conservação, como redução do pH, que impossibilite a germinação de esporos.

Hayakawa et al (1994) desenvolveram um método para inativar esporos de *Bacillus stearothermophilus* com aquecimento mínimo. A inativação foi atingida destruindo-se os esporos após 6 ciclos de pressão oscilatória a 70°C e 600 MPa, mas a inativação completa não foi atingida após 60 minutos de pressurização contínua. Quatro ciclos de 5 minutos de pressurização a 600 MPa reduziram a contagem de esporos de  $10^6$  para  $10^2$  UFC/mL, e 6 ciclos de  $10^6$  para  $<10^0$  UFC/mL, quando todos os esporos foram rompidos. A inativação dos esporos foi dependente da velocidade de expansão adiabática.

O efeito combinado da alta pressão hidrostática e da irradiação para a eliminação de esporos de *Clostridium sporogenes* em peito de frango foi avaliado por Crawford et al (1996). Inicialmente foi determinada a combinação ótima de

pressão, temperatura e tempo que resultaram em máxima redução dos esporos. A temperatura ambiente, 680 MPa por 60 minutos causaram uma redução de cerca de 5 ciclos logarítmicos. O valor calculado para o parâmetro D de irradiação do *Clostridium sporogenes* foi de 4,1 kGy. Este valor decresceu para aproximadamente 2 kGy após submeter as amostras a 6800 atm, a 80 °C por 20 minutos, indicando que a aplicação de alta pressão hidrostática antes da irradiação pode permitir o uso de doses menores.

Roberts e Hoover (1996) avaliaram a sensibilidade de esporos de *Bacillus coagulans* a alta pressão hidrostática, calor, acidez e nisina. Uma redução de pelo menos 6 ciclos logarítmicos foi alcançada a 400 MPa, a 70 °C, em pH 4 por 30 minutos, quando do plaqueamento em ágar nutriente contendo nisina.

Wuytack, Boven e Michiels (1998) estudaram o efeito da alta pressão hidrostática na indução da germinação de esporos de *Bacillus subtilis*. Foram avaliadas pressões moderadas (100 MPa) e pressões elevadas (500 a 600 MPa). Os resultados demonstraram que os esporos germinados a 100 MPa mostraram-se mais sensíveis a tratamentos subsequentes de pressão (superiores a 200 MPa), luz UV e peróxido de hidrogênio do que aqueles germinados a 600 MPa.

O efeito de germinação e de inativação da pressurização recíproca (6 ciclos de 5 minutos de compressão e descompressão rápida) em esporos de *Bacillus subtilis* foi medido por Furukawa et al (2000). A faixa de pressão testada variou de 200 a 500 MPa, a temperatura de 25 a 55 °C e o tempo total de processo foi de 30 minutos. Os resultados demonstraram que a compressão pode iniciar a germinação, ao passo que a descompressão rápida não pode, mas é capaz de inativar esporos germinados.

Furukawa e Hayakawa (2001) estudaram o efeito da temperatura na inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* por pressão hidrostática na faixa de 10 a 100 MPa. Os autores concluíram que pressões da ordem de 60 a 100 MPa combinadas com temperaturas entre 75 a 95 °C foram capazes de causar uma redução de cerca de 5 ciclos logarítmicos no citado microrganismo.

Moerman et al (2001) inocularam *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* em amostras de carne de porco moída e as submeteram a diferentes combinações de alta pressão hidrostática, temperatura e tempo (50 a 400 MPa, 20 a 80°C e 1 a 60 minutos). Os resultados demonstraram que processos a 400 MPa, 50°C por 30,5 minutos foram capazes de causar uma redução de 2 a 3 e 5 a 6 ciclos logarítmicos nas contagens de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*, respectivamente.

Wuytack e Michiels (2001) submeteram suspensões de esporos de *Bacillus subtilis* a tratamentos por alta pressão a 100 e 600 MPa a 40°C e em uma faixa de pH de 3 a 8. A inativação máxima de esporos nestas condições foi de 80% e não foi aumentada em valores inferiores de pH. Entretanto, níveis maiores de inativação foram obtidos quando esporos foram primeiramente pressurizados em pH neutro e então expostos por 1 hora a valores de pH inferiores. Esta grande diferença na inativação pode ser explicada pelo fato da indução dos esporos à germinação pela aplicação de pressão (que reconhecidamente ocorre em pH neutro), ser inibida em valores inferiores de pH (<5). Aplicação de pressão em pH's baixos tornou os esporos mais sensíveis à inativação por calor, sugerindo que esporos desmineralizados foram formados. Apesar do tratamento com pressão dos esporos a baixos pH's (<5) tornar os esporos mais sensíveis ao tratamento térmico a 80°C, pode-se concluir que a indução à germinação do *Bacillus subtilis* pela aplicação de pressão é inibida em pH baixo, porque não foi observado decréscimo na densidade óptica nas suspensões de esporos e porque os esporos permaneceram resistentes ao tratamento térmico a 60°C, temperatura que destrói rapidamente esporos realmente germinados.

O efeito da combinação de alta pressão hidrostática (207, 414 ou 621 MPa) aliado a temperaturas de 45, 71 ou 90°C na inativação de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de maçã por 1, 5 ou 10 minutos foi investigado por Lee et al (2002). Os resultados demonstraram que 207 MPa a 45°C por 10 minutos ou a 71°C por 1 minuto resultaram em reduções superiores a 3,5 ciclos logarítmicos nas contagens de esporos viáveis, tratamentos a 414 ou

621 MPa a 71 °C por 1 minuto resultaram em reduções superiores a 4 ciclos e tratamentos a 414 ou 621 MPa a 71 °C por 10 minutos reduziram o número de esporos viáveis para níveis não detectáveis (redução superior a 5,5 ciclos logarítmicos).

Furukawa et al (2003) investigaram o mecanismo de inativação de esporos bacterianos pelo tratamento de pressurização recíproca. Esporos de *Bacillus subtilis* foram tratados a 25, 35, 45 e 55 °C a 200, 300 e 400 MPa por 30 minutos. Análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que os esporos foram afetados morfológica e estruturalmente. Os autores acreditam que o mecanismo seja o seguinte: o tratamento com alta pressão hidrostática iniciou a germinação dos esporos bacterianos e os ciclos de descompressão rápida causaram ruptura, injúria e inativação dos esporos germinados.

Heiji et al (2003) apresentaram dois mecanismos de inativação de esporos. A pressões e temperaturas mais baixas, a pressão induz a germinação de esporos e estes são inativados pela aplicação de pressão na seqüência. A altas temperaturas, um mecanismo de inativação direta dos esporos sem que ocorra germinação dos mesmos é mais provável. As curvas de inativação observadas nestas condições normalmente não seguem a cinética de primeira ordem, sendo de difícil interpretação.

A inativação de esporos de *Bacillus cereus* em queijo por alta pressão hidrostática com adição de nisina ou lisozima foi estudada por López-Pendemonte et al (2003). Os queijos inoculados foram submetidos a 60 MPa, a 30 °C por 210 minutos para germinação seguidos de ciclos de 300 ou 400 MPa ou ambos a 30 °C por 15 minutos para destruição das células vegetativas. A aplicação de um segundo ciclo de inativação a 400 MPa com a adição de 1,56 mg/mL de lisozima resultou na redução de 2,4 ciclos logarítmicos nas contagens, sendo o melhor resultado obtido.

Reddy et al (2003) investigaram o efeito do processo de alta pressão hidrostática a altas temperaturas na inativação de esporos de *Clostridium*

*botulinum* tipo A. Os autores concluíram que tratamentos a alta pressão (827 MPa) e temperatura (75 °C) resultaram em inativação parcial dos esporos (3 ciclos logarítmicos de redução) de *Clostridium botulinum* tipo A cepas BS-A e 62-A em tampão fosfato ou em misturas de carne de caranguejo. Os autores sugerem a realização de estudos empregando temperaturas superiores (acima de 120 °C) para a produção de produtos comercialmente estéreis.

Margosch et al (2004) estudaram a inativação de esporos de 7 linhagens de *Clostridium botulinum*, 5 espécies de *Bacillus* e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* pelo emprego de alta pressão hidrostática (600 a 800 MPa) e temperatura (80 a 116 °C) em cenoura ralada. Uma grande variação na resistência à pressão dos esporos de *Clostridium botulinum* foi observada. A redução após tratamentos a 600 MPa, a 80 °C por 1 segundo variou de 0 a 5,5 ciclos. A resistência a pressão das espécies avaliadas não pode ser correlacionada com a resistência térmica. Os autores propõem a utilização de *Bacillus amyloliquefaciens*, um microrganismo mesófilo formador de esporos altamente resistentes à pressão, como alvo não patogênico no desenvolvimento de processos de alta pressão.

Um modelo para a inativação de esporos bacterianos por calor úmido e alta pressão hidrostática foi desenvolvido por Rodriguez et al (2004). Uma fórmula para prever a inativação e a letalidade acumulada de esporos bacterianos por calor úmido e alta pressão foi derivada baseando-se nos princípios de termodinâmica clássica e cinética. O modelo foi validado experimentalmente processando-se *Clostridium botulinum* (60 a 75 °C) e *Bacillus stearothermophilus* (92 a 110 °C) na faixa de 500 a 700 MPa. A equação ajustada foi capaz de explicar mais de 86% da taxa de variação, o que foi considerado satisfatório pelos autores.

Optsal et al (2004) avaliaram a germinação e subsequente inativação de esporos de *Bacillus cereus* em leite através da aplicação de alta pressão hidrostática. Os resultados demonstraram que tanto a aplicação de um único tratamento (500 MPa a 60 °C por 30 minutos) quanto a aplicação de 200 MPa a 45 °C por 30 minutos seguido por um tratamento térmico de 60 °C por 10 minutos

foram capazes de inativar cerca de 6 ciclos logarítmicos do microrganismo em estudo.

Gao e Jiang (2005) otimizaram as condições de processo para a inativação de esporos de *Bacillus subtilis* por alta pressão hidrostática e calor moderado através da metodologia de superfície de resposta. As condições de processos variaram de 30 a 60 °C, 200 a 600 MPa e 10 a 20 minutos. Os parâmetros ótimos para redução de 6 ciclos logarítmicos nas contagens dos esporos foram: 14 minutos a 479 MPa a 46 °C. O modelo foi validado experimentalmente.

O efeito da alta pressão hidrostática em células vegetativas e esporos de microrganismos aeróbios e anaeróbios em *Marengo* de porco, um produto particulado com pH 5,8 foi avaliado por Moerman (2005). As amostras foram processadas a 400 MPa durante 30 minutos a 20 e 50 °C. Os resultados indicaram que nos processos a 20 °C a aplicação de alta pressão não pode ser utilizada isoladamente. Já os tratamentos realizados a 50 °C demonstraram que limitações na transferência de calor de alimentos particulados devem ser consideradas no estabelecimento do processo.

### **1.3 O Efeito da Alta Pressão sobre as Enzimas**

Enzimas são classes especiais de proteínas nas quais a atividade biológica parte de um sítio ativo mantido pela conformação tridimensional da molécula. Pequenas mudanças no sítio podem levar à perda da atividade da enzima. Como a desnaturação protéica é associada a mudanças conformacionais, estas podem mudar a funcionalidade com perda da atividade biológica e mudanças específicas do substrato.

Proteínas são estruturas mantidas por interações entre a cadeia protéica (seqüências de aminoácidos) e o solvente ao redor. Mudanças nos fatores externos, como pressão e temperatura, podem perturbar o complexo balanço das interações intramoleculares entre solvente-proteína e conseqüentemente, levar ao dobramento ou desnaturação da cadeia de peptídeos. Os arranjos estruturais

presentes na proteína sob pressão são governados pelo princípio de Le Chatelier. A redução do volume acompanhando a desnaturação surge da formação ou ruptura de ligações não covalentes e de rearranjos das moléculas de solvente (HENDRICKX et al, 1998).

A respeito das mudanças no volume conformacional, ao menos a baixas temperaturas, ligações covalentes são pouco afetadas pela alta pressão, e conseqüentemente a estrutura primária das proteínas permanece intacta durante o tratamento sob pressão. Por outro lado, mudanças na estrutura secundária ocorrem em pressões muito altas e estas levam a uma desnaturação irreversível. Isto pode ser explicado pelo fato das pontes de hidrogênio, que são responsáveis pela manutenção da estrutura helicoidal (secundária) dos peptídeos, serem favorecidas a baixas pressões e serem rompidas a altas pressões. A ruptura de ligações iônicas também é fortemente afetada pelo aumento da pressão. Mudanças significativas na estrutura terciária são observadas a pressões maiores que 200 MPa. Proteínas multiméricas (estrutura quaternária), unidas por ligações não covalentes são dissociadas por uma pressão comparativamente baixa (menor que 150 MPa) (CAMPOS, 2004).

Ao contrário dos tratamentos térmicos onde tanto ligações iônicas como não-covalentes são afetadas, o processamento por alta pressão em temperatura ambiente rompe apenas ligações químicas relativamente fracas (pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e iônicas). Alterações na conformação das proteínas podem causar mudanças nas suas propriedades funcionais e por isso o tratamento a alta pressão de alimentos pode ser utilizado para criar novos produtos com textura e sabor diferenciados. Em geral pressões acima de 300 MPa a temperatura ambiente causam desnaturação protéica irreversível, enquanto que pressões menores resultam em mudanças reversíveis na estrutura da proteína.

Os efeitos da alta pressão sobre enzimas podem ser divididos em duas classes. Na primeira, pressões relativamente baixas (menores que 100 MPa) têm ativado algumas enzimas. Esse efeito de estímulo é somente observado em enzimas monoméricas. Por outro lado, pressões muito maiores, geralmente

induzem a inativação enzimática. Com respeito à inativação por pressão, existem quatro grupos de enzimas, baseando-se na perda e recuperação da atividade: (i) inativação completa e irreversível; (ii) inativação completa e reversível; (iii) inativação incompleta e irreversível; (iv) inativação incompleta e reversível (HENDRICKX et al, 1998).

#### **1.4 O Leite e o tratamento térmico tradicional**

O Leite é um fluido biológico complexo, cuja composição e características físicas variam de espécie para espécie, refletindo a necessidade dietética da cria. O constituinte mais abundante do leite é a água e dependendo da espécie do animal apresenta quantidades variadas de lipídeos, carboidratos e proteínas (VARMAN; SUTHERLAND, 1997).

Em função do seu valor nutritivo, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade (pH=6,7) o leite é um excelente meio para a multiplicação de microrganismos. Mesmo quando obtido em condições assépticas, o leite irá conter microrganismos que estavam presentes nos canais de secreção das glândulas mamárias do animal (ZACARCHENCO, 2000). Segundo Haynes (1996), o leite cru fresco contém uma microbiota variando de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, proveniente da superfície da pele do animal, dos equipamentos de ordenha e do manuseio pelos operadores. Entretanto, o grau de contaminação pode ser ainda maior em função das condições de manuseio e ordenha.

A legislação brasileira define leite UHT como leite homogeneizado submetido durante 2 a 4 segundos a temperaturas entre 130 e 150 °C (BRASIL, 1997).

Segundo Hayes (1996), a aparência, a qualidade nutricional e o sabor do leite UHT e do leite pasteurizado são próximos, excetuando-se o fato de que o leite UHT deve se manter adequado para o consumo por vários meses, à temperatura ambiente.

Existem duas formas de processo UHT. O primeiro é o aquecimento indireto, em que o leite é aquecido em um trocador de calor, não havendo contato entre o mesmo e o vapor. Já no aquecimento direto pode ocorrer injeção de vapor no leite ou infusão de leite no vapor. O leite é então mantido sob pressão no retardador tubular por alguns segundos seguindo para a câmara de expansão a vácuo onde é feita a eliminação da água incorporada ao produto bem como de *off-flavors*. A seguir o produto é envasado assepticamente.

Zacarchenco (2000) apresenta uma ampla revisão sobre a microbiologia do leite. A microbiota do leite cru é bastante diversificada, podendo estar presentes espécies de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* e coliformes. Além disso, animais infectados introduzem bactérias patogênicas no leite, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp e outros. Varnam e Sutherland (1996), citam ainda *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* como contaminantes potenciais do leite cru. No caso de microrganismos psicrótrópicos, como *Pseudomonas* spp, o maior problema está nas enzimas (proteases e lipases) produzidas por estes, que ao contrário dos microrganismos que as produzem, são termorresistentes. Estas enzimas podem vir a provocar sabor amargo, geleificação e coagulação do leite, sendo a rancidez o principal defeito por ação das lipases.

Já com relação à microbiologia do leite UHT, a literatura cita a ocorrência de *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus alvei* e *Bacillus stearothermophilus* (ZACARCHENCO, 2000).

Segundo Mostert, Luck e Hurmann (1979) a presença de esporos bacterianos no leite *in natura* parece ser um fato comum e levando-se em consideração a termo-resistência de muitos deles e a probabilidade de sua ativação a altas temperaturas (UHT) o risco de problemas potenciais com produtos lácteos é bastante acentuado.

Teuber e Busse (1981) dividem os microrganismos presentes no leite em 3 classes:

- Classe I: microrganismos destruídos pela pasteurização convencional ou pelo processo HTST (high temperature short time), com temperaturas de 71-72°C por 15 a 30 segundos. O tratamento elimina a maioria das células vegetativas de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* hemolítico, enterobactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, *Pseudomonas* spp, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* e todas as leveduras e bolores.
- Classe II: microrganismos resistentes ao tratamento HTST, mas que são sensíveis ao tratamento UHT, tais como: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus*.
- Classe III: microrganismos resistentes ao tratamento UHT. Inclui especialmente esporos de *Bacillus stearothermophilus* e outros bacilos e clostrídios mesófilos e termófilos.

Segundo Von Bockelmann (1998) o microrganismo alvo do processo UHT é o *Bacillus stearothermophilus*, sendo que uma redução de 8 ciclos logarítmicos do microrganismo é normalmente verificada nas linhas de processamento.

Do ponto de vista nutricional, o leite após o tratamento térmico elevado sofre algumas alterações apenas em seu conteúdo vitamínico. Com a utilização do sistema UHT, essas perdas também foram minimizadas. A vitamina C é a que sofre maior destruição, cerca de 25%, as vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>, cerca de 10% e o ácido fólico sofre uma redução de 15%. Entretanto, o leite não é fonte de vitamina C, sendo que a destruição desta não deve ser a preocupação maior do processo. Já do ponto de vista químico, alterações significativas podem ocorrer com os principais componentes do leite como proteínas e carboidratos. As proteínas do soro sofrem desnaturação, responsável pelo sabor e aroma típicos do leite UHT em função da liberação de compostos sulfurados. Com relação aos açúcares ocorre a formação da lactulose, epímero da lactose, freqüentemente utilizado

como índice da severidade do tratamento térmico aplicado. A gordura sofre poucas alterações com o tratamento UHT, uma vez que o leite é obrigatoriamente homogeneizado. O que se observa são eventuais acúmulos de gordura na superfície do leite durante o armazenamento prolongado (GOMES, 1995).

A utilização de Integradores Tempo-Temperatura é uma ferramenta bastante importante no monitoramento de processos. Estes indicadores devem estar distribuídos de maneira homogênea no alimento e permitir a avaliação do impacto do processo em todo o volume. O principal requisito para a definição de um Integrador Tempo-Temperatura é a correspondência entre a sensibilidade à temperatura do mesmo e do atributo alvo do processo. No caso do leite, as enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase são consideradas integradores adequados (CLAEYS; LOEY; HENDRICKX, 2002).

A inativação da fosfatase é utilizada rotineiramente para controle da qualidade do leite pasteurizado. Um resultado positivo indica que o leite não foi pasteurizado adequadamente ou que ocorreu contaminação com leite cru após a pasteurização (CHÁVARRI et al, 1998). Entretanto, vários autores relatam a ocorrência de um fenômeno conhecido como reativação da fosfatase, em que apesar de se verificar um resultado negativo no teste de atividade da enzima após a pasteurização HTST, observa-se a reativação da mesma após algumas horas, especialmente se o leite não foi adequadamente refrigerado. A lactoperoxidase é uma das enzimas mais termoestáveis presentes no leite, sendo utilizada como índice de superpasteurização (FOX; McSWEENEY, 1998).

## **1.5 Proteólise em Leite**

As proteases são enzimas que agem sobre as proteínas e causam sua quebra produzindo fragmentos menores. A proteólise pode ter um efeito benéfico para a qualidade desejável do produto, como por exemplo, desenvolvimento de sabor e mudança de textura durante a maturação do queijo. Entretanto, em outros casos o fenômeno pode afetar de maneira adversa a qualidade, como no caso da gelificação do leite UHT (NIELSEN, 2002).

A proteólise pode ser causada por proteases nativas do leite e também por enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos psicotróficos durante a estocagem refrigerada antes do processamento. Estas proteases diferem na especificidade em relação às proteínas do leite.

A plasmina, principal protease nativa do leite secretada durante sua síntese, faz parte de um sistema complexo. Esta enzima é classificada como uma serina protease. Já a protease produzida por *Pseudomonas* spp. é uma metaloprotease extracelular que desestabiliza a micela de caseína por hidrólise, resultando na redução da qualidade do queijo, gelificação do leite UHT e formação de filme em trocadores de calor (NIELSEN, 2002).

Segundo Verdi e Barbano (1991), a quantidade de enzima produzida por *Pseudomonas fluorescens* quando presente em níveis de  $10^6$  UFC/mL começa a ser significativa e próximo a  $10^7$  UFC/mL a mesma já é suficiente para degradar níveis detectáveis de caseína (SHAH, 1994 apud GOMES, 1995).

Vários estudos da relação entre a plasmina nativa do leite e as proteases produzidas por microrganismos psicotróficos foram realizados (FAJARDO-LIRA; HAYES; NILSEN, 2000; FAJARDO-LIRA; NILSEN, 1998; HAYES; WERE; NIELSEN, 2001). A plasmina nativa está inicialmente associada à fração de caseína do leite e às membranas dos glóbulos de gordura, mas pode ser deslocada para a fração soro devido ao crescimento microbiano. Este deslocamento é atribuído à hidrólise das micelas de caseína pelas proteases de origem microbiana e pode afetar a estabilidade do leite UHT ou processos como a maturação do queijo (NIELSEN, 2002).

Apesar de ser nativa do leite, a plasmina não se encontra em sua forma ativa, encontra-se na forma de seu precursor, o zimogênio inativo chamado plasminogênio. A conversão do plasminogênio em plasmina envolve um complexo sistema enzima – ativador – inibidor representado na Figura 1.1 a seguir.

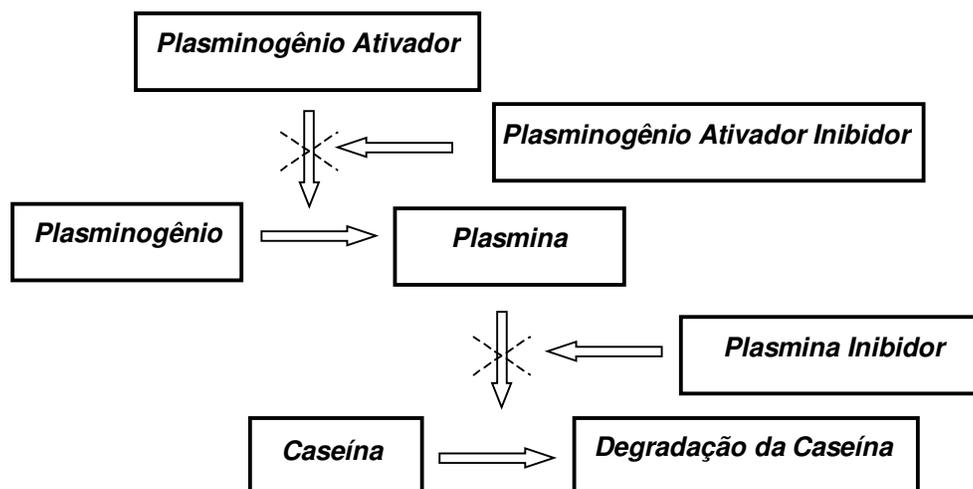


Figura 1.1: Representação do sistema plasmina no leite  
 Fonte: Bastian e Brown, 1996

O plasminogênio é ativado e convertido em plasmina pela ação específica dos plasminogênios ativadores (PA's), os quais também são proteases. Os PA's convertem o plasminogênio inativo em plasmina ativa, sendo esta a responsável pela quebra das proteínas do leite.

A plasmina é uma protease encontrada também no sangue humano. Sendo a mesma essencialmente idêntica à plasmina bovina quando comparada cinética e imunologicamente e pela seqüência parcial de aminoácidos (15% da seqüência total de aminoácidos) (BASTIAN; BROWN,1996).

Assim como a plasmina, o plasminogênio ativador humano e o bovino não diferem, apresentando similaridades com relação à resistência térmica, peso molecular, pH ótimo, estabilidade, especificidade para ação da caseína e formas de inibição (NIELSEN, 2002).

Sendo a plasmina uma enzima nativa do leite, os seus inibidores e ativadores podem ser considerados objeto de estudo para a estabilidade do produto. O inibidor da plasmina e o inibidor do plasminogênio ativador, que quando ativados não permitem a conversão do plasminogênio em plasmina ativa controlam a sua ação, estando a maioria deles presentes no soro do leite. O plasminogênio e a plasmina ativa são relativamente resistentes ao calor. Em contraste, plasminogênio ativador, plasminogênio inibidor e plasmina inibidor, os quais estão naturalmente presentes no leite e poderiam causar a quebra do sistema plasmina, apresentam baixa resistência térmica. A plasmina não é degradada pelo processo UHT tradicional, apresentando um valor  $D_{142,5^{\circ}\text{C}}$  de 10 segundos (ALICHANIDIS; WRATHALL; ANDREWS, 1986). Já os ativadores da plasmina apresentam um  $D_{140^{\circ}\text{C}}$  de 32 segundos (LU; NIELSEN, 1993).

A protease produzida por *Pseudomonas sp.* também não é totalmente inativada pelo processo UHT tradicional, apresentando um valor  $D_{140^{\circ}\text{C}}$  de 1 minuto (CROMIE, 1992).

As proteínas mais sensíveis à plasmina são  $\alpha$ -caseína e, especialmente, a  $\beta$ -caseína. Com relação às proteínas do soro,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, a plasmina tem pouca ou nenhuma atividade. A atividade da plasmina resulta na produção de  $\gamma$ -caseína e proteose-peptona derivadas da  $\beta$ -caseína (NIELSEN, 2002). Já a protease bacteriana ataca preferencialmente a  $\kappa$ -caseína, produzindo a para- $\kappa$ -caseína, desestabilizando a micela de caseína. As  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas são também atacadas, sendo a  $\beta$ -caseína mais susceptível que a  $\alpha$ -caseína. As proteínas do soro são resistentes às proteases psicotróficas (CROMIE, 1992).

Relatos são conflitantes no que se refere à hidrólise da  $\kappa$ -caseína pela plasmina, mas diferentes resultados são atribuídos a condições ambientais ou concentrações de enzimas ou substrato usado. A degradação da  $\alpha$ -s2-caseína e  $\beta$ -caseína ocorre na mesma velocidade, enquanto a  $\alpha$ -s1-caseína é hidrolisada em um tempo menor. Em estudo de cinética usando a síntese de substrato, a caseína tem se mostrado um inibidor competitivo da plasmina. De qualquer modo há

interferência das concentrações de substrato e do período de incubação (NIELSEN, 2002).

A concentração de plasmina presente no leite cru é cerca de 0,3 mg/L e a de plasminogênio de 2,5 mg/L e sua atividade ótima ocorre em pH 7,5 a 37°C (HAYES; KELLY, 2003). No entanto, a raça, o número de lactações, o estágio de lactação e a estação do ano são apontados como possíveis responsáveis pela variação da quantidade de plasmina do leite.

## **1.6 Processamento de Leite por Alta Pressão**

A seguir são citados alguns trabalhos que abordam o processamento de leite por alta pressão hidrostática e por homogeneização a ultra alta pressão.

### **1.6.1 Aplicações de Alta Pressão Hidrostática em Leite**

Trujillo et al (2002) apresentam uma extensa revisão sobre a aplicação de alta pressão hidrostática em leite e derivados. As vantagens tecnológicas decorrentes da utilização de leite submetido ao tratamento por alta pressão na elaboração de vários produtos são discutidas. Dentre estas encontram-se: a aceleração do processo de maturação do queijo, aumento da vida de prateleira do mesmo, melhora na textura e diminuição da dessoragem do iogurte.

As pesquisas de aplicação do processamento utilizando alta pressão para a preservação de leite começaram em 1890 quando Hite demonstrou que a vida de prateleira de leite e outros produtos submetidos ao tratamento por alta pressão poderia ser aumentada. A alta pressão provoca a desintegração das micelas de caseína em partículas de diâmetro menor, com redução da turbidez e aumento da viscosidade. A pressão induz ainda uma dissociação do fosfato de cálcio coloidal e desnaturação das proteínas do soro que podem alterar suas propriedades tecnológicas. Isto sugere diferentes aplicações em produtos lácteos, incluindo estabilização microbiológica do leite e produtos como creme, iogurte e queijo, processamento de leite para a produção de queijo e iogurte e preparação de produtos lácteos com novas texturas. Estudos realizados por diferentes autores

(KOLAKOWSKI et al, 1997; MUSSA; RAMASWAMY, 1997; BUFFA et al, 2001; RADEMACHER; KESSLER, 1997 apud TRUJILLO et al, 2002) demonstraram que é possível a obtenção de leite com qualidade microbiológica semelhante à do leite pasteurizado (72°C – 15 s) submetendo-se o produto a pressões entre 400 MPa por 15 minutos ou 600 MPa por 3 minutos a 20°C (processo hidrostático).

Simpson e Gilmour (1997) avaliaram o efeito da alta pressão hidrostática (375 MPa) em *Listeria monocytogenes* em leite UHT. Tratamentos de 5 min a 45°C resultaram em uma redução de cerca de 4,5 ciclos logarítmicos, sendo que o aumento do tempo de tratamento causou apenas reduções insignificantes nas contagens. Foram testadas as seguintes temperaturas: 25, 35, 45 e 55°C, sendo que quanto maior a temperatura empregada maior foi a redução observada.

Gervilla et al (1997a) ao estudarem o efeito da alta pressão hidrostática em *Listeria innocua* inoculada em leite de ovelha verificaram que a destruição do mesmo obedece a uma cinética de primeira ordem. Os valores de D (tempo de redução decimal) encontrados foram de 3,12 min a 2°C e 400 MPa e 4 min a 25°C e 400 MPa. Já para *Pseudomonas fluorescens*, tratamentos a 2, 10 e 25°C com 400 MPa por 5 min ou 50°C a 300 MPa por 5 minutos reduziram as contagens em pelo menos 6,5 e 7,3 ciclos logarítmicos, respectivamente (GERVILLA et al, 1997b). Os mesmos autores (GERVILLA et al, 1999a) observaram um efeito protetor da gordura (6% no caso do leite de ovelha) em ambos os microrganismos quando comparados com outros estudos realizados em condições de pressão semelhantes, porém com outros fluidos.

A sensibilidade de *Lactobacillus helveticus* em leite de ovelha quando submetido ao processo de alta pressão hidrostática foi estudada por Gervilla et al (1999b). A espécie apresentou uma cinética de destruição de primeira ordem. Os valores de D encontrados foram 7,1 min (2°C a 450 MPa) e 9,1 min (25°C a 450 MPa). O *Lactobacillus helveticus* apresentou resistência superior à alta pressão hidrostática em relação à reportada por estudos prévios com outras espécies de *Lactobacillus* spp.

Alpas e Bozoglu (2000) avaliaram o efeito combinado de alta pressão hidrostática (345 MPa), temperatura (50°C) e bacteriocinas (5000 AU/mL de nisina) por um curto período de tempo (5 min) na inativação de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella enteritidis* em leite pasteurizado. Os autores concluíram que a combinação de bacteriocinas com alta pressão é um método eficiente na inativação de microrganismos patogênicos em alimentos de baixa acidez, tendo sido alcançadas reduções da ordem de 8 ciclos logarítmicos.

Ludikhuyze, Claeys e Hendrickx (2000), realizaram um estudo detalhado de inativação da fosfatase alcalina por alta pressão hidrostática e temperatura, as quais variaram de 0,1 a 725 MPa e 25 a 63°C, respectivamente. A inativação pode ser descrita por um modelo de primeira ordem, permitindo o cálculo de valores de D e z. Os autores concluíram que de modo geral a fosfatase alcalina é mais resistente a alta pressão que a maioria dos microrganismos patogênicos não esporulados presentes no leite e, sendo assim, pode ser utilizada como um indicador da ausência destes no leite processado a alta pressão. Entretanto, mais estudos da inativação por pressão e temperatura da flora microbiana do leite são indispensáveis para que se definam os níveis de atividade de fosfatase alcalina aceitáveis no leite, já que a inativação completa da mesma levaria certamente a superprocessamento.

Garcia-Risco et al (1998) estudaram os efeitos da alta pressão hidrostática na inativação da plasmina. As amostras foram processadas a 400 MPa, a 25°C por 30 minutos e em seguida estocadas a 7°C por 45 dias. Os autores verificaram que não houve inativação da plasmina, sendo que a mesma causou degradação protéica durante o período de estocagem. O plasminogênio foi parcialmente inativado.

### **1.6.2 Aplicações de Homogeneização a Ultra Alta Pressão em Leite**

Hayes e Kelly (2003) avaliaram o efeito da homogeneização a ultra alta pressão nas enzimas fosfatase alcalina e plasmina. Pressões entre 50 e 200 MPa

foram aplicadas e não foi observada inativação da enzima fosfatase alcalina. As temperaturas de entrada variaram de 6 a 9°C. Entretanto, os testes realizados foram qualitativos e segundo os autores é possível que tenha ocorrido inativação parcial da enzima. A determinação de plasmina indicou sua inativação parcial na mesma faixa de pressão estudada (máximo de 65%).

O potencial de aplicação do processo de homogeneização a alta pressão no processamento de leite cru bovino foi estudado por Hayes, Fox e Kelly (2005). O leite foi pré aquecido a 45°C e processado a 150, 200 e 250 MPa em um homogeneizador de duplo estágio, permanecendo por cerca de 20 segundos na temperatura de saída da válvula, 67,0; 76,8 e 83,6°C, respectivamente. Os autores avaliaram diversos atributos, entre eles o número total de microrganismos psicrotróficos, de mesófilos, atividade enzimática da fosfatase alcalina, lactoperoxidase e plasmina. Além de cor e tamanho dos glóbulos de gordura. Os autores concluíram que o aumento significativo da temperatura (38,6°C nos processos a 250 MPa) e a possibilidade de variar o tempo de retenção podem aumentar as aplicações do processo de homogeneização a ultra alta pressão no processamento de leite, combinando as vantagens da homogeneização convencional e da pasteurização em um único processo.

## **1.7 Microrganismos utilizados neste estudo**

### **1.7.1 *Pseudomonas fluorescens***

*Pseudomonas* spp é um bastonete, gram negativo, aeróbio estrito com 0,7-0,8 µm por 2,3-2,8 µm, cuja temperatura ótima de crescimento é de 30°C. Entretanto, este é um microrganismo psicrotrófico, ou seja, capaz de se desenvolver na temperatura de refrigeração, sendo o principal integrante da flora do leite cru armazenado sob refrigeração. O desenvolvimento deste microrganismo no leite cru é favorecido pelo fato do mesmo ser submetido à agitação durante a estocagem refrigerada. Conforme já foi mencionado anteriormente, no leite ele é responsável pela produção de proteases e lipases termorresistentes. Estas enzimas podem causar sabor amargo, geleificação,

coagulação do leite e rancidez. *Pseudomonas fluorescens* é considerada um indicador para *Pseudomonas* spp (GERVILLA et al, 1997b).

### 1.7.2 *Listeria innocua*

*Listeria monocytogenes* é um bastonete, gram positivo, com 0,4-0,5 µm por 0,5-2,0 µm, associado a enfermidades advindas do consumo de leite, queijo e outros derivados de leite. O microrganismo é de extrema importância para a indústria de laticínios devido à sua habilidade de crescer em uma grande variedade de condições. É capaz de crescer na faixa de pH de 4,4 a 9,0, temperatura entre 1 e 45°C, sendo que a temperatura ótima situa-se entre 30 e 37°C. A sua resistência ao NaCl é alta, sendo que o microrganismo é capaz de se desenvolver em meios contendo até 10% de NaCl ( $a_w$  0,935). A *Listeria innocua* devido à sua proximidade filogenética a *Listeria monocytogenes* é considerada um indicador não patogênico para *Listeria monocytogenes* (GERVILLA et al, 1997a).

### 1.7.3 *Lactobacillus helveticus*

*Lactobacillus helveticus* é um bastonete, gram positivo, com 0,6-1,0 µm por 2,0-6,0 µm, cuja temperatura ótima de crescimento é de 37°C, representante do grupo dos *Lactobacillus*. Este microrganismo pode ser considerado um termolactobacilo já que é capaz de se desenvolver em temperaturas de até 45°C (GERVILLA et al, 1999b). *Lactobacillus helveticus* pode ser utilizado como cultura *starter* na produção de uma grande variedade de produtos fermentados e como um intensificador de flavor capaz de reduzir o amargor e acelerar o desenvolvimento do flavor no queijo. O mesmo é capaz de fermentar galactose, sendo utilizado na produção dos queijos Emmental e Gruyere.

### 1.7.4 *Bacillus stearothermophilus*

*Bacillus stearothermophilus* é um bastonete Gram positivo (SNEATH, 1986), com 0,6-1,0 µm por 2,0-3,5 µm, apresentando motilidade por flagelos peritríqueos. Possui esporângios entumecidos e esporos maduros ovais terminais

ou subterminais com 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  a 1,5-2,2  $\mu\text{m}$ . Não é patogênico, mas é de difícil destruição seja por calor ou por agentes químicos (ITO, 1981).

Os esporos do *B. stearothermophilus* são extremamente termorresistentes. A resistência é afetada tanto pelas condições de crescimento da bactéria como pelo meio em que os esporos são aquecidos. Como os esporos de *B. stearothermophilus* são muito utilizados no monitoramento de processos de esterilização, é de extrema importância o bom conhecimento da resistência destes a diferentes processos. Nakazato (2000) apresenta uma ampla revisão sobre a determinação dos parâmetros térmicos do *B. stearothermophilus* em diversos alimentos. Pode-se verificar que na literatura os valores de  $D_{121^\circ\text{C}}$  do *B. stearothermophilus* encontrados por diversos autores são bastante variáveis, obtendo-se valores de 0,6 min até 5,0 min dependendo da variedade e do alimento onde o valor foi determinado.

#### **1.7.5 *Clostridium sporogenes* (PA 3679)**

*Clostridium sporogenes* é um microrganismo anaeróbio não patogênico comumente utilizado em ensaios de validação de processos térmicos. O seu valor de  $z$  é bastante próximo ao do *Clostridium botulinum* mas sua resistência térmica é bastante superior (5D de redução do *Clostridium sporogenes* PA3679 equivalem a uma redução de 12D do *Clostridium botulinum*) (GRISCHY; SPECK; ADAMS, 1983).

### **1.8 Fluidodinâmica Computacional (CFD)**

Fluidodinâmica computacional é a análise de sistemas envolvendo escoamento de fluidos, transferência de calor e fenômenos físicos associados, tais como reações químicas, por meio de simulações baseadas em computador. A mesma funciona resolvendo as equações de fluxo de fluidos sobre uma região de interesse, com condições específicas (conhecidas) na vizinhança desta região (Manual ANSYS CFX 10.0, 2005).

A simulação numérica nesta área apresentou grande desenvolvimento nos últimos 20 anos. Inicialmente, como uma ferramenta para análise de problemas físicos em nível de investigação científica e, atualmente, como uma ferramenta poderosa para a solução de importantes problemas aplicados da engenharia. Isto ocorreu devido ao desenvolvimento exponencial de computadores de alta velocidade de processamento e grande capacidade de armazenamento (MALISKA, 1995).

Hoje, a fluidodinâmica computacional é uma ferramenta de projeto industrial estabelecida, auxiliando na redução dos tempos de planejamento e melhorando processos no mundo da engenharia. CFD representa uma alternativa precisa e economicamente viável para testes em escala piloto, permitindo variações nas simulações de maneira bastante rápida (Manual ANSYS CFX 10.0, 2005).

Aplicações típicas da fluidodinâmica computacional incluem:

- Processos industriais: vasos de mistura, reatores químicos;
- Construção: ventilação de prédios;
- Saúde e segurança: efeitos do fogo e do cigarro;
- Indústria de motores: modelos de combustão, aerodinâmica de carros;
- Eletrônicos: transferência de calor no interior e ao redor de circuitos;
- Ambiente: dispersão de poluentes no ar ou na água;
- Energia: otimização do processo de combustão;
- Medicina: fluxo de sangue por vasos obstruídos.

### **1.8.1 Métodos Numéricos**

A princípio, o usuário tem a sua disposição as seguintes ferramentas: métodos analíticos, métodos numéricos e experimentação em laboratório. Os

métodos analíticos e numéricos formam a classe dos métodos teóricos, pois ambos objetivam resolver equações diferenciais. A diferença está na complexidade da equação que cada método é capaz de resolver. Os métodos analíticos têm a desvantagem de serem aplicáveis apenas em problemas cujas simplificações os desviam demasiadamente do fenômeno físico real. Além disso, são aplicados a geometrias e condições de contorno simples. O uso de técnicas numéricas praticamente não apresenta restrições, podendo resolver problemas com complicadas condições de contorno, definidos em geometrias arbitrárias e apresentando resultados com uma rapidez fantástica. Os dados obtidos devem ser, entretanto, confiáveis e este é um ponto de extrema importância a ser observado pelo analista. Desta forma, a equação diferencial deve ser corretamente resolvida (validação numérica: teste da precisão da solução e convergência do algoritmo) e a mesma deve representar com fidelidade o fenômeno físico em questão.

Dentre os métodos numéricos disponíveis temos: o método das diferenças finitas, o método dos elementos finitos e o método dos volumes finitos. A tarefa do método numérico é transformar uma equação diferencial escrita em nível infinitesimal e definida para um determinado domínio em um sistema de equações algébricas que possam ser resolvidas analiticamente. Para isso, as derivadas da função existentes na equação diferencial devem ser substituídas pelos valores discretos da função. A diferença fundamental entre os métodos é a maneira como as equações que representam o domínio são obtidas (MALISKA, 1995).

O conjunto de equações que descrevem os processos de transferência de momento, de massa e de energia a ser resolvido nos problemas de fluidodinâmica computacional é conhecido como equações de Navier-Stokes. São equações diferenciais parciais que foram derivadas no início do século XIX. Não existe solução analítica geral conhecida para estas equações mas elas podem ser discretizadas e resolvidas numericamente. Equações que descrevem outros processos, como combustão por exemplo, podem ser resolvidas em conjunto com as equações de Navier-Stokes. Frequentemente, um modelo aproximado é usado

para derivar estas equações adicionais, sendo os modelos de turbulência um exemplo particularmente importante (Manual ANSYS CFX 10.0, 2005).

Em problemas de escoamento de fluidos, o método de volumes finitos é o preferido, sendo que hoje a maior parte dos pacotes comerciais de CFD utilizam este método. A preferência é justificada pelo fato do método, ao criar suas equações aproximadas, realizar um balanço da propriedade (massa, momento e energia) em volumes elementares. Uma vez que os balanços devem ser satisfeitos em níveis de volumes elementares, para qualquer tamanho de malha, todos os princípios de conservação podem ser checados em uma malha bastante grosseira (MALISKA, 1995).

A literatura apresenta uma série de trabalhos a respeito do emprego do método de volumes finitos para a solução de problemas de fluidodinâmica computacional, dentre eles Patankar e Spalding (1972), Patankar (1980), Patankar (1981) e Maliska (1995).

No método dos volumes finitos, o domínio de cálculo é subdividido em volumes de controle que contêm os pontos da malha numérica (denominados de nós). Estes volumes não são sobrepostos, ou seja, cada volume de controle representa apenas um e somente um nó. Todas as variáveis são definidas no centro dos volumes de controle (com exceção das fronteiras), os quais preenchem os domínios físicos a serem considerados. Cada equação é integrada sobre cada volume de controle para obter uma equação discreta, a qual conecta as variáveis no centro do volume de controle com sua vizinhança. Dessa maneira, o princípio de conservação é satisfeito na sua forma integral para cada volume (BERNARDO, 2005).

As equações a serem resolvidas têm a mesma forma geral apresentada pela Equação 1.1 a seguir:

$$\frac{\partial \rho \phi}{\partial t} + \nabla \cdot \left( \rho \vec{U} \phi \right) - \nabla \cdot (\Gamma \nabla \phi) = S \quad \text{Eq. 1.1}$$

Onde:

$\rho$  = massa específica

$\phi$  = propriedade

$\Gamma$  = termo difusivo

$S$  = termo fonte

Considerações:

- o termo temporal (primeiro termo do lado esquerdo da equação) tem a finalidade de avançar a solução do problema no espaço de tempo;
- o segundo termo representa a parte convectiva da variável  $\phi$  e são os termos mais difíceis de tratar em função da sua natureza não linear;
- o terceiro representa o balanço dos fluxos difusivos;
- $S$  é o termo fonte, responsável por acomodar todos os termos que não se encaixam na forma apresentada pela Equação 1.1.

Integrando-se a Equação 1.1 sobre os volumes de controle, obtém-se a Equação 1.2:

$$\int \frac{\partial \rho \phi}{\partial t} dV + \int \rho \phi \vec{U} \cdot \vec{n} dA - \int \Gamma \nabla \phi \cdot \vec{n} dA = \int S dV \quad \text{Eq. 1.2}$$

Maiores detalhes a respeito do método dos volumes finitos bem como da matemática envolvida na resolução das equações diferenciais pelo mesmo não serão discutidos aqui, podendo ser encontrados em Maliska (1995) e no Manual ANSYS CFX 10.0 (2005).

### 1.8.2 Aplicações de CFD em processos de Homogeneização a Ultra Alta Pressão

Em sistemas de alta pressão dinâmica, os fenômenos de cavitação, tensão de cisalhamento e turbulência podem estar envolvidos simultaneamente, sendo muito difícil ordená-los por importância (WALSTRA, 1983 apud FLOURY, 2004).

Kleining e Middleberg (1996; 1997) investigaram o fluxo em uma válvula de homogeneização tipo APV-Gaulin através de simulação numérica. O estudo foi feito em duas etapas: na primeira, Kleining e Middleberg (1996) modelaram o fluxo apenas na entrada da válvula e na região do *gap*. Já em um segundo passo, Kleining e Middleberg (1997) utilizaram os perfis de velocidade na região de saída do *gap* obtidos no trabalho anterior como condições de contorno da entrada da região de impacto da válvula. Na primeira parte, os autores apresentam uma expressão simples que utiliza os resultados numéricos e que permite o cálculo do gradiente de pressão, sendo que o gradiente de pressão mostrou-se uma variável independente mais adequada para correlação com a destruição celular do que a pressão de operação. Já na segunda parte, foi verificado que o jato de impacto existente no sistema é aproximadamente laminar.

Stevenson e Chen (1997) foram os primeiros a construir um modelo do perfil do fluxo em toda a válvula através de um código de CFD comercial. O modelo obtido fornece informações detalhadas a respeito dos perfis de velocidades em válvulas de homogeneização e os autores indicam a possibilidade do mesmo ser utilizado na produção de modelos para ruptura de células e glóbulos de gordura.

Os autores destes trabalhos, entretanto, enfatizam a necessidade de mais informações relacionadas com a mecânica de fluidos no interior do homogeneizador para um melhor entendimento dos mecanismos físicos de destruição de microrganismos durante o processo. O conhecimento da queda de pressão e do tamanho do *gap* não fornece informações suficientes. Um perfil mais detalhado de velocidade e pressão no interior da válvula de homogeneização é

necessário para o cálculo das forças aplicadas ao fluido durante a homogeneização.

Floury et al (2004) avaliaram o fluxo em um homogeneizador a ultra alta pressão STANSTED na faixa de pressão de 26 a 340 MPa. Este homogeneizador difere do APV-Gaulin estudado por Kleining e Middleberg (1996; 1997), já que o mesmo não apresenta anel de impacto. Após estimar o tamanho do *gap* em função da pressão de operação e regime de escoamento, simulações numéricas foram conduzidas utilizando-se o software FLUENT para analisar o perfil do fluxo no interior da válvula de homogeneização a ultra alta pressão. O modelo considerou fluido incompressível e viscosidade e temperatura do fluido constantes. O trabalho oferece detalhes interessantes com relação ao regime do fluxo, perfil de pressão, turbulência e áreas de cavitação no interior da válvula, o que não poderia ser facilmente determinado experimentalmente devido às grandes alterações que ocorrem em distâncias muito pequenas e às pressões de operação extremamente elevadas.

## 1.9 Referências Bibliográficas

**ABLV – Associação Brasileira do Leite Vida** <[www.ablv.org.br](http://www.ablv.org.br)> acesso em: 17/10/06.

ANSYS CFX 10.0 User Manual, 2005.

ALICHANIDIS, E.; WRATHALL, J.H. M.; ANDREWS, A. T. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. **Journal of Dairy Research**. v. 53, n. 2, p. 259-269, 1986.

ALPAS, H.; BOZOGLU, F. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, n. 4, p. 387-392, 2000.

BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. **Review: Plasmin in milk and dairy products: an update** – International Dairy Journal, v. 6, n. 5, p.435-457, 1996.

BERNARDO, S. **Estudo dos Escoamentos Gasoso e Gás-Sólido em Ciclones pela Aplicação de Técnicas de Fluidodinâmica Computacional**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

BRASIL. Portaria nº307, de 4 de setembro de 1997. Estabelece padrões de identidade e qualidade para o leite UHT/UAT. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 4 set. 1997.

CAMPOS, F.P. **Estudo do Processamento de Suco de Laranja através da Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

CHÁVARRI, F.; SANTISTEBAN, M.; VIRTO, M.; RENOBALLES, M. Alkaline Phosphatase, Acid Phosphatase, Lactoperoxidase, and Lipoprotein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, n. 8, p. 2926-2932, 1998.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation** – Food Science and Technology International, 1(2/3):75—0,1995.

CLAEYS, W. L.; LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation, and of  $\beta$ -lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 541-553, 2002.

**CNPGL – Embrapa Gado de Leite** <[www.cnpgl.embrapa.br](http://www.cnpgl.embrapa.br)> acesso em: 17/10/06.

CRAWFORD, Y. J.; MURANO, E. A.; OLSON, D. G.; SHENOY, K. Use of High Hydrostatic Pressure and Irradiation To Eliminate *Clostridium sporogenes* Spores in Chicken Breast. **Journal of Food Protection** v.59, n. 7, p. 711-715, 1996.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

DEETH, H. C.; DATTA, N. Alternative technologies for producing sterile low acid food products. **Food Australia**. v. 54, n. 7, p. 273-277, 2002.

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In:

**IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

DOULAH, M. S.; HAMMOND, T. H.; BROOKMAN, J. S. G. A Hydrodynamic Mechanism for the Disintegration of *Saccharomyces cerevesiae* in an Industrial Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 6, p. 845-858, 1975.

ENGLER, C. R.; ROBINSON. C. W. Disruption of *Candida utilis* Cells in High Pressure Flow Devices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 4, p. 765-780, 1981.

FAJARDO-LIRA, C.;NIELSEN, S. S. Effects of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**. v.81, n. 4, p. 901-908, 1998.

FAJARDO-LIRA, C.; HAYES, M. O. K. D.; NIELSEN, S. S. Effects of Psychrotrophic Bacteria and of an Isolated Protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the Plasmin System of Fresh Milk. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 10, p. 2190-2199, 2000.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.LANCIOTTI, R; MEDICI, A; PEDRINI, P; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 7, n. 10, p. 2879-2887, 1996.

FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. **Chemical Engineering Science**. v. 59, n. 4, p. 843-853, 2004.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1ed. Editora Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

FURUKAWA, S.; NAKAHARA, A.; HAYAKAWA, I. Effect of reciprocal pressurization on germination and killing of bacterial spores. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 35, n. 5, p. 529-532, 2000.

FURUKAWA, S.; HAYAKAWA, I. Effect of Temperature on the Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 Spores by Low Hydrostatic Pressure Treatment. **Biocontrol Science**. v. 6, n. 1, p. 33-36, 2001.

FURUKAWA, S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 5, p. 836-841, 2003.

GAO, Y. L.; JIANG, H. H. Optimization of process conditions to inactivate *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and mild heat using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 24, n. 1, p. 43-48, 2005.

GARCIA-RISCO, M.R.; CORTÉS, E.; CARRASCOSA, V.; LÓPEZ-FANDINO. **Microbiological and Chemical Changes in High-Pressure-Treated Milk during Refrigerated Storage** – Food of Journal Protection, v. 61, n. 6, p. 735-737, 1998.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 1, p. 33-37, 1997.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. **Journal of Dairy Science**. v. 80, n. 10, p. 2297-2303, 1997.

GERVILLA, R.; MOR-MUR, M.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated into ewe's milk by high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**. v. 16, n. 2, p. 173-184, 1999.

GERVILLA, R.; SENDRA, E.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* inoculated into ewe's milk to high hydrostatic pressure. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 6, p. 1099-1107, 1999.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado “longa vida”**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.

GOULD, G. W. Inactivation of Spores in Food by Combined Heat and Hydrostatic Pressure. **Acta Alimentaria**. v. 2, n. 4, p. 377-383, 1973.

GRISCHY, R. O.; SPECK, R. V.; ADAMS, D. M. New Media for Enumeration and Detection of *Clostridium sporogenes* (PA3679) Spores. **Journal of Food Science**. v. 48, n. 5, p. 1466-1469, 1983.

HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; TOMITA, M.; FUJIO, Y. Application of High Pressure for Spore Inactivation and Protein Denaturation. **Journal of Food Science**. v. 59, n. 1, p. 159-163, 1994.

HAYAKAWA, I. et al. Mechanism of inactivation of heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilis* IFO 12550 by rapid decompression. **Journal of Food Science**. v. 63, n. 3, p. 371-374, 1998.

HAYES, P. R. D. **Food Microbiology and Higiene**. 2° ed. Editora Chapman & Hall, 1996. 578p.

HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 3, p. 387-394, 2000.

HAYES, K. D.; WERE, L. M.; NIELSEN, S. S. Stimulation of bovine plasminogen activator by a protease isolated from *Pseudomonas fluorescens* M3/6. Paper 68-4, **Institute of Food Technologists' Annual Meeting**, New Orleans, LA, 2001.

HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. **Journal of Dairy Research**. v. 70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HAYES, M. G.; LEFRANCOIS, D. S.; WALDRON, D. S.; GOFF, H. D.; KELLY, A. L. Influence of high pressure homogenisation on some characteristics of ice cream. **Milchwissenschaft**. v. 58, n. 9/10, p. 519-523, 2003.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

HEIJI, W. B. C.; SCHEPDAEL, L. J. M. M.; MOEZELAAR, R.; HOOGLAND, H.; MATSER, A. M.; BERG, W. High-Pressure Sterilization: Maximizing the Benefits of Adiabatic Heating. **Food Technology**. v. 57, n. 3, p. 37-41, 2003.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN den BROECK, I.; WEEMAS, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review)**. Treds in Food Science and Tecnology, v. 9, n. 5, p. 197-203, 1998.

HOOVER, D.G; METRICK, C; PAPINEAU, A.M; FARKAS, D.F; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**. v. 43, n. 3, p. 99-106, 1989.

HOOVER, D. G. Pressure effects on Biological Systems. **Food technology**. v. 47, n. 6, p. 150-154, 1993.

ITO, A. K. Thermophilic Organisms in Food Spoilage: Flat-Sour Aerobes. **Journal of Food Protection**. v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.

KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** v.12, n. 5, p.435-446, 2002.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. The correlation of cell disruption with homogeniser valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. **Chemical Engineering Science**. v. 51, n. 23, p. 5103-5110, 1996.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. Numerical and experimental study of a homogeniser impinging jet. **AIChE Journal**. v. 43, n. 4, p. 1100-1107, 1997.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. **Chemical Engineering Science AIChE Journal**. v. 53, n. 5, p. 891-898, 1998.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. v. 18, n. 6, p. 319-322, 1994.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F; SINIGAGLIA, M; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**. v. 22, n. 2, p. 165-168, 1996.

LECHOWICH, R. V. Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method. **Food Technology**. v. 47, n. 6, p. 170-172, 1993.

LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D. H. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 4158-4161, 2002.

LOPEZ FANDINO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 6, p. 929-936, 1996.

LÓPEZ-PEDEMONTE, T. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n. 10, p. 3075-3081, 2003.

LU, D. D.; NIELSEN, S. Heat inactivation of native plasminogen activators in bovine milk. **Journal of Food Science**. v. 58, n. 5, p. 1010-1016, 1993.

LUDI KHUYZE, L.; CLAEYS, W.; HENDRICKX, M. Combined Pressure-temperature Inactivation of Alkaline Phosphatase in Bovine Milk: A Kinetic Study. **Journal of Food Science**. v. 65, n. 1, p. 155-160, 2000.

MAGGI, A.; GOLA, S.; ROVERE, P.; MIGLIOLI, L.; DALL'AGLIO, G.; LONNEBORG, N. G. Effects of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. **Industria Conserve**. v. 71, n. 1, p. 8-14, 1996.

MALISKA, C. R. **Transferência de Calor e Mecânica dos Fluidos Computacional**. 1ed. Editora LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1995. 424p.

MARGOSCH, D.; EHRMANN, M. A.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and other Endospores in Mashed Carrots. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 11, p. 2530-2537, 2004.

MERMELSTEIN, N. H. High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**. v. 53, n. 4, p. 86-95, 1999.

MILLER, J.; ROGOWSKI, M.; KELLY, W. Using a CFD Model To Understand the Fluid Dynamics Promoting *E. coli* Breakage in a High-Pressure Homogenizer. **Biotechnological Progress**. v. 18, n. 5, p. 1060-1067, 2002.

MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON, M. F. Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 227-230, 1998.

MOERMAN, F.; MERTENS, B.; DEMEY, L.; HUYGHEBAERT, A. Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. **Meat Science**. v. 59, n. 2, p. 115-125, 2001.

MOERMAN, F. High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. **Meat Science**. v. 69, n. 2, p. 225-232, 2005.

MOORE, E. K.; HOARE, M.; DUNNILL, P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, n. 10, p. 764-770, 1990.

MOSTERT, J. F.; LÜCK, H.; HURMANN, R. A. Isolation, identification e practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South Africa Journal of Dairy Technology**. v. 211, n. 3, p. 125-132, 1979.

NAKAZATO, L. **Influência de Palmitato de Sacarose sobre o desenvolvimento de *B. stearothermophilus* em extrato de café** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in milk: characteristics, Roles, And Relationship. **Journal of Agricultural and Chemistry**. v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

OPTSAL, I. V.; BAGAMBOULA, C. F.; VANMUYSEN, S. C. M.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, n. 2, p. 227-234, 2004.

PATANKAR, S. V. **Numerical Heat Transfer and Fluid Flow**. Ed. Hemisphere Pub. Co., New York, 1980, 197p.

PATANKAR, S. V.; SPALDING, D. B. A Calculation Procedure for Heat, Mass and Momentun Transfer in 3D Parabolic Flows. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 15, n. 10,p.1787-1806, 1972.

PATANKAR, S. V. A Calculation Procedure for 2D Elliptic Situations Heat, Mass and Momentum Transfer in 3D Parabolic Flows. **Numerical Heat Transfer**, v. 4, n. 4, p.409-425, 1981.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. High-Pressure. **Journal of Food Protection**. v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

PETRUS, R. R. **Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

POPPER, L; KNORR, D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**. v. 44, n. 7, p. 84-89, 1990.

PRATA, L. F. **Espectrofotometria de Absorção na região ultravioleta para detecção de atividade proteolítica em leite e derivados.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1991.

REDDY, N. R.; SOLOMON, H. M.; TETZLOFF, R. C.; RHODEHAMEL, E. J. Inactivation of *Clostridium botulinum* Type A Spores by High-Pressure Processing at Elevated Temperatures. **Journal of Food Protection**. v. 66, n.8, p. 1402-1407, 2003.

RITZ, M.; FREULET, M.; ORANGE, N.; FEDERIGHI, M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55, n.1/3, p. 115-119, 2000.

ROBERTS, C. M.; HOOVER, D. G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 81, n. 4, p. 363-368, 1996.

RODRIGUEZ, A. C.; LARKIN, J. W.; DUNN, J.; PATAZCA, E.; REDDY, N. R.; ALVAREZ-MEDINA, M.; TETZLOFF, R.; FLEISCHMAN, G. J. Model of Inactivation of Bacterial Spores by Moist Heat and High Pressure. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 367-373, 2004.

SIMPSON, R. K.; GILMOUR, A. The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. **Food Microbiology**. v. 14, n. 6, p. 567-573, 1997.

SIZER, C. E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; TING, E. Validation High-Pressure Processes for Low-Acid Foods. **Food Technology**. v. 56, n. 2, p. 36-42, 2002.

STEVENSON, M. J.; CHEN, X. D. Visualization of the Flow Patterns in a High-pressure Homogenizing Valve Using a CFD Package. **Journal of Food Engineering**. v. 33, n. 1/2, p. 151-165, 1997.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. Academic Press Inc. New York, N. Y., 1973. 263p.

TEUBER, M.; BUSSE, M. Microbial aspects. **FIL/IDF Bulletin**, n. 133, cap. 1, p. 5-9. 1981.

THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTAL, J. C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 427-439, 2003.

TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 3, n. 4, p. 295-307, 2002.

VANNINI, L.; LANCIOTTI, R.; BALDI, D.; GUERZONI, M. E. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 2, p.123-135, 2004.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and Milk Products – Technology, Chemistry and Microbiology**. Chapman & Hall. London, 1996, 451p.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Effect of Coagulants, Somatic Cell Enzymes, and Extracellular Bacterial Enzymes on Plasminogen Activation. **Journal of Dairy Science**. v. 74, n. 3, p.772-782, 1991.

VON BOCKELMANN, B. Sterilizing efficiency. **Long Life Products – from raw materials to finished products**, Tetra Pak, p.21-23, 1998, 68p.

WUYTACK, E. Y.; BOVEN, S.; MICHIELS, C. W. Comparative Study of Pressure-Induced Germination of *Bacillus subtilis* Spores at Low and High Pressures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 9, p. 3220-3224, 1998.

WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, n. 3, p. 333-341, 2001.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

WUYTACK, E. Y.; PHUONG, L. D. T.; AERTSEN, A. et al. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 1, p. 31-37, 2003.

ZACARCHENCO, P. B. **Aperfeiçoamento da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans* e sua ocorrência em leite UAT/UHT**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

ZAPICO, P.; PAZ, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua* **International Journal of Food Microbiology** .v. 46, n. 2, p. 151-157, 1999.

## 2 Inativação de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus* em Leite Desnatado por Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP)

### Resumo

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma técnica alternativa de preservação de alimentos. Como o aquecimento do produto é mínimo, suas características são mais próximas às do produto fresco. Neste trabalho, a inativação de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus* em leite desnatado pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) foi estudada. Os resultados demonstraram que pressões da ordem de 200, 250 e 260 MPa, respectivamente foram capazes de causar inativação de toda a carga inoculada ( $10^7$ UFC/mL) dos microrganismos citados. As curvas de destruição revelaram que para a *Pseudomonas fluorescens* o Número de Reduções Decimais (NRD) aumentou linearmente com o aumento da pressão na faixa estudada para este microrganismo (100 a 200 MPa). Entretanto, para a *Listeria innocua* e para o *Lactobacillus helveticus* este aumento não foi linear, sendo muito pequeno na primeira parte da curva (de 100 a 200 MPa) e aumentando drasticamente na segunda parte, 200 a 250 MPa para a *Listeria innocua* e 200 a 260 MPa para o *Lactobacillus helveticus*.  $D_p$  (constante de morte por pressão) encontrada para a *Pseudomonas fluorescens* foi de 30,3 MPa na faixa de 100 a 190 MPa. *Listeria innocua* apresentou um valor de 85,5 MPa de 100 a 200 MPa e 8,5 MPa de 200 a 240 MPa. Finalmente, o valor de  $D_p$  encontrado para o *Lactobacillus helveticus* foi de 132,6 MPa de 100 a 200 MPa e 22,4 MPa de 200 a 250 MPa.

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite desnatado, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus helveticus*.

## **Inactivation of *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* and *Lactobacillus helveticus* in Skim Milk by Ultra High Pressure Homogenization (UHPH)**

### **Abstract**

Ultra high pressure homogenization is an alternative food processing technique. As product heating is minimum, its characteristics are closer to fresh food. At this work inactivation of *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* and *Lactobacillus helveticus* in skim milk by ultra high pressure homogenization (UHPH) were studied. Results showed that pressures up to 200, 250 and 260 MPa were able to inactivate all the  $10^7$  CFU/mL initially inoculated, respectively. Destruction curves revealed that for *Pseudomonas fluorescens* DRN (Decimal Reduction Number) increases linearly with pressure at pressure range studied for this microorganism (100 to 200 MPa). However, for *Listeria innocua* and *Lactobacillus helveticus* this increase was not linearly. It was very small at the first part of the curve (from 100 to 200 MPa) and increased very sharply at the second one, 200 to 240 MPa for *Listeria innocua* and 200 to 250 MPa for *Lactobacillus helveticus*. Dp (death pressure constant) found for *Pseudomonas fluorescens* was 30.3 MPa from 100 to 190 MPa. *Listeria innocua* presented a Dp of 85.5 MPa from 100 to 200 MPa and 8.5 MPa from 200 to 240 MPa. Finally, the Dp obtained for *Lactobacillus helveticus* was 132.6 MPa from 100 to 200 MPa and 22.4 from 200 to 250 MPa.

Key-words: Ultra high pressure homogenization, skim milk, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus helveticus*.

## 2.1 Introdução

A crescente demanda dos consumidores por produtos processados com características as mais próximas possíveis dos produtos *in natura* levou os processadores de alimentos a procurar por alternativas de processos não térmicos que combinassem redução eficiente da população microbiana com máxima retenção das propriedades químicas, físico-químicas e sensoriais dos produtos.

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é utilizado na indústria farmacêutica, cosmética, química e de alimentos no preparo ou estabilização de emulsões e suspensões ou para criar alterações físicas, como alterações de viscosidade nos produtos. Para aplicações que exigem um alto grau de dispersão, pressões superiores a 200 MPa estão sendo investigadas. Outra aplicação do processo é a ruptura celular de leveduras ou bactérias para a obtenção de produtos intracelulares, tais como proteínas (WUYTACK et al, 2002).

O leite é um alimento muito importante na alimentação humana, já que fornece uma proporção equilibrada de nutrientes. Em função de seu pH próximo à neutralidade (pH 6,7), alta atividade de água e alto teor de nutrientes, o leite é um meio muito rico para o desenvolvimento de um grande número de microrganismos.

A literatura apresenta uma série de trabalhos em que os autores avaliaram o efeito da aplicação de alta pressão hidrostática na inativação de microrganismos (HOOVE,1993; PATTERSON et al, 1995; GERVILLA et al, 1997a; GERVILLA et al, 1997b; GERVILLA et al, 1999a; GERVILLA et al, 1999b; RITZ et al,2000) como também da homogeneização a ultra alta pressão (KHEADR et al, 2002; WUYTACK et al, 2002; DOSUALDO, 2003; CAMPOS, 2004; HAYES, 2005).

A estocagem de leite cru sob refrigeração favorece o crescimento de bactérias psicrófilas, particularmente *Pseudomonas* spp. *Pseudomonas fluorescens* é um indicador para *Pseudomonas* spp, o principal componente da flora deteriorante do leite cru refrigerado, especialmente se o mesmo é mantido sob agitação. O crescimento de *Pseudomonas fluorescens* no leite causa hidrólise

da caseína e alterações nas características de coagulação do leite. O microrganismo produz enzimas (lipases e proteases) que resistem às temperaturas usuais do processo UHT e podem degradar vários componentes do leite que irão causar deterioração durante a estocagem (COUSIN, 1982; FAIRBAIRN; LAW, 1986; GERVILLA et al, 1997b).

*Listeria monocytogenes* causa doenças associadas ao consumo de leite, queijos e outros produtos derivados de leite. Este microrganismo é importante para a indústria de laticínios devido à sua habilidade de crescer em uma ampla gama de condições. É capaz de crescer na faixa de pH de 4,4 a 9,0, temperatura de 1 a 45°C, sendo que a temperatura ótima situa-se entre 30 e 37°C. A sua resistência ao NaCl é alta, sendo que o microrganismo é capaz de se desenvolver em meios contendo até 10% de NaCl ( $a_w$  0,935) (GERVILLA et al, 1997a). A *Listeria innocua* devido à sua proximidade filogenética a *Listeria monocytogenes* é considerada um indicador não patogênico para *Listeria monocytogenes* (FAIRCHILD et al, 1993).

*Lactobacillus helveticus* é considerado um termolactobacilo já que é capaz de se desenvolver em temperaturas de até 45°C. *Lactobacillus helveticus* pode ser utilizado como cultura *starter* na produção de uma grande variedade de produtos fermentados e como um intensificador de flavor capaz de reduzir o amargor e acelerar o desenvolvimento do flavor no queijo. É utilizado na produção dos queijos Emmental e Gruyere. A literatura descreve este microrganismo como apresentando maior resistência à alta pressão hidrostática que outros *Lactobacillus* spp (GERVILLA et al, 1999b). Entretanto, em relação à resistência do mesmo ao processo de homogeneização a ultra alta pressão nada foi encontrado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na inativação de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus* inoculados separadamente em leite desnatado.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Amostra**

Os ensaios foram realizados utilizando-se leite desnatado UHT ( $0,51 \pm 0,02$  % de gordura) de marca comercial adquirido em locais de venda na região de Campinas. Foram utilizadas amostras de um mesmo lote para os ensaios com cada um dos microrganismos avaliados.

### **2.2.2 Equipamento**

O equipamento utilizado foi um homogeneizador contínuo de ultra alta pressão (nG7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra). O mesmo opera com pressões entre 0 e 300 MPa e tem uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Após a passagem pelos pistões, o fluido pressurizado passa por uma válvula de retenção que realiza o desvio do fluido conforme o fluxo de pressurização necessário. O fluido é conduzido para uma válvula de homogeneização, na qual ocorre a expansão adiabática do mesmo, que retorna à pressão ambiente. Imediatamente após esta válvula, o fluido passa por um trocador de calor, com circulação externa de água a temperatura ambiente, de forma que, no final do trocador, atinja uma temperatura próxima à temperatura ambiente.

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar água e produto. O processo era iniciado utilizando-se água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, a válvula de alimentação foi aberta iniciando-se a alimentação do

produto. A estabilização de pressão foi realizada fazendo-se circular água no interior do equipamento para que não houvesse desperdício de amostra. Após 90 segundos da abertura da alimentação de produto foi realizada a coleta da amostra tratada. Esta coleta foi realizada no interior de uma câmara de fluxo laminar de modo a garantir que a mesma fosse realizada de maneira asséptica.

O tempo de residência do fluido no interior do equipamento é de cerca de 40 segundos, incluindo o trocador de calor. Padronizou-se a retirada das amostras somente após 90 segundos para garantir que não houvesse nenhum efeito de diluição da amostra devido ao fato da estabilização do equipamento ter sido realizada com água.

O equipamento apresenta três termopares para controle de temperatura, posicionados nos seguintes pontos:

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

A função dos termopares foi monitorar o produto sendo tratado e certificar-se que a temperatura não influenciou na redução das cargas de microrganismos.

Após a coleta das amostras, o equipamento foi despressurizado e circulou-se água durante aproximadamente 10 minutos com o objetivo de lavar as tubulações. A seguir, conectou-se uma linha com etanol 70% para a sanitização das tubulações. O interior do equipamento foi mantido preenchido com etanol até a realização do próximo experimento.

### 2.2.3 Preparo das Culturas

#### 2.2.3.1 *Pseudomonas fluorescens*

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* utilizada foi IB 2312 do Instituto Biológico de São Paulo disponível no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP. A cultura encontrava-se estocada em *skim milk* (Oxoid). Dois dias antes de cada experimento, a cultura foi descongelada, realizou-se uma inoculação 1% em caldo TSB (0,3 mL de cultura em 30 mL de caldo) em erlenmeyer de 125 mL e o mesmo foi incubado a 30°C por 24 horas. Optou-se pela realização dos repiques em erlenmeyer de 125 mL e não em tubos de ensaio para aumentar a área de contato com o ar e assim favorecer o crescimento deste microrganismo. A seguir realizou-se o segundo repique de maneira semelhante ao anterior, entretanto o tempo de incubação foi de 20 horas (período após o qual foi obtida contagem máxima). Neste ponto a cultura foi retirada da estufa e as amostras de leite foram inoculadas de modo a se obter uma contagem de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. As amostras foram então submetidas ao processo de HUAP. As contagens foram realizadas através de plaqueamento em superfície de diluições decimais sucessivas utilizando-se o meio de cultura TSA (Oxoid). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas (HAUN, 2004).

#### 2.2.3.2 *Listeria innocua*

A cultura de *Listeria innocua* utilizada foi a cultura LH 475 cedida pelo Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP. A cultura encontrava-se estocada em *skim milk* (Oxoid). Dois dias antes de cada experimento, a cultura foi descongelada, realizando-se então uma inoculação 1% em caldo TSBYE 0,6% (0,1 mL de cultura em 10 mL de caldo) em tubo de ensaio que foi incubado a 37°C por 24 horas. A seguir realizou-se o segundo repique de maneira semelhante ao anterior, entretanto o tempo de incubação foi de 18 horas (período após o qual se obteve máxima contagem). Neste ponto a cultura foi retirada da estufa e as amostras de leite foram

inoculadas, obtendo-se uma contagem de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. Estas amostras foram então submetidas ao processo de HUAP. Após os processos, as contagens foram realizadas através de plaqueamento em superfície de diluições decimais sucessivas utilizando-se o meio de cultura TSAYE 0,6% (Oxoid). A leitura das placas foi feita após 24 horas de incubação a 37°C (GERVILLA et al, 1997a).

### **2.2.3.3 *Lactobacillus helveticus***

A cultura de *Lactobacillus helveticus* utilizada foi CCT 3737 (ATCC 15009) disponível na Coleção de Culturas Tropical (Campinas-SP). A cultura encontrava-se congelada em *skim milk* (Oxoid). Dois dias antes de cada experimento, a cultura foi descongelada, realizou-se uma inoculação 1% em caldo MRS (0,1 mL de cultura em 10 mL de caldo) em tubo de ensaio, sendo incubado a 37°C por 24 horas. A seguir realizou-se o segundo repique de maneira semelhante ao anterior, incubando-se também por 24 horas (período após o qual se obteve contagem máxima). Neste ponto a cultura foi retirada da estufa e inoculada nas amostras de leite de modo a se obter uma contagem de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL. As amostras foram submetidas ao processo de HUAP e as contagens foram feitas através do plaqueamento em profundidade (com sobrecamada) de diluições decimais sucessivas em ágar MRS (Oxoid). Após 72 horas de incubação a 37°C procedeu-se a leitura das placas (GERVILLA et al, 1999b).

## **2.2.4 Inativação de Microrganismos por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

### **2.2.4.1 Testes Preliminares**

Inicialmente foram realizados ensaios de triagem. Os testes foram realizados separadamente para cada um dos microrganismos testados. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a realização dos experimentos.

Esta triagem consistiu em submeter as amostras inoculadas a processamentos a 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. O intuito do teste foi verificar

qual destas pressões era capaz de causar destruição total da carga inoculada e a partir disso redefiniu-se a faixa de pressões a ser utilizada para a realização dos ensaios. Os processos foram avaliados em Número de Reduções Decimais (NRD – Equação 2.1) que cada pressão foi capaz de causar em cada um dos microrganismos testados e em todos os processos foi feita uma contagem da carga microbiana inicial.

$$\text{NRD} = \log N_o - \log N_f \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde:

$N_o$ : contagem inicial (UFC/mL)

$N_f$ : contagem final (UFC/mL)

A partir do gráfico de NRD em função da pressão de homogeneização, foi calculado o valor de  $D_p$  (constante de morte por pressão). Este valor corresponde ao inverso negativo da inclinação da reta obtida.

Considerando os resultados obtidos nestes testes de triagem, foram redefinidas as faixas de pressões a serem estudadas para cada um dos microrganismos. Estes ensaios são descritos nos itens 2.2.4.2, 2.2.4.3 e 2.2.4.4 a seguir.

#### **2.2.4.2 *Pseudomonas fluorescens***

Para a realização do estudo de inativação de *Pseudomonas fluorescens* foram utilizadas as seguintes pressões: 100, 150, 170, 190 e 200 MPa. Os ensaios foram realizados em triplicata em cada uma das pressões e as contagens foram feitas imediatamente após os processos. As amostras processadas na pressão máxima foram também armazenadas a 7°C por 7 dias e foi feito um acompanhamento das contagens 1, 3 e 7 dias após o processo.

### **2.2.4.3 *Listeria innocua***

O estudo de inativação de *Listeria innocua* foi realizado utilizando-se as seguintes pressões: 100, 150, 200, 220, 240 e 250 MPa. Os ensaios foram realizados em triplicata em cada uma das pressões testadas e as contagens foram feitas imediatamente após os processos. As amostras processadas a 250 MPa foram também armazenadas a 7°C e foi feito um acompanhamento das contagens 1, 3 e 7 dias após o processo.

### **2.2.4.4 *Lactobacillus helveticus***

A destruição de *Lactobacillus helveticus* foi avaliada nas seguintes pressões: 100, 150, 200, 220, 230, 250 e 260 MPa. Os ensaios preliminares demonstraram que até 200 MPa a inativação provocada pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão é mínima (aproximadamente 1 ciclo logarítmico). Em função disso, decidiu-se concentrar um maior número de ensaios na faixa de pressão onde a inativação ocorre de maneira mais acentuada. Os testes foram realizados em triplicata em cada uma das pressões testadas e as contagens foram feitas imediatamente após os processos. As amostras processadas na pressão máxima, 260 MPa, foram também armazenadas a 7°C e, como para os demais microrganismos, foi feito um acompanhamento das contagens 1, 3 e 7 dias após o processo.

## **2.3 Resultados e Discussões**

### **2.3.1 Temperaturas de Processo**

A Tabela 2.1 mostra as temperaturas registradas em um dos ensaios de triagem realizados em cada uma das pressões.

Tabela 2.1: Temperaturas verificadas em cada umas das pressões nos ensaios de HUAP

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>3</sub> (°C)</b>
<b>100</b>	23,1	44,6	27,2
<b>150</b>	23,4	55,3	28,1
<b>200</b>	23,2	64,3	27,9
<b>250</b>	23,0	70,0	28,2
<b>300</b>	23,1	80,1	28,9

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização / entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

Conforme pode ser observado na Tabela 2.1, a temperatura na saída da válvula foi tanto maior quanto maior foi a pressão aplicada. As temperaturas apontadas pelo termopar 3 demonstram que o trocador de calor instalado é capaz de reduzir de maneira eficiente a temperatura da amostra, minimizando assim o efeito da elevação de temperatura em função da expansão adiabática que ocorre na saída da válvula de homogeneização.

Após sair da válvula de homogeneização, o fluido entra imediatamente no trocador de calor. Os cálculos realizados demonstraram que o tempo necessário para que a temperatura da amostra seja inferior a 40 °C no interior do trocador de calor é de 5 segundos nos processos a 300 MPa, quando a amostra sai da válvula de homogeneização a cerca de 80 °C, sendo inferior nos processos realizados nas demais pressões.

### **2.3.2 Inativação de Microrganismos por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

#### **2.3.2.1 Testes Preliminares**

Os resultados obtidos nos ensaios de triagem para cada um dos microrganismos são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: NRD observado nos ensaios preliminares de HUAP

Pressão (M Pa)	Número de Reduções Decimais (NRD)		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
100	2,54	0,34	0,29
150	3,78	0,87	0,60
200	> 7,62 *	1,33	1,17
250	> 7,62 *	> 7,28 *	3,06
300	> 7,62 *	> 7,28 *	> 6,79 *

\* não foram obtidas contagens

Em função do que foi observado na Tabela 2.2, foram redefinidas as faixas de pressões a serem estudadas para cada um dos microrganismos testados. Estes ensaios são descritos nos itens 2.3.2.2, 2.3.2.3 e 2.3.2.4 a seguir.

Os valores de D dos microrganismos testados encontrados na literatura são os seguintes:

- *Pseudomonas fluorescens*:  $D_{75^{\circ}\text{C}} = 9$  s e  $z = 8,7^{\circ}\text{C}$  (ALFENAS, 1999);
- *Listeria innocua*:  $D_{70^{\circ}\text{C}} = 1,5$  s e  $z = 5,8^{\circ}\text{C}$  (FAIRCHILD; FOEGEDING, 1993);
- *Lactobacillus helveticus*:  $D_{70^{\circ}\text{C}} = 3,7$  s e  $z = 6,3^{\circ}\text{C}$  (CASADEI et al, 2001).

Os dados apresentados acima asseguram que os efeitos de destruição dos microrganismos apresentados nos itens a seguir são praticamente devidos apenas ao efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão, sendo a contribuição do efeito térmico muito pequena, já que a 300, 250 e 200 MPa, os tempos para que a amostra atinja  $40^{\circ}\text{C}$  são de 4,5, 4,0 e 3,5 s, respectivamente.

### 2.3.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

A Tabela 2.3 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de inativação de *Pseudomonas fluorescens*. As contagens foram realizadas imediatamente após os processamentos.

Tabela 2.3: NRD observado nos ensaios de inativação de *Pseudomonas fluorescens* por HUAP

Pressão (MPa)	Número de Reduções Decimais (NRD)			Média	DP	CV (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			
	100	2,54	2,42			
150	3,78	3,65	3,94	3,79	0,14	3,80
170	4,54	4,19	4,55	4,43	0,20	4,62
190	5,99	4,79	5,81	5,53	0,65	11,70
200	>7,59 *	>7,78 *	>7,65 *	**	**	**

\* não foram obtidas contagens

\*\* não aplicável

Conforme pode ser observado na Tabela 2.3, o número de reduções decimais de *Pseudomonas fluorescens* em leite observado aumenta gradativamente com o aumento da pressão na faixa estudada. Pressões da ordem de 200 MPa foram capazes de causar uma redução igual ou superior a 7 ciclos logarítmicos.

Os resultados encontrados neste trabalho estão próximos aos reportados na literatura. Wuytack et al (2002), ao avaliarem a resistência de *Pseudomonas fluorescens* a homogeneização a ultra alta pressão, verificaram que 200 MPa foram capazes de causar uma redução de 5 ciclos na carga microbiana e 250 MPa resultaram em uma redução de 6 ciclos aproximadamente. Hayes, Fox e Kelly (2005) inocularam leite cru com  $10^6$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens* e verificaram que 200 MPa foram capazes de reduzir a carga a níveis não detectáveis.

Apenas as amostras processadas a 200 MPa foram incubadas a 7°C e, além das contagens realizadas imediatamente após os processos, foram feitas também contagens após 1, 3 e 7 dias. Os resultados revelaram que até 3 dias após o processo as contagens permaneceram inalteradas, ou seja, não foram obtidas colônias nas placas. Isto corresponde a contagens inferiores a 10 UFC/mL de amostra. Entretanto, nos plaqueamentos realizados 7 dias após o processo, a contagem média obtida nas amostras de leite foi de  $2,2 \times 10^2$  UFC/mL.

A Figura 2.1 apresenta a curva de destruição de *Pseudomonas fluorescens* por HUAP. Conforme já foi discutido anteriormente, observa-se que a destruição deste microrganismo varia de maneira linear na faixa de pressões estudada.

A partir da curva apresentada, foi calculado o valor de  $D_p$  (constante de morte por pressão) para *Pseudomonas fluorescens* na faixa de pressão estudada (100 a 190 MPa) que foi de 30,3 MPa.

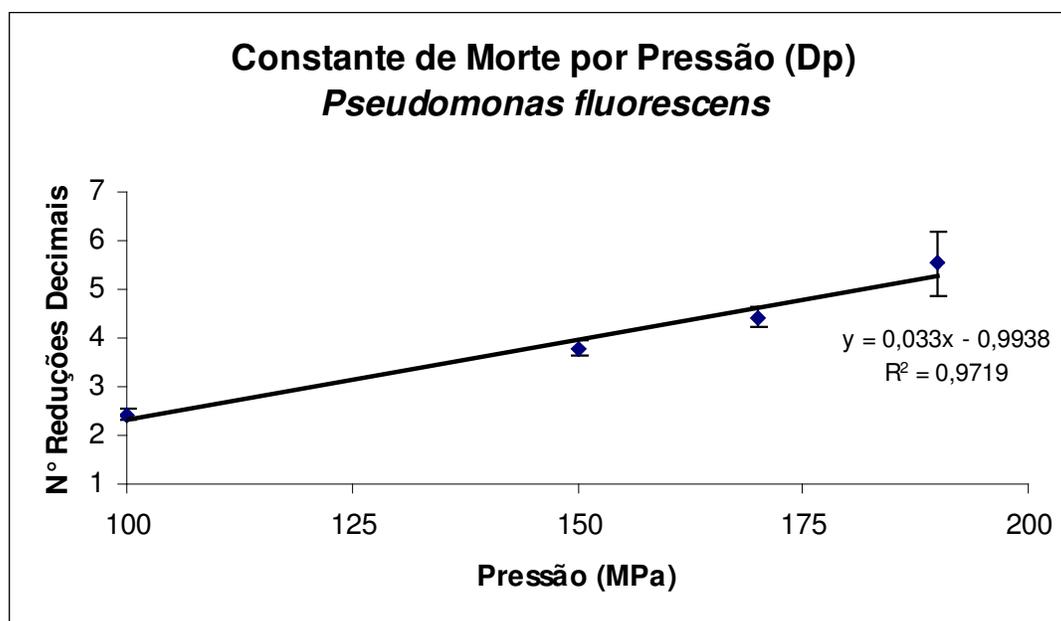


Figura 2.1: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para *Pseudomonas fluorescens*

### 2.3.2.3 *Listeria innocua*

Os resultados obtidos nos ensaios de inativação de *Listeria innocua* são apresentados na Tabela 2.4. As contagens foram realizadas imediatamente após os processamentos.

Tabela 2.4: NRD observado nos ensaios de inativação de *Listeria innocua* por HUAP

Pressão (MPa)	Número de Reduções Decimais (NRD)			Média	DP	CV (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			
	100	0,34	0,43			
150	0,87	0,81	1,08	0,95	0,11	11,65
200	1,33	1,86	1,55	1,58	0,26	16,72
220	3,58	3,55	3,77	3,63	0,12	3,28
240	6,47	5,77	6,67	6,30	0,47	7,50
250	>7,28 *	>7,17 *	>7,49 *	**	**	**

\* não foram obtidas contagens

\*\* não aplicável

Pressões da ordem de 150 MPa foram capazes de causar uma redução de apenas um ciclo logarítmico nas contagens de *Listeria innocua*. Pressões de 240 MPa causaram reduções da ordem de 6 ciclos logarítmicos. Enquanto que pressões superiores resultaram em destruição total da carga inoculada. Ao contrário do que ocorreu com a inativação de *Pseudomonas fluorescens*, para *Listeria innocua* o aumento do número de reduções decimais não ocorreu de forma gradativa, sendo mais acentuado entre 200 e 240 MPa (FIGURA 2.2).

Estes resultados diferem dos valores encontrados por Wuytack et al (2002). Os autores, ao avaliarem a resistência de *Listeria innocua* a homogeneização a ultra alta pressão, verificaram que pressões da ordem de 230 MPa foram capazes de causar uma redução de apenas 1 ciclo logarítmico na carga microbiana. Esta diferença pode ser atribuída a diferenças no equipamento de homogeneização a ultra alta pressão utilizado, tais como o formato da agulha.

Análises microbiológicas realizadas nas amostras inoculadas com *Listeria innocua* processadas a 250 MPa e incubadas a 7°C revelaram que até 3 dias após o processo as contagens permaneceram inalteradas, ou seja, não foram obtidas colônias nas placas, correspondendo a contagens inferiores a 10 UFC/mL de leite. Já nos plaqueamentos realizados 7 dias após o processo, a contagem média obtida nas amostras de leite foi de  $1,1 \times 10^2$  UFC/mL.

A Figura 2.2 apresenta a curva de destruição de *Listeria innocua* por HUAP. Conforme já foi discutido anteriormente, a destruição deste microrganismo não varia de maneira linear na faixa de pressões estudada. Observa-se uma curva quebrada de destruição por HUAP em duas regiões: a primeira de 100 a 200 MPa, onde o valor de  $D_p$  encontrado foi de 85,5 MPa e a segunda de 200 a 240 MPa, onde o valor de  $D_p$  foi de 8,5 MPa. Temos então uma primeira região onde a destruição do microrganismo é muito pequena e uma segunda região onde o NRD aumenta rapidamente em uma estreita faixa de pressão. Os valores de  $D_p$  de 85,5 MPa e 8,5 MPa refletem esta diferença observada nas duas regiões estudadas.

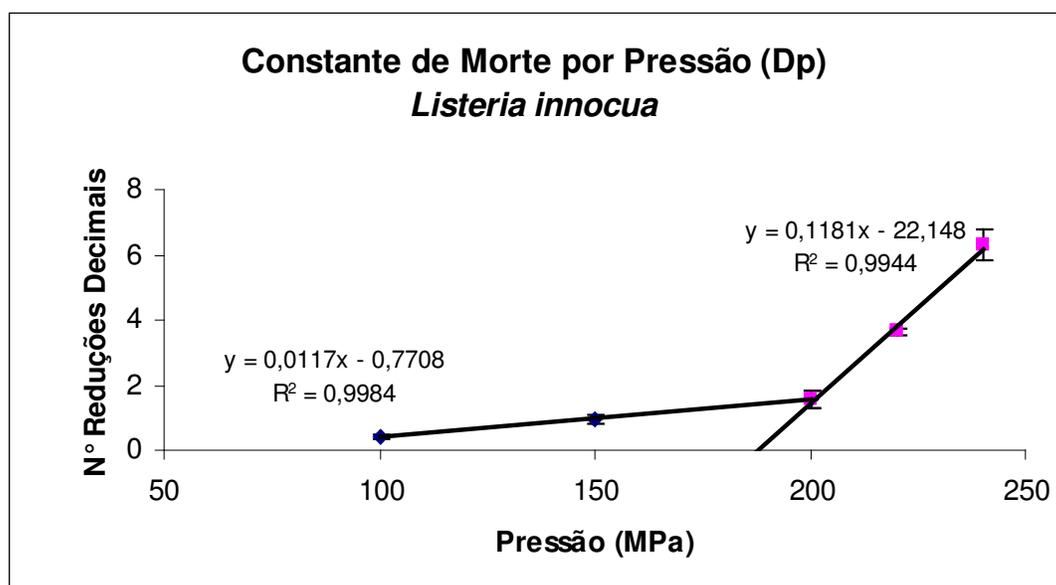


Figura 2.2: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para *Listeria innocua*

### 2.3.2.4 *Lactobacillus helveticus*

A Tabela 2.5 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de inativação de *Lactobacillus helveticus*. As contagens foram realizadas imediatamente após os processamentos.

Tabela 2.5: NRD observado nos ensaios de inativação de *Lactobacillus helveticus* por HUAP

Pressão (MPa)	Número de Reduções Decimais (NRD)			Média	DP	CV (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			
	100	0,29	0,36			
150	0,60	0,64	0,58	0,61	0,03	5,42
200	1,17	1,10	1,14	1,14	0,04	3,35
220	1,34	1,39	1,58	1,44	0,13	8,84
230	1,90	2,55	2,53	2,33	0,37	16,02
250	3,06	3,19	3,59	3,28	0,27	8,38
260	>7,04 *	>6,69 *	>6,66 *	**	**	**

\* não foram obtidas contagens

\*\* não aplicável

Conforme pode ser observado na Tabela 2.5 pressões da ordem de 200 MPa foram capazes de causar redução de apenas um ciclo logarítmico nas contagens de *Lactobacillus helveticus*. Pressões de 250 MPa foram capazes de causar reduções da ordem de 3 ciclos logarítmicos. Enquanto que pressões iguais ou superiores a 260 MPa resultaram em destruição total da carga inoculada. Considerando-se que a carga inicial era sempre igual ou superior a  $10^6$ , observa-se que na faixa de pressões entre 250 e 260 MPa, a destruição aumentou de 3,28 NRD para mais que 6 ciclos de redução.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem o efeito da homogeneização a ultra alta pressão em *Lactobacillus helveticus*. Entretanto, Dosualdo (2003) e Campos (2004) relatam que 250 MPa foram capazes de

inativar 7 ciclos de *Lactobacillus fructivorans* em água de coco e de *Lactobacillus plantarum* em suco de laranja.

As análises microbiológicas realizadas nas amostras inoculadas com *Lactobacillus helveticus* 1, 3 e 7 dias após o processamento a 260 MPa incubadas a 7°C revelaram que mesmo após 7 dias de incubação não foram obtidas contagens deste microrganismo nas amostras de leite (< 1 UFC/mL).

A Figura 2.3 apresenta a curva de destruição de *Lactobacillus helveticus* por HUAP. Assim como ocorreu com a *Listeria innocua*, observa-se a divisão da curva de destruição por HUAP em duas regiões: a primeira de 100 a 200 MPa, onde o valor de  $D_p$  encontrado foi de 132,6 MPa e a segunda de 200 a 250 MPa, onde o valor de  $D_p$  foi de 22,4 MPa. Temos então uma primeira região onde a destruição do microrganismo é muito pequena e uma segunda região onde o NRD aumenta rapidamente em uma estreita faixa de pressão. Esta diferença nas duas regiões estudadas é refletida pelos valores de  $D_p$ , 132,6 MPa e 22,4 MPa, encontrados.

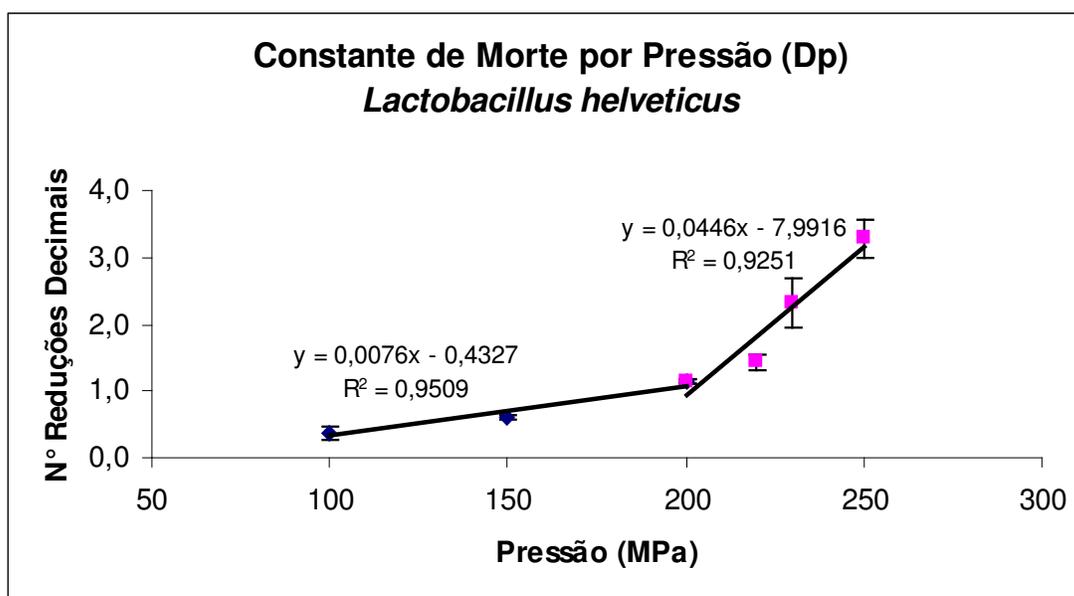


Figura 2.3: Constante de Morte por Pressão ( $D_p$ ) para *Lactobacillus helveticus*

A diferença observada nas resistências dos microrganismos avaliados neste estudo ao processo de homogeneização a ultra alta pressão foi semelhante ao verificado nos estudos com alta pressão hidrostática, onde microrganismos gram negativos, em função do tipo de parede, foram mais facilmente inativados (GERVILLA et al, 1997a; GERVILLA et al, 1997b; GERVILLA et al, 1999b). Dentre os gram positivos, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus*, pouca diferença foi observada no que se refere a pressão de inativação total (250 e 260 MPa, respectivamente). Entretanto, observa-se que o ponto de quebra da curva de inativação do *Lactobacillus helveticus* é mais acentuado, ou seja, em uma estreita variação na pressão, tem-se um aumento considerável no NRD, já para a *Listeria innocua* este aumento foi um pouco menos acentuado para uma mesma variação de pressão.

O aumento nas contagens de *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua* após 7 dias de armazenamento a 7°C verificado pode ser atribuído ao fato destes dois microrganismos serem psicrófilos. O plaqueamento realizado imediatamente após o processo de leite inoculado com estes microrganismos a 200 e 250 MPa, respectivamente, indicou contagens inferiores a 10 UFC/mL. Entretanto, é possível que algum eventual sobrevivente ao ser mantido por 7 dias em leite, que é um excelente meio de cultura, e a uma temperatura adequada para o seu crescimento tenha se multiplicado, atingindo-se no final do período uma contagem da ordem de  $10^2$  UFC/mL.

## 2.4 Conclusão

O processo de homogeneização a ultra alta pressão foi efetivo na inativação de células vegetativas de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus* em leite desnatado, sendo que pressões de 200, 250 e 260 MPa, respectivamente, reduziram a carga inoculada ( $10^7$  UFC/mL) a níveis indetectáveis nas contagens realizadas imediatamente após os processos. As amostras inoculadas com os microrganismos psicrófilos, *Pseudomonas fluorescens* e *Listeria innocua*, processadas a 200 e 250 MPa apresentaram contagens da ordem de  $10^2$  UFC/mL após 7 dias de armazenamento a 7°C.

## 2.5 Referências Bibliográficas

ALFENAS, R. D. Thermoresistance of acid producing psychrotrophic bacteria isolated from milk. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 49, n. 1, p. 72-75, 1999.

CAMPOS, F.P. **Estudo do Processamento de Suco de Laranja através da Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

CASADEI, M. A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**. v. 63, n. 1/2, p. 125-134, 2001.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A review. **Journal of Food Protection**. v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In: **IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**. v. 53, n. 1, p. 139-177, 1986.

FAIRCHILD, T. M.; FOEGEDING, P. M. A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Proteinases. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 4, p. 1247-1250, 1993.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 1, p. 33-37, 1997.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. **Journal of Dairy Science**. v. 80, n. 10, p. 2297-2303, 1997.

GERVILLA, R.; MOR-MUR, M.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated into ewe's milk by high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**. v. 16, n. 2, p. 173-184, 1999.

GERVILLA, R.; SENDRA, E.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* inoculated into ewe's milk to

high hydrostatic pressure. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 6, p. 1099-1107, 1999.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. , p. 25-33, 2005.

HOOVER, D. G. Pressure effects on Biological Systems. **Food technology**. v. 47, n. 6, p. 150-154, 1993.

KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 5, p. 435-446, 2002.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. High-Pressure. **Journal of Food Protection**. v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

RITZ, M.; FREULET, M.; ORANGE, N.; FEDERIGHI, M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55, n.1/3, p. 115-119, 2000.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

WUYTACK, E. Y.; PHUONG, L. D. T.; AERTSEN, A. et al. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 1, p. 31-37, 20

### **3 Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) sobre Esporos de *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium sporogenes* em Leite Desnatado**

#### **Resumo**

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma técnica alternativa de preservação de alimentos que permite a obtenção de um produto processado com alterações mínimas. Neste trabalho, o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na inativação esporos de *Bacillus stearothermophilus* e de *Clostridium sporogenes* em leite desnatado foi avaliado. Os resultados demonstraram que pressões de até 300 MPa não foram capazes de causar qualquer redução nas contagens obtidas. Verificou-se também que o processo de homogeneização a ultra alta pressão não afetou significativamente a resistência térmica dos mesmos ( $p < 0,05$ ). Avaliou-se ainda o efeito da utilização de temperaturas de entrada superiores (45°C) e também da aplicação de choque térmico (100°C por 15 minutos) antes de submeter as amostras ao processo. Nestes ensaios novamente não foram observadas reduções nas contagens. Mesmo após 16 passagens pela válvula de homogeneização, redução de apenas 0,67 ciclo logarítmico foi observada. Verificou-se também que pressões da ordem de 300 MPa não causaram qualquer redução nas contagens de *Clostridium sporogenes*. Os resultados demonstraram que o processo de homogeneização a ultra alta pressão não foi capaz de inativar esporos de *Bacillus stearothermophilus* e de *Clostridium sporogenes* em leite desnatado na faixa de pressão avaliada (100 a 300 MPa).

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite desnatado, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium sporogenes*.

## **Effect of Ultra High Pressure Homogenization Process (UHPH) on *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* Spores in Skim Milk**

### **Abstract**

Ultra high pressure homogenization is an alternative food processing technique. As product heating is minimum, its characteristics are not affected in a large extent. At this work, inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores in skim milk by ultra high pressure homogenization (UHPH) was studied. Results showed that pressures up to 300 MPa were not able cause any reduction on spore counts. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* in skim milk was determined before and after submitting samples to 300 MPa ultra high pressure homogenization processes. It was observed that the process did not affect in a statistically significant way thermal resistance of spores ( $p < 0.05$ ). Effect of inlet temperature (45 °C) and thermal chock application (100 °C – 15 min) before ultra high pressure homogenization processes were also evaluated. At these tests spore counts were not reduced again. Even after 16 passes through the homogenization valve, only a 0.67 logarithmic cycle reduction was observed. 300 MPa were not able cause any reduction on *Clostridium sporogenes* spore counts. In conclusion, results showed that ultra high pressure homogenization was not able to reduce *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spore counts in skim milk at pressure range tested (100 to 300 MPa).

Key-words: Ultra high pressure homogenization, skim milk, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium sporogenes*.

### 3.1 Introdução

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma técnica alternativa de processamento de alimentos que permite a obtenção de produtos processados com alterações mínimas em suas características.

A homogeneização a ultra alta pressão é utilizada na indústria farmacêutica, cosmética, química e de alimentos no preparo ou estabilização de emulsões e suspensões ou para criar alterações físicas, como mudanças na viscosidade dos produtos. O desenvolvimento de aplicações do processo de homogeneização a alta pressão permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na medida em que causa inativação microbiana (DIELS et al, 2004).

A literatura apresenta uma série de trabalhos onde os autores avaliaram o efeito da aplicação de alta pressão hidrostática na redução tanto de células vegetativas como de esporos de microrganismos (HOOVE,1993; PATTERSON et al, 1995; RITZ et al,2000; FURUKAWA et al, 2000; FURUKAWA; HAYAKAWA, 2001; MOERMAN et al, 2001; WUYTACK; MICHIELS, 2001; LEE et al, 2002; FURUKAWA et al, 2003; HEIJI et al, 2003; LÓPEZ-PENDEMONTTE et al, 2003; REDDY et al, 2003; MARGOSCH et al, 2004; RODRIGUEZ et al, 2004; OPTSAL et al, 2004; GAO; JIANG, 2005; MOERMAN, 2005). A maior parte dos autores, concluiu que o emprego de alta pressão hidrostática induz a germinação dos esporos, sendo os mesmos facilmente inativados pela aplicação de outro processo de alta pressão ou por um tratamento térmico subsequente muito mais brando do que o que seria necessário para inativar os esporos, caso a alta pressão não tivesse sido aplicada.

Já com relação ao método de homogeneização a ultra alta pressão apenas trabalhos envolvendo inativação de células vegetativas foram encontrados (KHEADR et al, 2002; WUYTACK et al, 2002; DOSUALDO, 2003; CAMPOS, 2004; HAYES, 2005). No que se refere à inativação de esporos, até o momento nada foi encontrado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão sobre esporos de *Bacillus stearothermophilus* e de *Clostridium sporogenes* em leite desnatado, bem como a possibilidade da combinação de homogeneização a ultra alta pressão e processos térmicos na inativação dos mesmos.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Amostra**

Os ensaios foram realizados utilizando-se leite desnatado UHT ( $0,47 \pm 0,03$  % de gordura) de marca comercial adquirido em local de venda na região de Campinas proveniente de um único lote.

### **3.2.2 Equipamento**

O equipamento utilizado foi um homogeneizador contínuo de ultra alta pressão (nG7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra). O mesmo opera com pressões entre 0 e 300 MPa e tem uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Após a passagem pelos pistões, o fluido pressurizado passa por uma válvula de retenção que realiza o desvio do fluido conforme o fluxo de pressurização necessário. O fluido é conduzido para uma válvula de homogeneização, na qual ocorre a expansão adiabática do mesmo, que retorna à pressão ambiente. Imediatamente após esta válvula, o fluido passa por um trocador de calor, com circulação externa de água a temperatura ambiente, de forma que, no final do trocador, atinja uma temperatura próxima à temperatura ambiente.

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar água e produto. O processo era iniciado utilizando-se água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, a válvula de alimentação foi aberta iniciando-se a alimentação do produto. A estabilização de pressão foi realizada fazendo-se circular água no interior do equipamento para que não houvesse desperdício de amostra. Após 90 segundos da abertura da alimentação de produto foi realizada a coleta da amostra tratada. Esta coleta foi realizada no interior de uma câmara de fluxo laminar de modo a garantir que a mesma fosse realizada de maneira asséptica.

O tempo de residência do fluido no interior do equipamento é de cerca de 40 segundos, incluindo o trocador de calor. Padronizou-se a retirada das amostras somente após 90 segundos para garantir que não houvesse nenhum efeito de diluição da amostra devido ao fato da estabilização do equipamento ter sido realizada com água.

O equipamento apresenta três termopares para controle de temperatura, posicionados nos seguintes pontos:

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização / entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

A função dos termopares era monitorar o produto sendo tratado e certificar-se que a temperatura não influenciou na redução das cargas de microrganismos.

Após a coleta das amostras, o equipamento foi despressurizado e iniciou-se a limpeza da seguinte maneira: inicialmente fez-se circular água destilada por cerca de 20 minutos, a seguir utilizou-se soda 2,5% também por 20 minutos, após foi feito enxágüe com água, e após remoção da mesma (monitorada pela utilização de papel indicador), utilizou-se ácido peracético 0,1% novamente por 20

minutos. Finalmente, o ácido foi removido utilizando-se água destilada e o equipamento foi preenchido e permaneceu com etanol 70% até a realização do próximo experimento.

### **3.2.3 Microrganismos**

#### **3.2.3.1 *Bacillus stearothermophilus***

A suspensão de esporos do *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 foi produzida a partir de uma suspensão disponível no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp. A produção da suspensão foi feita seguindo a metodologia proposta por Pflug (1990) e estocada a 4°C em tampão Butterfield.

Nas contagens de *Bacillus stearothermophilus* o plaqueamento foi feito em profundidade após choque para ativação de 100°C por 15 minutos. O meio de cultura utilizado foi TSA (Oxoid) e as placas foram incubadas a 55°C por 48 horas (CAMARGO, 1995).

#### **3.2.3.2 *Clostridium sporogenes* (PA 3679)**

A suspensão de *Clostridium sporogenes* (PA 3679) utilizada foi cedida pelo Núcleo de Microbiologia do ITAL (Campinas-SP). Esta suspensão era proveniente da *National Canners Association* (Estados Unidos). Fez-se necessária a utilização de geradores de anaerobiose (Anaerogen – Oxoid), por tratar-se de microrganismo anaeróbio. O plaqueamento foi feito em profundidade após choque para ativação de 100°C por 8 minutos. O meio de cultura utilizado foi o Agar PA descrito por Grischy, Speck e Adams (1983) e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

### **3.2.4 Estudo do Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão sobre Esporos de *Bacillus stearothermophilus***

O estudo do efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus* foi dividido em 5 etapas.

Inicialmente determinou-se o efeito do processo na inativação dos mesmos. A seguir, foi avaliado o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na resistência térmica dos esporos. Verificou-se ainda o efeito da aplicação de choque térmico à suspensão de esporos antes de submeter as amostras ao processamento (100°C por 15 min) e também da utilização de temperaturas de entrada da superiores às usuais (45°C). Finalmente, testou-se o efeito de recirculação da amostra.

Em todos os ensaios as amostras foram mantidas sob refrigeração até instantes antes da realização dos experimentos. A única exceção foi o ensaio descrito no item 3.2.4.4.

A suspensão de esporos produzida apresentou uma contagem da ordem de  $10^8$  esporos/mL de suspensão. A cada litro de amostra foi adicionado 1 mL de suspensão de modo que a contagem final fosse de aproximadamente  $10^5$  esporos/mL de leite.

Os processos foram avaliados em Número de Reduções Decimais (NRD – Equação 3.1) que cada pressão foi capaz de causar.

$$\text{NRD} = \log N_0 - \log N_f \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde:

$N_0$ : contagem inicial (UFC/mL)

$N_f$ : contagem final (UFC/mL)

A contagem do número de sobreviventes nas amostras imediatamente após os processos foi feita através de diluições decimais sucessivas e antes de submeter o leite inoculado ao processamento, uma amostra foi retirada para que fosse feito um controle da população inicial de esporos.

#### **3.2.4.1 Inativação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

As amostras inoculadas foram submetidas a processos de homogeneização a ultra alta pressão a 100, 200 e 300 MPa. Os processos foram realizados em triplicata.

#### **3.2.4.2 Determinação do Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Resistência Térmica de Esporos de *Bacillus stearothermophilus***

Os parâmetros D e z do *Bacillus stearothermophilus* foram determinados em triplicata antes e após submeter as amostras ao processo de homogeneização a ultra alta pressão a 300 MPa. Esta determinação foi feita apenas na pressão máxima de trabalho do equipamento, onde um maior efeito era esperado. As determinações foram feitas seguindo-se a metodologia dos tubos TDT (STUMBO, 1973).

Resumidamente, o procedimento consistiu em preencher tubos de ensaio de borossilicato de 10 mm de diâmetro externo, 8 mm de diâmetro interno e 10 cm de altura com 1,8 mL de leite e adicionar 0,2 mL da suspensão de esporos, de modo que a concentração inicial de esporos fosse da ordem de  $10^6$  esporos/mL. Nos ensaios realizados após os processamentos, 2 mL da amostra processada foram adicionados a cada um dos tubos. Os tubos foram selados assepticamente com maçarico e imersos em um banho digital Cole-Parmer® Polystat® com precisão de  $\pm 0,01$  °C contendo etilenoglicol após a temperatura do mesmo ter sido estabilizada. O experimento foi realizado em 3 temperaturas diferentes: 110, 115 e 121 °C. A cada intervalo de tempo pré-estabelecido um tubo foi retirado e colocado em banho de gelo. Os tubos foram abertos assepticamente no interior de uma câmara de fluxo laminar.

Os intervalos de tempo foram determinados com base em valores de D e z deste microrganismo obtidos na literatura (PINHO, 2004). Na Tabela 3.1 observam-se os tempos empregados.

Um tubo preparado da mesma forma que os demais foi utilizado como controle da população inicial de microrganismos. Este tubo foi submetido a choque térmico de cerca de 15 minutos em banho de água fervente para que os esporos fossem ativados.

Tabela 3.1: Parâmetros empregados na realização do teste TDT

Temperaturas (°C)	Tempos (min) *
110	10,0 / 20,0 / 30,0 / 40,0 / 60,0 / 90,0
115	3,0 / 6,0 / 12,0 / 18,0 / 24,0 / 30,0
121	0,5 / 1,0 / 1,5 / 2,0 / 3,0 / 4,0

\*Obs: os tempos são apresentados já descontando-se o atraso térmico dos tubos de 2 minutos.

Conhecendo-se o tempo de imersão e o número de sobreviventes em cada um destes tempos foi possível calcular o valor D em cada uma das temperaturas. O tempo de atraso foi descontado dos tempos de imersão, quando se realizaram os cálculos do parâmetro D. Conhecendo-se o valor D do microrganismo no alimento em 3 temperaturas diferentes foi possível determinar o valor do parâmetro z a partir da curva fantasma antes e após submeter as amostras ao processo de homogeneização a ultra alta pressão.

#### **3.2.4.3 Efeito do Choque Térmico Anterior ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus***

Antes da inoculação, a suspensão foi submetida a um choque térmico de 100°C por 15 minutos. O objetivo do teste foi verificar se esporos ativados seriam mais sensíveis ao processo de homogeneização a ultra alta pressão que esporos não ativados. As amostras inoculadas foram submetidas a processos a 300 MPa. O processo foi realizado em triplicata.

#### **3.2.4.4 Efeito da Temperatura de Entrada na Resistência de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

Nestes ensaios, a amostra foi aquecida até aproximadamente 45°C, inoculada com a suspensão de *Bacillus stearothermophilus* e submetida ao processo de homogeneização a ultra alta pressão a 300 MPa. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **3.2.4.5 Efeito da Recirculação**

Fez-se a amostra inoculada com a suspensão de *Bacillus stearothermophilus* recircular por aproximadamente 23 minutos a 300 MPa. O objetivo deste ensaio foi avaliar o efeito de múltiplas passagens na resistência do microrganismo a homogeneização a ultra alta pressão. O fator limitante para o tempo de processo foi a capacidade do equipamento, já que o mesmo não opera adequadamente por períodos maiores de tempo. Após 22 min 45 s de processo, ocorreu travamento de um dos pistões do equipamento e o ensaio foi finalizado.

Como o objetivo foi avaliar o efeito do maior número possível de passagens na inativação de esporos e tendo como fator limitante o tempo de operação do equipamento, optou-se por trabalhar com um volume mínimo de amostra, 375 mL. Testes preliminares revelaram que este volume era suficiente para preencher o interior do equipamento e ainda permitir a retirada de amostras ao longo do experimento. A amostra inoculada foi colocada em uma proveta e procedeu-se a recirculação. Foram retiradas 6 amostras ao longo do processo, além da contagem inicial. Amostras de 1 mL foram retiradas nos seguintes tempos: 5 min 6 s, 8 min 54 s, 10 min 2 s, 15 min, 20 min 2 s e 22 min 45 s, quando ocorreu travamento de um dos pistões.

O tempo de residência no interior do equipamento foi determinado utilizando-se leite adicionado do corante verde de bromocresol. Inicialmente, fez-se circular leite puro no interior do equipamento. Ao primeiro sinal de leite na saída

do mesmo, o cronômetro foi partido e o leite coletado em um béquer separadamente. Simultaneamente, a entrada de leite puro foi fechada e abriu-se a entrada de leite adicionado de corante. No instante em que o corante foi visualizado na saída, o cronômetro foi parado e o volume de leite puro recolhido foi medido. Foi possível então calcular a vazão do equipamento. Multiplicando-se a vazão pelo tempo de tomada de cada amostra, obteve-se o volume circulado até aquele instante. Dividindo-se este volume total pelo volume da amostra (375 mL), obteve-se uma estimativa do número de passagens aproximado do fluxo principal pela válvula até o instante da amostragem.

Para efeito de comparação foi determinado ainda o valor de D a 110°C do *Bacillus stearothermophilus* após 22 min e 45 s de recirculação. Os tempos empregados foram os mesmos descritos no item 3.2.4.2.

#### **3.2.4.6 Ensaio com *Clostridium sporogenes* (PA 3679)**

Em função dos resultados obtidos nos ensaios com *Bacillus stearothermophilus*, decidiu-se avaliar o efeito da homogeneização a ultra alta pressão sobre esporos de *Clostridium sporogenes* (PA 3679).

Amostras inoculadas com  $10^4$  esporos/mL foram processadas a 300 MPa, testou-se o efeito da aplicação de choque térmico antes da inoculação (100°C por 8 min) e também o efeito da aplicação de homogeneização a ultra alta pressão na resistência térmica do mesmo, através da determinação do parâmetro D a 110°C antes e após o processamento a alta pressão. A determinação do parâmetro D foi feita da mesma forma que a descrita para o *Bacillus stearothermophilus* no item 3.2.4.2. Os tempos utilizados para a realização do teste foram 5, 10, 20, 30, 40 e 50 minutos.

#### **3.2.5 Análise Estatística**

Os dados obtidos no item 3.2.4.2 foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA 5.0 através de ANOVA e teste de média (Tukey).

### 3.3 Resultados e Discussões

#### 3.3.1 Inativação de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* por Homogeneização a Ultra Alta Pressão

A Tabela 3.2 abaixo apresenta os resultados obtidos nas contagens realizadas imediatamente após processamentos a 100, 200 e 300 MPa.

Tabela 3.2: NRD observadas nos ensaios de inativação de *Bacillus stearothermophilus* por HUAP

Pressão (M Pa)	Número de Reduções Decimais (NRD)			Média	DP	CV (%)
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3			
	100	-0,55	-0,35			
200	-0,48	-0,28	-0,12	-0,29	0,18	62,23
300	-0,07	-0,19	-0,44	-0,23	0,19	82,53

Conforme pode ser verificado na Tabela 3.2, em todos os ensaios ocorreu um ligeiro aumento nas contagens de esporos obtidas após os processamentos, sendo o mesmo refletido pelos valores negativos de NRD. Isto demonstra que o processo de homogeneização a ultra alta pressão isoladamente não foi capaz de inativar os esporos de *Bacillus stearothermophilus*, e possivelmente tenha contribuído para a ativação dos mesmos, assim como o observado pelo processo de alta pressão hidrostática (GOULD, 1973). Os elevados valores de coeficiente de variação observados podem ser atribuídos ao fato dos valores de NRD serem muito pequenos.

#### 3.3.2 Determinação do Efeito do Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na Resistência Térmica de Esporos de *Bacillus stearothermophilus*

Os parâmetros D e z do *Bacillus stearothermophilus* em leite determinados em triplicata antes e após o processo de homogeneização a ultra alta pressão a 300 MPa são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Resistência Térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* antes e após o processo de HUAP

	Antes HUAP			Após HUAP – 300 MPa		
	110 °C	115 °C	121 °C	110 °C	115 °C	121 °C
D <sub>1</sub> (min)	29,65	8,49	1,12	30,85	7,70	1,11
R <sup>2</sup>	0,9391	0,9905	0,9617	0,9803	0,9992	0,9912
D <sub>2</sub> (min)	30,59	6,93	1,21	32,23	7,66	0,98
R <sup>2</sup>	0,9810	0,9973	0,9579	0,9654	0,9548	0,9815
D <sub>3</sub> (min)	30,73	9,31	0,96	31,03	7,76	1,02
R <sup>2</sup>	0,9633	0,9860	0,9709	0,9572	0,9897	0,9954
D médio (*)						
(min)	30,33 <sup>a</sup>	8,24 <sup>b</sup>	1,10 <sup>c</sup>	31,37 <sup>a</sup>	7,71 <sup>b</sup>	1,04 <sup>c</sup>
DP	0,59	1,21	0,13	0,7500	0,05	0,07
CV (%)	1,94	14,72	11,51	2,39	0,66	6,72
z (°C)		7,41			7,60	
R <sup>2</sup>		0,9976			0,9949	

\* valores sem letras em comum diferem estatisticamente (p<0,05)

Na literatura, os valores encontrados para os parâmetros de destruição térmica do *Bacillus stearothermophilus* são bastante variados. Stumbo (1973), cita D<sub>121°C</sub> entre 4 e 5 minutos e z entre 7,8 e 12,2°C. Valores semelhantes foram apontados por Jay (1994).

Feeherry, Munsey e Rowley (1987) reportaram D igual a 62,04, 18,00, 8,00, 3,33 e 1,05 minutos para *Bacillus stearothermophilus* a 112,8, 115,6, 118,3, 121,1 e 123,9°C. Já Fernandez, Ocio, Martinez (1994) apresentam D<sub>121°C</sub> igual a 2,0 minutos para *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 variedade lisa e 0,6 minutos para a variedade rugosa.

Camargo (1995) ao isolar a linhagem mais termorresistente de *Bacillus stearothermophilus* em purê de cenoura encontrou D<sub>118°C</sub> de 3,20 minutos e D<sub>121,°C</sub> igual a 1,75 minutos.

Desta forma, verifica-se que os valores encontrados neste trabalho estão na faixa daqueles citados pela literatura.

Os dados apresentados na Tabela 3.3 foram submetidos à análise estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ) que demonstrou não existirem diferenças significativas a um nível de significância de 95% entre os valores de D do *Bacillus stearothermophilus* em leite antes e após submeter as amostras ao processo de homogeneização a ultra alta pressão a 300 MPa em cada uma das temperaturas avaliadas. Verificou-se assim, que pressões da ordem de 300 MPa não foram capazes de afetar significativamente a resistência térmica dos esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Desta forma, não se justifica a combinação de homogeneização a ultra alta pressão e um tratamento térmico posterior ao processo, já que o processo de homogeneização em nada contribuiria para a redução da população de esporos do produto pela redução do valor de D.

### **3.3.3 Efeito do Choque Térmico anterior ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão na inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus***

Nos processos em que a suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophilus* foi submetida a um choque térmico (100°C por 15 minutos) antes da inoculação e processamento das amostras a 300 MPa, o valor de NRD médio obtido foi de  $-0,31 \pm 0,12$ . Assim como ocorreu nos ensaios anteriores, foi observado um ligeiro aumento nas contagens após o processamento, demonstrando que a aplicação de choque térmico antes do processo não teve qualquer efeito na sensibilização dos esporos ao processo de homogeneização a ultra alta pressão e possivelmente tenha contribuído para a ativação dos mesmos.

É importante salientar que o binômio tempo-temperatura adotado foi o mesmo aplicado para ativação de esporos deste microrganismo (100°C por 15 minutos). O objetivo foi realizar um teste em uma situação limite, já que este binômio é bastante elevado para uma possível aplicação prática deste tipo de processo, onde as alterações em termos sensoriais e nutricionais seriam

consideravelmente maiores do que as verificadas no processo UHT tradicional. Entretanto, como o mesmo não foi capaz de causar qualquer efeito no sentido de reduzir a resistência dos esporos ao processo de homogeneização a ultra alta pressão, binômios menores e que pudessem ter algum tipo de aplicação prática não foram testados.

#### **3.3.4 Efeito da Temperatura de Entrada na Resistência de Esporos de *Bacillus stearothermophilus* ao Processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

O valor de NRD médio obtido nos ensaios em que a amostra foi aquecida até aproximadamente 45°C, antes da inoculação com a suspensão de *Bacillus stearothermophilus* foi de  $-0,23 \pm 0,02$ .

Nestes ensaios a temperatura na saída da válvula de homogeneização foi de cerca de 83,6°C. Mais uma vez, os resultados revelaram um ligeiro aumento nas contagens de esporos obtidas após os processos.

#### **3.3.5 Efeito da Recirculação**

Inicialmente foi determinado o tempo de residência, bem como o volume de preenchimento do equipamento, conforme descrito em 3.2.4.5. Os valores encontrados foram um tempo de residência de 28,5 s e um volume de 127,5 mL, o que resultou em uma vazão de aproximadamente 270 mL/min. Estimou-se então o número de passagens do fluxo principal pela válvula de homogeneização, considerando que o volume de amostra processado foi de 375 mL. Os resultados são apresentados na Tabela 3.4 a seguir.

Tabela 2.4: Efeito da recirculação na inativação de esporos de *B. stearothermophilis*

Tempo (min)	Volume Total (mL)	Número de Passagens	UFC / mL	NRD
0,00	0	0,0	2,96E+05	0,00
5,10	1377	3,7	8,10E+05	-0,44
8,90	2403	6,4	7,70E+05	-0,42
10,03	2708	7,2	1,98E+05	0,17
15,00	4050	10,8	1,25E+05	0,37
20,03	5408	14,4	1,06E+05	0,45
22,75	6143	16,4	6,30E+04	0,67

Os resultados demonstram que mesmo após 10 minutos de recirculação, não ocorreu praticamente nenhuma redução nas contagens observadas. Após quase 23 minutos de processo foi observada uma redução de apenas 0,67 ciclo logaritmico nas mesmas.

Visando verificar o efeito de múltiplas passagens na resistência térmica dos esporos de *Bacillus stearothermophilus*, foi determinado o valor de D a 110°C do microrganismo na amostra após o processo. O valor encontrado foi de 29,1 min e o valor de R<sup>2</sup> de 0,9955. Este valor está muito próximo do encontrado para o microrganismo antes de submetê-lo ao processo de homogeneização a ultra alta pressão, 30,3±0,6 min, demonstrando que a resistência térmica do microrganismo não foi afetada de maneira significativa mesmo após 16 passagens pela válvula de homogeneização.

### 3.3.6 *Clostridium sporogenes* (PA 3679)

No dois ensaios realizados a 300 MPa foram verificadas reduções de 0,07 e 0,17 ciclos logarítmicos nas contagens de *Clostridium sporogenes* e no ensaio em que foi aplicando um choque térmico de 8 min a 100°C para ativação dos esporos a mesma foi de 0,20.

Os valores de NRD observados são extremamente pequenos e concluiu-se que, assim como ocorreu para o *Bacillus stearothermophilus*, o processo de homogeneização a ultra alta pressão não foi capaz de causar reduções significativas na população de esporos presentes na pressão estudada. Determinou-se ainda o valor de D deste microrganismo a 110°C antes e após o processo, com o intuito de verificar se o mesmo é capaz de alterar a resistência térmica do esporo. Os resultados obtidos foram 12,62 min antes do processo e 11,17 min após. Os valores bastante próximos demonstraram que a resistência térmica do microrganismo não foi alterada de maneira pronunciada.

### 3.4 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que ao contrário do que ocorre com a aplicação de alta pressão hidrostática na faixa de 400 MPa (MOERMAN, 2001), o processo de homogeneização a ultra alta pressão não causou qualquer redução nas contagens de esporos de *Bacillus stearothermophilus* na faixa de pressão avaliada (100 a 300 MPa), tão pouco alterações na resistência térmica dos mesmos. Desta forma, não se justifica o emprego de um método combinado, aplicando-se um tratamento térmico após o processo de homogeneização a ultra alta pressão para a inativação de esporos de *Bacillus stearothermophilus*. Também não foram observadas reduções nas contagens de *Clostridium sporogenes* após submeter a amostra a processos a 300 MPa.

### 3.5 Referências Bibliográficas

CAMARGO, L.M.Q. **Uso de um sistema indicador biológico na avaliação do valor de esterilização aplicado a purê de cenoura processado em retorta rotativa**. Tese de Mestrado. – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.

CAMPOS, F.P. **Estudo do Processamento de Suco de Laranja através da Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In: **IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

FEEHERRY, F. E.; MUNSEY, D.; ROWLEY, D. B. Thermal Inactivation and Injury of *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 365-370, 1987.

FERNANDEZ, P. S.; OCIO, M. J.; MARTINEZ, A. Relation between thermal resistance and DPA content in variants of the same strains of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**. v. 19, n. 2, p. 118-120, 1994.

FURUKAWA, S.; NAKAHARA, A.; HAYAKAWA, I. Effect of reciprocal pressurization on germination and killing of bacterial spores. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 35, n. 6, p. 529-532, 2000.

FURUKAWA, S.; HAYAKAWA, I. Effect of Temperature on the Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 Spores by Low Hydrostatic Pressure Treatment. **Biocontrol Science**. v. 6, n. 1, p. 33-36, 2001.

FURUKAWA, S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 5, p. 836-841, 2003.

GAO, Y. L.; JIANG, H. H. Optimization of process conditions to inactivate *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and mild heat using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, n. 1, p. 43-48, 2005.

GRISCHY, R. O.; SPECK, R. V.; ADAMS, D. M. New Media for Enumeration and Detection of *Clostridium sporogenes* (PA3679) Spores. **Journal of Food Science**. v. 48, n. 5, p. 1466-1469, 1983.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

HEIJI, W. B. C.; SCHEPDAEL, L. J. M. M.; MOEZELAAR, R.; HOOGLAND, H.; MATSER, A. M.; BERG, W. High-Pressure Sterilization: Maximizing the Benefits of Adiabatic Heating. **Food Technology**. v. 57, n. 3, p. 37-41, 2003.

HOOVER, D. G. Pressure effects on Biological Systems. **Food technology**. v. 47, n. 6, p. 150-154, 1993.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ed. Zaragoza, 1994. 804p.

KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** v.12, n. 5, p.435-446, 2002.

LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D. H. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 4158-4161, 2002.

LÓPEZ-PEDEMONTE, T. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n. 10, p. 3075-3081, 2003.

MARGOSCH, D.; EHRMANN, M. A.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and other Endospores in Mashed Carrots. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 11, p. 2530-2537, 2004.

MOERMAN, F.; MERTENS, B.; DEMEY, L.; HUYGHEBAERT, A. Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. **Meat Science**. v. 59, n. 2, p. 115-125, 2001.

MOERMAN, F. High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. **Meat Science**. v. 69, n. 2, p. 225-232, 2005.

OPTSAL, I. V.; BAGAMBOULA, C. F.; VANMUYSEN, S. C. M.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, n. 2, p. 227-234, 2004.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. High-Pressure. **Journal of Food Protection**. v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

PFLUG, I. J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**. Seventh Edition, Minneapolis, 1990.

PINHO, C. R. G. **Modelamento matemático do processo de esterilização de alimentos condutivos em embalagem de vidro**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

REDDY, N. R.; SOLOMON, H. M.; TETZLOFF, R. C.; RHODEHAMEL, E. J. Inactivation of *Clostridium botulinum* Type A Spores by High-Pressure Processing at Elevated Temperatures. **Journal of Food Protection**. v. 66, n.8, p. 1402-1407, 2003.

RITZ, M.; FREULET, M.; ORANGE, N.; FEDERIGHI, M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55, n.1/3, p. 115-119, 2000.

RODRIGUEZ, A. C.; LARKIN, J. W.; DUNN, J.; PATAZCA, E.; REDDY, N. R.; ALVAREZ-MEDINA, M.; TETZLOFF, R.; FLEISCHMAN, G. J. Model of Inactivation of Bacterial Spores by Moist Heat and High Pressure. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 367-373, 2004.

WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, n. 3, p. 333-341, 2001.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

#### **4 Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Atividade Enzimática de Fosfatase Alcalina e Lactoperoxidase em Leite Cru Desnatado**

##### **Resumo**

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma técnica alternativa para processamento de alimentos que vai ao encontro da crescente demanda dos consumidores por produtos cujas características aproximem-se das dos produtos *in natura*. As enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase são enzimas endógenas do leite sendo utilizadas como integradores tempo-temperatura que permitem o monitoramento do processo térmico aplicado (pasteurização: 72 °C por 15 segundos). Após a pasteurização, a fosfatase alcalina deve estar inativada e a lactoperoxidase permanecer ativa. Caso contrário, o leite estará sub ou super processado. Neste trabalho, estudou-se a inativação das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase em leite cru desnatado pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão. As pressões variaram de 100 a 300 MPa. O comportamento das duas enzimas foi aproximadamente o mesmo até 250 MPa, sendo que apenas alterações inferiores a 30% nos valores de suas atividades foram observadas. Entretanto, processos a pressões superiores a 270 MPa foram capazes de inativar totalmente a fosfatase alcalina, enquanto que a atividade da lactoperoxidase sofreu uma redução de apenas 28,48% nos processos a 300 MPa. A inativação total da lactoperoxidase requer níveis de pressão muito superiores ao utilizado neste estudo.

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite cru desnatado, fosfatase alcalina, lactoperoxidase.

## **Ultra High Pressure Homogenization Effect on Alkaline Phosphatase and Lactoperoxidase Activity in Raw Skim Milk**

### **Abstract**

Ultra high pressure homogenization is an alternative food processing technique. As product heating is minimum, its characteristics are closer to not processed food. Alkaline phosphatase and lactoperoxidase are indigenous enzymes from milk. They are used as indicators for correct milk pasteurization (72°C for 15 seconds). Alkaline phosphatase must be inactivated after milk submission to pasteurization process and lactoperoxidase must be active after it. Otherwise milk will be under or over processed. At this work inactivation of alkaline phosphatase and lactoperoxidase in raw skim milk by ultra high pressure homogenization (UHPH) was studied. Pressures varied from 100 to 300 MPa. The behavior of alkaline phosphatase and lactoperoxidase was almost the same till 250 MPa. Only alterations smaller than 30% in their enzymatic activity were verified from 100 to 250 MPa. However, processes at 270 MPa were able to totally inactivate alkaline phosphatase and 300 MPa caused only a reduction of 28.48% on lactoperoxidase activity. Total lactoperoxidase inactivation would require pressure levels much higher than those used in this study.

Key-words: Ultra high pressure homogenization, raw skim milk, alkaline phosphatase, lactoperoxidase

## 4.1 Introdução

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é utilizado na indústria farmacêutica, cosmética, química e de alimentos no preparo ou estabilização de emulsões e suspensões ou para criar alterações físicas. Para aplicações que exigem um alto grau de dispersão, pressões superiores a 200 MPa estão sendo investigadas. O desenvolvimento de aplicações do processo de homogeneização a alta pressão permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na medida em que causa inativação microbiana (DIELS et al, 2004).

A utilização deste método não térmico de preservação vai ao encontro da crescente demanda dos consumidores por produtos processados com características as mais próximas possíveis dos produtos *in natura*.

No caso do leite, produto extremamente susceptível a deterioração microbiológica em função das características intrínsecas (pH, atividade de água e composição), o processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma alternativa ao processo de pasteurização térmica, na medida em que promove a redução da carga microbiana sem expor o produto a temperaturas elevadas por tempos excessivamente longos (PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI, 2004; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005a; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005b; HAYES; FOX; KELLY, 2005).

As enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase presentes no leite cru são de importância tecnológica na indústria de laticínios (ERTUGAY; YUKSEL; SENGUL, 2003), sendo consideradas integradores tempo-temperatura adequados para o monitoramento do processo térmico aplicado (CLAEYS; LOEY; HENDRICKX, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade enzimática de fosfatase alcalina e lactoperoxidase em leite cru desnatado.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Amostra

Na realização dos ensaios foi utilizado leite cru desnatado ( $0,48 \pm 0,04$  % de gordura) doado pela empresa Malibu situada em Itatiba-SP.

### 4.2.2 Equipamento

O equipamento utilizado foi um homogeneizador contínuo de ultra alta pressão (nG7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra). O mesmo opera com pressões entre 0 e 300 MPa e tem uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Após a passagem pelos pistões, o fluido pressurizado passa por uma válvula de retenção que realiza o desvio do fluido conforme o fluxo de pressurização necessário. O fluido é conduzido para uma válvula de homogeneização, na qual ocorre a expansão adiabática do mesmo, que retorna à pressão ambiente. Imediatamente após esta válvula, o fluido passa por um trocador de calor, com circulação externa de água a temperatura ambiente, de forma que, no final do trocador, atinja uma temperatura próxima à temperatura ambiente.

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar água e produto. O processo era iniciado utilizando-se água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, a válvula de alimentação foi aberta iniciando-se a alimentação do produto. A estabilização de pressão foi realizada fazendo-se circular água no interior do equipamento para que não houvesse desperdício de amostra. Após 90

segundos da abertura da alimentação de produto foi realizada a coleta da amostra tratada. Esta coleta foi realizada no interior de uma câmara de fluxo laminar de modo a garantir que a mesma fosse realizada de maneira asséptica.

O tempo de residência do fluido no interior do equipamento é de cerca de 40 segundos, incluindo o trocador de calor. Padronizou-se a retirada das amostras somente após 90 segundos para garantir que não houvesse nenhum efeito de diluição da amostra devido ao fato da estabilização do equipamento ter sido realizada com água.

O equipamento apresenta três termopares para controle de temperatura, posicionados nos seguintes pontos:

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

A função dos termopares era monitorar o produto sendo tratado e certificar-se que a temperatura não influenciou na inativação enzimática verificada.

Após a coleta das amostras, o equipamento foi despressurizado e iniciou-se a limpeza da seguinte maneira: inicialmente fez-se circular água destilada por cerca de 20 minutos, a seguir utilizou-se soda 2,5% também por 20 minutos, após foi feito enxágüe com água. Após remoção da soda (monitorada pela utilização de papel indicador), o equipamento foi preenchido e permaneceu com etanol 70% até a realização do próximo experimento.

#### **4.2.3 Inativação Enzimática por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

O leite cru foi mantido sob refrigeração até a realização dos experimentos. Foram realizados ensaios a 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4 Determinação da Atividade da Enzima Fosfatase Alcalina

A determinação quantitativa da atividade da enzima fosfatase alcalina foi realizada conforme descrito por (RICHARDSON, 1985). O teste é baseado no fato de que a fosfatase alcalina presente no leite cru libera fenol a partir do fenil fosfato disódio quando os testes são conduzidos em valores de temperatura e pH adequados. A quantidade de fenol liberada a partir do substrato é proporcional à atividade da enzima. O fenol é medido colorimetricamente após a reação com o CQC (2,6 – dicloroquinonechloroimide) para formar o indo-fenol azul.

Resumidamente, o método consistiu em pipetar 2 mL da amostra, adicionar 20 mL de substrato tamponado e incubar a mistura por 15 minutos a 40°C. A seguir adicionou-se 0,4 mL de CQC (2,6 – dicloroquinonechloroimide) e 8 gotas de catalisador (sulfato de cobre). Após homogeneização por inversão, as amostras foram incubadas novamente a 40°C por 5 minutos, resfriadas em banho de gelo e adicionou-se 12 mL de álcool n-butyl neutralizado. As amostras foram deixadas em banho de gelo por cerca de 10 minutos para que a camada de álcool fosse separada. As amostras foram então centrifugadas, a camada alcoólica foi pipetada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 650 nm.

Em todos os ensaios realizados havia uma amostra de leite cru desnatado sem processar e uma amostra de leite super-pasteurizado (90°C por 1 minuto) denominada de controle negativo, que tinha o objetivo de assegurar a inexistência de interferentes nos reagentes, como por exemplo um reagente contaminado com fenol, que poderia gerar um resultado falso positivo.

A curva padrão foi construída preparando-se soluções de fenol 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL. A seguir, foi realizado o mesmo procedimento já descrito para as amostras.

A quantidade de fase alcoólica obtida era suficiente para que a leitura da absorbância de cada amostra fosse realizada em duplicata. A partir da média das leituras de cada amostra, o valor de absorbância foi substituído na equação da

curva padrão, sendo então calculada a concentração de fenol. A atividade enzimática (AE) foi calculada dividindo-se a concentração de fenol da amostra processada pela concentração de fenol da amostra sem processar. O valor foi multiplicado por 100 para leitura em porcentagem.

Em função dos resultados obtidos nos ensaios mencionados no item 4.2.3, foram também realizados processos a 270 e 290 MPa com o intuito de determinar a faixa de pressão em que ocorre inativação total da enzima.

#### **4.2.5 Determinação da Atividade da Enzima Lactoperoxidase**

A determinação quantitativa da atividade da enzima lactoperoxidase foi realizada como descrito por (HOLSCHUH, 2000) com modificações. A principal modificação realizada na metodologia foi a substituição do tampão fosfato por uma solução 10% de etanol em água conforme sugerido por Gasparino Filho (2001) e também a alteração da concentração de peróxido de hidrogênio para 50% de modo que a absorbância obtida ficasse entre 0,1 e 0,7.

O método consistiu em pipetar 5 mL da amostra, adicionar 10 mL da solução de etanol 10%, homogeneizar e filtrar para a obtenção do extrato enzimático. Na cubeta foram adicionados 1,5 mL de uma solução 1% de guaiacol em etanol 10% e 1,2 mL de etanol 10%, esperou-se 10 minutos para que se equilibrasse a mistura à temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 50% em água e 0,1 mL de extrato enzimático, sendo que 15 segundos após a adição do extrato enzimático foi iniciada a leitura em espectrofotômetro a 470 nm. Inicialmente o equipamento foi calibrado com um branco preparado com 1,5 mL de uma solução 1% de guaiacol em etanol 10%, 1,6 mL de etanol 10% e 0,1 mL de extrato enzimático. Após a calibração do mesmo, procedeu-se a leitura das amostras durante 5 minutos sendo que os valores de absorbância eram medidos uma vez a cada minuto.

O princípio do teste de determinação quantitativa de peroxidase é o fato de que a peroxidase hidrolisa o peróxido de hidrogênio e o oxigênio liberado reage

com o guaiacol que passa da sua coloração leuco para rosada. Esta alteração de cor é medida pelo espectrofotômetro.

Assim como na determinação quantitativa da fosfatase alcalina, nos ensaios de lactoperoxidase sempre eram analisadas uma amostra de leite cru desnatado sem processar e uma amostra de leite super pasteurizado (90 °C por 1 min), que atuava como controle negativo. A não alteração nos valores de absorvância durante o tempo de corrida demonstrou a inexistência de atividade enzimática bem como de interferência da alta concentração de peróxido de hidrogênio utilizada na reação.

As análises foram realizadas em duplicata. A atividade enzimática foi calculada da seguinte forma: inicialmente foram calculadas as variações na absorvância a cada minuto. Foi então calculada a média destas variações de absorvância para cada amostra (MA). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como o aumento de 0,001 de absorvância por min por mL de amostra, conforme apresentado por Holschuh (2000). Dividindo-se MA por 0,001, obteve-se o número de UA/min correspondente. Em 0,1 mL do extrato enzimático tinha-se 0,033 mL de amostra, logo  $(UA / 0,033) * 100$  forneceu UA/100 mL min.

A atividade enzimática (AE) foi calculada dividindo-se UA/100 mL min da amostra processada pela UA/100 mL min da amostra sem processar. O valor foi multiplicado por 100 para leitura em porcentagem.

#### **4.2.6 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA 5.0 através de ANOVA e teste de média (Tukey).

### **4.3 Resultados e Discussões**

#### **4.3.1 Temperaturas de Processo**

A Tabela 4.1 mostra as temperaturas registradas em um dos ensaios realizados em cada uma das pressões.

Tabela 4.1: Temperaturas verificadas em cada umas das pressões nos ensaios de HUAP

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>3</sub> (°C)</b>
<b>100</b>	24,0	45,5	28,1
<b>150</b>	24,8	56,3	29,0
<b>200</b>	24,9	64,3	29,9
<b>250</b>	24,0	69,9	28,9
<b>300</b>	22,8	80,2	29,0

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização / entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

Os dados apresentados na Tabela 4.1 demonstram que a temperatura na saída da válvula foi tanto maior quanto maior foi a pressão aplicada. As temperaturas apontadas pelo termopar 3 demonstram que o trocador de calor instalado é capaz de reduzir de maneira eficiente a temperatura da amostra, minimizando assim o efeito da elevação de temperatura em função da expansão adiabática que ocorre na saída da válvula de homogeneização.

Após sair da válvula de homogeneização, o fluido entra imediatamente no trocador de calor. Os cálculos realizados demonstraram que o tempo necessário para que a temperatura da amostra seja inferior a 40 °C no interior do trocador de calor é de 5 segundos nos processos a 300 MPa, quando a mostra sai da válvula de homogeneização a cerca de 80 °C, sendo inferior nos processos realizados nas demais pressões.

### **4.3.2 Inativação Enzimática por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

#### **4.3.2.1 Fosfatase Alcalina**

Os resultados obtidos nos ensaios de inativação de fosfatase alcalina por HUAP realizados são apresentados na Tabela 4.2. A Atividade Enzimática (A.E.) foi calculada conforme descrito em 4.2.4.

Tabela 4.2: Atividade Enzimática (A. E.) observada nos ensaios de inativação de fosfatase alcalina por HUAP

<b>Pressão (M Pa)</b>	<b>A.E. (%) *</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
0	100,00 <sup>a</sup>	3,06	3,06
100	85,08 <sup>b,c</sup>	5,89	6,92
150	99,57 <sup>a,b</sup>	12,28	12,33
200	81,86 <sup>c</sup>	8,11	9,91
250	88,08 <sup>b,c</sup>	7,61	8,64
300	0 <sup>d</sup>	**	**

\* valor médio da % de Atividade Enzimática obtida em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

\*\* não aplicável – Inativação Total da Enzima

Conforme pode ser observado na Tabela 4.2, pressões da ordem de 100 MPa foram capazes de causar apenas reduções de 14,9% na atividade da enzima fosfatase alcalina em leite. Pressões até 250 MPa causaram pouca inativação da enzima (11,9%), nos ensaios realizados a 300 MPa a enzima foi totalmente inativada. Observa-se que não existem diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre as atividades enzimáticas apresentadas pela amostras não processadas e pelas amostras submetidas a 150 MPa, assim como entre as amostras processadas a 100, 150 e 250 MPa, e também dentre aquelas submetidas a 100, 200 e 250 MPa.

Em função dos resultados apresentados na Tabela 4.2, foram realizados também processos a 270 e 290 MPa, em ambos, assim como nos processos a 300 MPa, foi observada inativação total da enzima.

Estes resultados demonstraram que a atividade da fosfatase alcalina quando submetida ao processo de homogeneização a ultra alta pressão sofreu reduções inferiores a 20% entre 100 e 250 MPa. Isto é semelhante ao relatado por Hayes e Kelly (2003). Os autores avaliaram o efeito da homogeneização a alta pressão na enzima fosfatase qualitativamente entre 50 e 200 MPa e não observaram inativação da mesma na faixa de pressão estudada.

Sabe-se que após 15 segundos a 72°C a fosfatase alcalina é totalmente inativada. O valor de  $z$  da enzima é de 4,8°C (TOMASULA; KONSTANCE, 2004). Desta forma, considerando-se as temperaturas de saída nos processos realizados a 270, 290 e 300 MPa, de 74, 78 e 80°C aproximadamente, os tempos calculados para inativação total da enzima são 5,7, 0,84 e 0,32 segundos. Isto é, o pequeno tempo de residência no trocador de calor já é suficiente para inativar parcialmente a enzima, não sendo possível separar o efeito térmico do efeito da homogeneização a ultra alta pressão na inativação da mesma.

Hayes, Fox e Kelly (2005) submeteram leite cru a processos de homogeneização a ultra alta pressão em um homogeneizador de duplo estágio, utilizando temperatura de entrada de 45°C em processos a 150, 200 e 250 MPa. As temperaturas de saída foram 67,0, 76,8 e 83,6°C, respectivamente. A amostra permaneceu nestas temperaturas por aproximadamente 20 segundos em um tubo de retenção. Os autores verificaram redução de 71, 98 e 100% nos valores de atividade da enzima nas pressões citadas. Estes resultados diferem dos encontrados neste estudo. Esta diferença pode ser atribuída à temperatura de entrada utilizada (5°C) e também ao menor tempo de permanência da amostra na temperatura de saída da válvula.

Datta et al (2005) processaram amostras de leite cru a 200 MPa utilizando um homogeneizador de duplo estágio. As temperaturas de entrada variaram de 10 a 50°C e a amostra permaneceu por 20 segundos à temperatura de saída da válvula de homogeneização. Com o intuito de isolar o efeito térmico do efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na inativação da fosfatase alcalina, os autores submeteram as amostras a um tratamento térmico pelo mesmo período de tempo (20 segundos) às diferentes temperaturas de saída. Os resultados demonstram que os perfis de inativação da enzima obtidos foram idênticos e os autores concluíram que a inativação verificada é inteiramente devida ao efeito da temperatura.

Ludikhuyze, Claeys e Hendrickx (2000), realizaram um estudo detalhado da inativação da fosfatase alcalina por alta pressão hidrostática e temperatura, as

quais variaram de 0,1 a 725 MPa e 25 a 63°C respectivamente. A inativação pode ser descrita por um modelo de primeira ordem, permitindo o cálculo de valores de D e z. Os autores concluíram que de modo geral a fosfatase alcalina é mais resistente à alta pressão que a maioria dos microrganismos patogênicos não esporulados presentes no leite e, sendo assim, pode ser utilizada como um indicador da ausência destes no leite processado a alta pressão hidrostática.

Isto é semelhante ao verificado no presente estudo, já que segundo alguns trabalhos (PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI, 2004; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005a; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005b), a faixa de inativação total da carga de microrganismos inoculada em leite ( $10^6$ - $10^7$  UFC/mL) é de 260 MPa para o *Lactobacillus helveticus*, microrganismo mais resistente à homogeneização a ultra alta pressão dentre os testados.

Desta forma, a enzima fosfatase alcalina pode ser utilizada como indicador da adequação do processo de homogeneização a ultra alta pressão caso o objetivo do processo seja semelhante ao da pasteurização térmica de leite, já que apenas o efeito térmico seria suficiente para atingir a inativação de microrganismos desejada. Entretanto, caso o objetivo seja um processo mais severo, como por exemplo a inativação de 7 ciclos de *Listeria innocua*, deve-se avaliar cada caso, já que aqui a contribuição do processo de homogeneização é significativa na destruição dos microrganismos, sendo a mesma variável em função do tipo de válvula utilizado e não apenas da pressão de trabalho e do conseqüente aumento de temperatura na saída da válvula (PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI, 2004; WUYTACK; DIELS, MICHIELS, 2002).

#### **4.3.2.2 Lactoperoxidase**

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de inativação de lactoperoxidase por HUAP realizados.

Tabela 4.3: Atividade Enzimática (A. E.) observada nos ensaios de inativação de lactoperoxidase por HUAP

<b>Pressão (M Pa)</b>	<b>A.E. (%)</b>	<b>DP</b>	<b>CV (%)</b>
0	100,00 <sup>b</sup>	2,91	2,91
100	131,32 <sup>a</sup>	14,70	11,20
150	99,09 <sup>b</sup>	9,29	9,37
200	102,22 <sup>b</sup>	4,88	4,77
250	126,07 <sup>a</sup>	8,48	6,73
300	71,52 <sup>c</sup>	8,46	11,83

\* valor médio da % de Atividade Enzimática obtida em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

Pressões de 150 e 200 MPa mantiveram a atividade da lactoperoxidase praticamente inalterada, processos a 100 e 250 MPa causaram aumento na atividade da mesma e somente nos ensaios realizados a 300 MPa observamos redução na atividade enzimática (cerca de 28,48%). Observa-se que não existem diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre as atividades enzimáticas apresentadas pela amostra não processada e pelas amostras submetidas a 150 e 200 MPa, assim como entre as amostras processadas a 100 e 250 MPa.

Estes resultados demonstram que assim como ocorreu para a fosfatase alcalina entre 100 e 250 MPa, a atividade da lactoperoxidase quando submetida ao processo de homogeneização a ultra alta pressão variou de maneira não linear, não sendo possível estabelecer tendências na faixa de pressões estudada. Além disso, em nenhuma das pressões avaliadas verificou-se inativação total da enzima, sendo que a máxima redução de atividade foi observada nos processos a 300 MPa.

Hayes, Fox e Kelly (2005) verificaram 9, 66 e 100% de inativação de lactoperoxidase em processos de homogeneização a 150, 200 e 250 MPa nas condições já mencionadas. Assim como ocorreu com a fosfatase alcalina, os resultados diferem dos encontrados neste estudo. Esta diferença nas porcentagens de inativação pode também ser atribuída à temperatura de entrada

utilizada (5°C) e ao menor tempo de permanência da amostra na temperatura de saída da válvula.

A lactoperoxidase é muito sensível termicamente na faixa de 80°C, sendo que a inativação completa ocorre após 1 segundo nesta temperatura ou 1,5 min a 72°C (HAYES; FOX; KELLY, 2005).

Segundo Datta et al (2005) existe uma contribuição do efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão para a inativação parcial da lactoperoxidase verificada. Os autores processaram amostras de leite cru a 200 MPa utilizando um homogeneizador de duplo estágio. As temperaturas de entrada variaram de 10 a 50°C e a amostra permaneceu por 20 segundos à temperatura de saída da válvula de homogeneização. Com o intuito de isolar o efeito térmico do efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na inativação da lactoperoxidase, os autores submeteram as amostras a um tratamento térmico pelo mesmo período de tempo (20 segundos) às diferentes temperaturas de saída. Os resultados demonstram que os perfis de inativação da enzima obtidos foram bastante diferentes e os autores concluíram que a inativação parcial verificada é devida a uma somatória de efeitos.

Desta forma, é possível que a inativação parcial verificada no presente trabalho a 300 MPa seja devida à somatória do efeito térmico do pequeno tempo de residência da amostra na temperatura de saída da válvula de homogeneização e do efeito do processo de homogeneização.

Dosualdo (2003) avaliou o efeito da homogeneização a ultra alta pressão nas atividades enzimáticas de peroxidase e polifenoloxidase em água de coco na faixa de 50 a 300 MPa. Os resultados demonstraram que mesmo a 300 MPa, a redução nos valores das atividades enzimáticas foi bastante pequena, 9,3% para a polifenoloxidase e 4,0% para a peroxidase.

Na Figura 4.1 são apresentadas as variações nas atividades enzimáticas das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase observadas nos ensaios realizados a diferentes pressões.

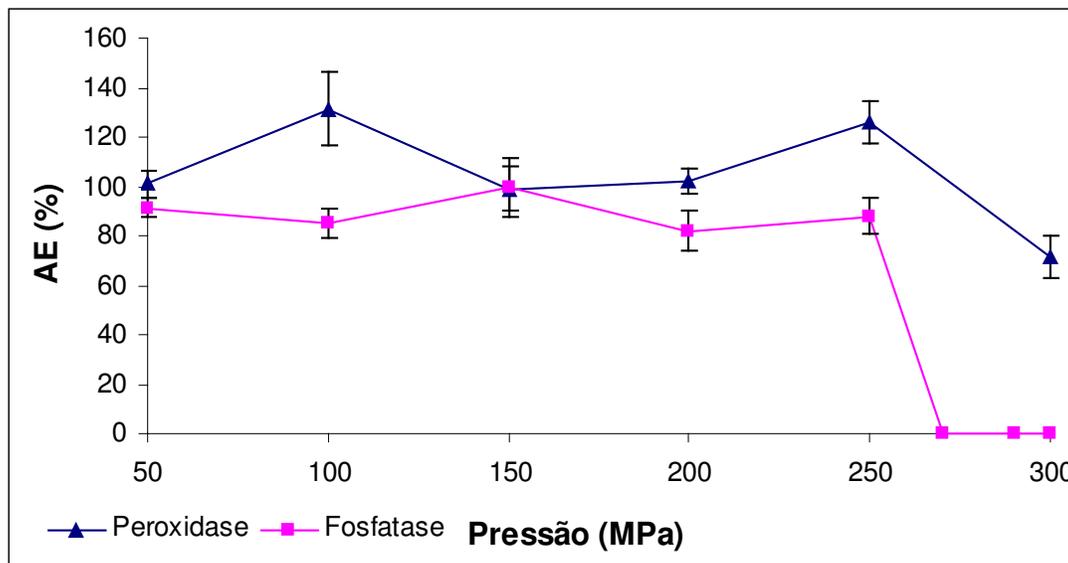


Figura 4.1: Atividade Enzimática Percentual de Fosfatase Alcalina e Lactoperoxidase em função da Pressão

Ertugay, Yuksel e Sengul (2003) avaliaram o efeito do ultra-som na atividade da fosfatase alcalina e lactoperoxidase. Os testes utilizaram diferentes níveis de amplitude (0 a 80%), tempos de exposição (30 a 120 s) e temperaturas (20 a 40°C). A maior inativação enzimática ocorreu a 80% de amplitude. Os autores atribuíram esta inativação ao fenômeno de cavitação, onde ocorre a formação de bolhas ou cavidades no líquido. A explosão da bolha que ocorre durante o tratamento com ultra-som produz um ponto quente local que pode causar desnaturação enzimática. O colapso das bolhas leva a micro choques mecânicos resultando na inativação. Além disso, a temperatura exerce um efeito sinérgico, já que mais bolhas são produzidas mais rapidamente a temperaturas maiores. Finalmente, existe o efeito da corrente de líquido produzida na vizinhança das bolhas, seja por oscilação das bolhas ou por implosão, freqüentemente resulta em tensão de cisalhamento severa que pode promover desnaturação protéica e enzimática. De fato, a tensão de cisalhamento produzida pelas ondas de ultra-som

pode degradar polímeros com alto peso molecular. Estes fenômenos também ocorrem no processo de homogeneização a ultra alta pressão, podendo a inativação enzimática verificada ser atribuída aos mesmos (ENGLER; ROBINSON, 1981; MOORE; HOARE; DUNNILL, 1990).

A ativação verificada a pressões inferiores pode ser atribuída a alterações conformacionais e conseqüente aumento na exposição dos sítios enzimáticos (HENDRICKX et al, 1998).

#### 4.4 Conclusão

O processo de homogeneização a ultra alta pressão foi capaz de causar inativação total da enzima fosfatase alcalina presente no leite cru a partir de 270 MPa. Já com relação a lactoperoxidase, mesmo pressões da ordem de 300 MPa causaram apenas inativação parcial (redução de cerca de 28,48% na atividade).

#### 4.5 Referências Bibliográficas

CLAEYS, W. L.; LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation, and of  $\beta$ -lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 541-553, 2002.

DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenization on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 393-399, 2005.

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In: **IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

ENGLER, C. R.; ROBINSON, C. W. Disruption of *Candida utilis* Cells in High Pressure Flow Devices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 4, p. 765-780, 1981.

ERTUGAY, M. F.; YUKSEL, Y.; SENGUL, M. The effect of ultrasound on lactoperoxidase and alkaline phosphatase enzymes from milk. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 11/12, p. 593-595, 2003.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIERES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 1, n. 2, 127-134, 2000.

GASPARINO FILHO, J; AGUIRRE, J. M. **Desidratação de frutas e hortaliças**. Manual técnico, ITAL, Campinas, 2001.

HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. **Journal of Dairy Research**. v. 70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potencial applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

HOLSCHUH, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L)**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

LUDIKHUYZE, L.; CLAEYS, W.; HENDRICKX, M. Combined Pressure-temperature Inactivation of Alkaline Phosphatase in Bovine Milk: A Kinetic Study. **Journal of Food Science**. v. 65, n. 1, p. 155-160, 2000.

MOORE, E. K.; HOARE, M.; DUNNILL, P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, n. 10, p. 764-770, 1990.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk. In: **3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**, 2004, Rio de Janeiro. . Book of Abstracts of the 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2004.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Lactobacillus helveticus* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 15th Ed., 1985. 412p.

TOMASULA, P. M.; KONSTANCE, R. P. The Survival of Foot-and-Mouth Disease Virus and Pasteurized Milk and Milk Products. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n. 4, p. 1115-1121, 2004.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

## 5 Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Atividade de Protease Produzida por *Pseudomonas fluorescens* em Leite Desnatado

### Resumo

A presença de proteases extremamente termorresistentes produzidas por microrganismos psicrotróficos tem sido apontada como fator limitante para o armazenamento de leite UHT. Sabe-se que essa enzima, juntamente com a plasmina presente no leite, assume um papel importante frente às alterações proteolíticas que podem reduzir a vida de prateleira do produto. Além disso, métodos convencionais de tratamento térmico não são capazes de inativá-la totalmente. O processo de homogeneização a ultra alta pressão (HUAP) é um método não térmico de preservação de alimentos que permite a obtenção de um produto cujas características estão bem próximas às do produto não processado, garantindo qualidade e ao mesmo tempo segurança microbiológica e inativação de algumas enzimas. Neste trabalho foi avaliado o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade da protease produzida pelo microrganismo *Pseudomonas fluorescens* em leite desnatado. Para isso, amostras de leite desnatado foram adicionadas desta protease e submetidas a processos onde as pressões variaram de 100 a 300 MPa. Os ensaios demonstraram que pressões da ordem de 300 MPa causaram uma redução de 72,5% na atividade proteolítica da enzima.

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite desnatado, protease, *Pseudomonas fluorescens*.

## **Ultra High Pressure Homogenization Effect on Protease Produced by *Pseudomonas fluorescens* in Skim Milk**

### **Abstract**

The presence of the protease produced by *Pseudomonas fluorescens* is pointed out as a limiting factor for UHT milk storage. It is well known that this enzyme and plasmin, a native milk protease, play an important role at proteolytic alterations that can reduce product stability and, consequently, its shelf life. Ultra high pressure homogenization (UHPH) processing is a non thermal food preservation technique that produces food with characteristics closer to food not processed. This work aimed to evaluate the effect of ultra high pressure homogenization on the proteolytic activity of the protease produced by *Pseudomonas fluorescens*. Skim milk samples added of the protease and submitted to pressures varying from 100 to 300 MPa were evaluated. Tests revealed that 300 MPa were able to reduce proteolysis in 72.5%, showing that the technique was effective in reducing this enzyme proteolytic activity.

Key-words: Ultra high pressure homogenization, skim milk, protease, *Pseudomonas fluorescens*.

## 5.1 Introdução

A tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão é um método alternativo de processamento de alimentos que vai ao encontro da crescente demanda dos consumidores por produtos processados com características as mais próximas possíveis dos produtos não processados, já que o mesmo não é submetido a altas temperaturas durante o processamento, garantindo qualidade e ao mesmo tempo segurança microbiológica e inativação total ou parcial de algumas enzimas.

No caso do leite, produto extremamente susceptível à deterioração microbiológica em função das suas características intrínsecas (pH, atividade de água e composição), o processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma alternativa ao processo de pasteurização térmica, na medida em que promove a redução da carga microbiana sem expor o produto a temperaturas elevadas por tempos excessivamente longos (PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI, 2005a; HAYES, FOX; KELLY, 2005).

A proteólise em leite pode ser causada por proteases nativas do mesmo e também por enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos psicotróficos, particularmente *Pseudomonas* spp, durante a estocagem refrigerada antes do processamento. Estas proteases diferem na especificidade em relação às proteínas do leite.

A plasmina, principal protease nativa do leite secretada durante sua síntese, faz parte de um sistema complexo descrito detalhadamente por Nielsen (2002). Esta enzima é classificada como uma serina protease. Já a *Pseudomonas* spp. produz uma metaloprotease extracelular que desestabiliza a micela de caseína por hidrólise, resultando na redução da qualidade do queijo, gelificação do leite UHT e formação de filme em trocadores de calor (NIELSEN, 2002).

Vários estudos da relação entre a plasmina nativa do leite e as proteases produzidas por microrganismos psicotróficos tem sido realizados (FAJARDO-

LIRA; HAYES; NIELSEN, 2000; FAJARDO-LIRA; NILSEN, 1998; HAYES; WERE; NIELSEN, 2001). A plasmina nativa está inicialmente associada à fração de caseína do leite e às membranas dos glóbulos de gordura, mas pode ser deslocada para a fração soro devido ao crescimento microbiano. Este deslocamento é atribuído à hidrólise das micelas de caseína pelas proteases de origem microbiana e pode afetar a estabilidade do leite UHT ou processos como a maturação do queijo (NIELSEN, 2002).

Várias espécies de *Pseudomonas* quando presentes em número superior a  $10^6$  UFC/mL produzem proteases extremamente termorresistentes que podem degradar vários componentes do leite que irão causar deterioração durante a estocagem (FAIRBAIRN; LAW, 1986). A partir de  $10^7$  UFC/mL esta produção já é suficiente para degradar níveis detectáveis de caseína (SHAH, 1994). A protease produzida por *Pseudomonas sp.* não é totalmente inativada pelo processo UHT tradicional, apresentando um valor D a  $140^\circ\text{C}$  de 1 minuto (CROMIE, 1992).

Assim como o tratamento térmico, Pinho, Franchi e Cristianini (2005a) verificaram que o processo de homogeneização a ultra alta pressão pode inativar facilmente *Pseudomonas fluorescens*. Pressões da ordem de 200 MPa foram capazes de inativar 6 ciclos logarítmicos do microrganismo. A temperatura de entrada da amostra foi  $5^\circ\text{C}$ , a temperatura de saída (a 200 MPa) foi  $64^\circ\text{C}$ , sendo que 3,5 segundos após sair da válvula, o trocador de calor instalado na saída da mesma, reduziu a temperatura da amostra para  $40^\circ\text{C}$ . Entretanto, o principal problema tecnológico existente em leite relacionado aos microrganismos psicrotróficos é a sua protease.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade proteolítica da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* em leite desnatado.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Amostra

Os ensaios foram realizados utilizando-se leite desnatado UHT ( $0,48 \pm 0,03$  % de gordura) de marca comercial adquirido em local de venda na região de Campinas proveniente de um único lote.

### 5.2.2 Equipamento

O equipamento utilizado foi um homogeneizador contínuo de ultra alta pressão (nG7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra). O mesmo opera com pressões entre 0 e 300 MPa e tem uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Após a passagem pelos pistões, o fluido pressurizado passa por uma válvula de retenção que realiza o desvio do fluido conforme o fluxo de pressurização necessário. O fluido é conduzido para uma válvula de homogeneização, na qual ocorre a expansão adiabática do mesmo, que retorna à pressão ambiente. Imediatamente após esta válvula, o fluido passa por um trocador de calor, com a circulação externa de água a temperatura ambiente, de forma que, no final do trocador, atinja uma temperatura próxima à temperatura ambiente.

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar água e produto. O processo era iniciado utilizando-se água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, a válvula de alimentação foi aberta iniciando-se a alimentação do produto. A estabilização de pressão foi realizada fazendo-se circular água no

interior do equipamento para que não houvesse desperdício de amostra. Após 90 segundos da abertura da alimentação de produto foi realizada a coleta da amostra tratada. Esta coleta foi realizada no interior de uma câmara de fluxo laminar de modo a garantir que a mesma fosse realizada de maneira asséptica.

O tempo de residência do fluido no interior do equipamento é de cerca de 40 segundos, incluindo o trocador de calor. Padronizou-se a retirada das amostras somente após 90 segundos para garantir que não houvesse nenhum efeito de diluição da amostra devido ao fato da estabilização do equipamento ter sido realizada com água.

O equipamento apresenta três termopares para controle de temperatura, posicionados nos seguintes pontos:

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

A função dos termopares era monitorar o produto sendo tratado e certificar-se que a temperatura não influenciou na redução da atividade enzimática verificada.

Após a coleta das amostras, o equipamento foi despressurizado e iniciou-se a limpeza da seguinte maneira: inicialmente fez-se circular água destilada por cerca de 20 minutos, a seguir utilizou-se soda 2,5% também por 20 minutos, após foi feito enxágüe com água. Após remoção da soda (monitorada pela utilização de papel indicador), o equipamento foi preenchido e permaneceu com etanol 70% até a realização do próximo experimento.

### 5.2.3 Enzima

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* utilizada na produção da enzima a ser empregada nos ensaios foi IB 2312 do Instituto Biológico de São Paulo

disponível no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP.

A cultura encontrava-se congelada em Skim Milk (Oxoid) e foi reativada através de dois repiques sucessivos em caldo TSB (Oxoid) e incubação a 30°C por 24 horas. Após a reativação da cultura, a produção da enzima consistiu em inocular *Pseudomonas fluorescens* em caldo TSB (Oxoid) e incubar a 30°C por 48 horas. Este procedimento foi feito utilizando-se erlenmeyers de cerca de 1 L, sendo que cada um foi preenchido com 400 mL de caldo, de modo a aumentar a área de contato do caldo com o oxigênio, o que facilita o crescimento do microrganismo. Após o período de incubação, o caldo foi centrifugado por duas vezes a 4000 rpm por 20 minutos e finalmente aplicou-se um tratamento térmico (80°C por 30 segundos) de modo a eliminar as células vegetativas restantes.

A enzima foi produzida em quantidade suficiente para todos os ensaios, sendo mantida armazenada a -18°C até a véspera da realização dos experimentos, quando era então descongelada em geladeira para utilização.

### **5.2.3.1 Determinação da Atividade Proteolítica da Enzima Produzida**

A atividade proteolítica da enzima produzida por *Pseudomonas fluorescens* foi quantificada em termos de unidades de atividade conforme descrito por Adams et al (1975).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µg de material solúvel em TCA (como a tirosina) por mL em 24 horas a 45°C.

O método consistiu em adicionar a uma solução de caseína 2% preparada em tampão fosfato (pH 7,5) uma quantidade de caldo enzimático cuja concentração final da solução fosse de 10%. A solução foi incubada a 45°C por 24 horas. Juntamente foi preparado um branco contendo apenas a solução de caseína 2% em tampão fosfato (pH 7,5).

Após o período de incubação, a cada 5 mL da amostra incubada foram adicionados 10 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,72 N. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel Whatman #42. Para cada 5 mL do filtrado foram adicionados 10 mL de uma solução de carbonato de sódio 15% e 3 mL do reagente fenol e as amostras foram agitadas. Exatamente 15 minutos após a adição dos dois últimos reagentes foi realizada a leitura espectrofotométrica a 650 nm. As análises foram feitas em triplicata.

Foi realizado um segundo teste para confirmar a existência de protease no caldo. Leite desnatado foi adicionado de 10% de caldo e incubado a 37°C por 24 horas. Simultaneamente foram incubadas amostras de leite sem enzima e um branco com água deionizada adicionada de 10% de caldo. Após o período de incubação, foi aplicado o método de determinação da atividade proteolítica descrito a seguir, ou seja, o mesmo a ser utilizado nas avaliações do efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na atividade enzimática da enzima produzida.

#### **5.2.4 Determinação da Atividade Proteolítica sobre as Amostras Processadas**

A atividade proteolítica sobre as amostras processadas foi determinada através de método espectrofotométrico descrito por Gomes (1995) com adaptações. Inicialmente as amostras foram submetidas a uma diálise. A seguir foi realizada a reação do dialisado com ninidrina. Esta substância ao reagir com aminoácidos e peptídeos livres provenientes da ação da protease sobre a caseína forma um complexo colorido. A intensidade desta coloração observada a 570 nm permitiu quantificar a atividade proteolítica da enzima.

##### **5.2.4.1 Diálise**

Para a realização da diálise das amostras, foram utilizadas membranas de celulose industrial, nacionais, utilizadas como envoltório de alimentos embutidos,

com diâmetro achatado de 32 mm e diâmetro aberto de 20 mm fabricados por Viskaze.

A membrana de diálise utilizada tem capacidade de retenção específica de 12400 Daltons, portanto, teoricamente permeável à maioria dos fragmentos oriundo da atividade proteolítica. A atividade das proteases (nativas e microbianas) sobre as proteínas do leite gera fragmentos proteolíticos de tamanhos variáveis, cujo peso molecular varia entre 2700 a 28000 Daltons, embora quase a totalidade destes fragmentos se situe entre 2700 a 12200 Daltons (PRATA,1991).

Os sacos de diálise foram preparados conforme descrito por Prata (1991). Os rolos foram cortados em unidades de cerca de 25 cm de comprimento, lavados várias vezes, fervidos em água deionizada e estocados em refrigerador por no máximo 15 dias. Os sacos de diálise foram fechados com um nó em uma das suas extremidades com barbante, adicionou-se 10 mL da amostra no interior dos mesmos, sendo a outra extremidade fechada com barbante. Os sacos foram então lavados com água deionizada e colocados em tubos de ensaio de 25x200 mm os quais já continham 20 mL de água destilada. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 horas. Após este período, os sacos de diálise foram retirados e procedeu-se a reação com o dialisado.

#### **5.2.4.2 Método Espectrofotométrico**

O método utilizado foi a reação de ninidrina descrita por Moore (1968) e aplicada por Gomes (1995) em trabalho semelhante a este. Entretanto, foram necessárias algumas alterações nas proporções dos reagentes utilizados de modo a obter absorbâncias mais próximas a 1,0 (limite superior de detecção do método) nas amostras controle, ou seja, aquelas adicionadas de enzima, porém não submetidas a nenhum tratamento, já que nas amostras tratadas era esperada uma redução no valor da atividade enzimática e, conseqüentemente, da absorbância. A reação foi feita adicionando-se 1 mL de dialisado e 1 mL da solução de ninidrina (0,2% em água) e aquecendo-se a 100°C por 15 minutos. Após o resfriamento,

adicionou-se 3 mL de etanol 60%, procedendo-se, em seguida, a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. O branco das amostras foi preparado da mesma maneira que os demais, porém utilizando-se água destilada ao invés de leite. Esta alteração nas proporções dos reagentes foi validada através da construção de uma curva padrão utilizando-se um aminoácido livre, a alanina (Sigma). Verificou-se que nestas novas proporções o aumento da absorbância em função da concentração foi linear, obtendo-se um valor de  $R^2$  de 0,99.

### **5.2.5 Avaliação da Redução da Atividade Proteolítica por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

A avaliação da inativação da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* foi realizada através de processos a 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. As amostras foram coletadas em recipientes estéreis.

Inicialmente, foram realizados testes preliminares de modo a determinar a quantidade de caldo enzimático que, ao ser adicionada às amostras de leite desnatado, fosse capaz de causar alterações significativas na absorbância após 24 horas de incubação a 37°C (temperatura ótima de atuação da enzima). Foram realizados testes utilizando-se 1% e 10% (v/v) de caldo.

Uma vez determinada a concentração ótima da enzima, ou seja, concentração que permitiu a verificação da inativação enzimática em 24 horas, esta concentração de enzima foi adicionada a leite UHT desnatado e as amostras foram submetidas a processos de homogeneização a ultra alta pressão a 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. Os ensaios foram realizados em triplicata. A proteólise sofrida pelas mesmas após 24 horas de processo foi avaliada. Havia uma amostra controle não processada e sem adição da enzima para a avaliação de eventual atividade da plasmina oriunda do leite UHT assim como amostras de leite processado em cada uma das pressões, porém sem adição de enzima. Para avaliar a contribuição apenas do caldo de TSB contendo a protease na variação da absorbância foi preparado um branco de enzima em água, em que água

destilada foi adicionada da mesma quantidade de enzima das amostras processadas.

A atividade enzimática percentual residual (A. E.) foi calculada segundo a Equação 5.1 a seguir:

$$A. E. = \left( \frac{\text{Abs AP}_x\text{CE} - \text{Abs AP}_x\text{SE} - \text{Abs BrEnz}}{\text{Abs AP}_0\text{CE} - \text{Abs AP}_0\text{SE} - \text{Abs BrEnz}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 5.1}$$

Onde:

Abs AP<sub>x</sub>CE: absorvância da amostra processada na pressão “x” com enzima;

Abs AP<sub>x</sub>SE: absorvância da amostra processada na pressão “x” sem enzima;

Abs Br Enz: absorvância do branco de água com enzima;

Abs AP<sub>0</sub>CE: absorvância da amostra sem processar com enzima;

Abs AP<sub>0</sub>SE: absorvância da amostra sem processar sem enzima.

### 5.2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA 5.0 através de ANOVA e teste de média (Tukey).

## 5.3 Resultados e Discussões

### 5.3.1 Produção da Protease por *Pseudomonas fluorescens*

Nos ensaios de caracterização da enzima produzida encontrou-se o valor de  $216 \pm 5$  unidades de atividade / mL de caldo.

A existência de protease no caldo de *Pseudomonas fluorescens* foi confirmada ainda pelos valores de absorvância obtidos após incubação das amostras a 37 °C por 24 horas. Estes valores são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Confirmação da presença de protease no caldo

<b>Amostra</b>	<b>Absorbância (570 nm)</b>
(a) Leite UHT	0,191
(b) Água + 10% caldo	0,294
(c) Leite UHT + 10% caldo	1,490

Observa-se que o valor de absorbância obtido no teste realizado com a amostra “c” é muito superior a somatória dos valores verificados para as amostras “a” e “b”. Esta diferença foi causada pela atuação da protease presente no caldo sobre as proteínas do leite.

### 5.3.2 Temperaturas de Processo

A Tabela 5.2 apresenta as temperaturas registradas em um dos ensaios realizados em cada uma das pressões.

Tabela 5.2: Temperaturas realizadas em cada uma das pressões nos ensaios de HUAP

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>T<sub>1</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>2</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>3</sub> (°C)</b>
<b>100</b>	26,6	47,4	26,4
<b>150</b>	27,4	57,4	27,6
<b>200</b>	28,4	67,8	28,7
<b>250</b>	29,5	76,1	29,7
<b>300</b>	30,2	83,7	30,4

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização / entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

Conforme pode ser observado na Tabela 5.2, a temperatura na saída da válvula foi tanto maior quanto maior foi a pressão aplicada. As temperaturas

apontadas pelo termopar 3 demonstram que o trocador de calor instalado foi capaz de reduzir de maneira eficiente a temperatura da amostra, minimizando assim o efeito da elevação de temperatura em função da expansão adiabática que ocorre na saída da válvula de homogeneização.

Após sair da válvula de homogeneização, o fluido entra imediatamente no trocador de calor. Os cálculos realizados demonstraram que o tempo necessário para que a temperatura da amostra seja inferior a 40 °C no interior do trocador de calor é de 5 segundos nos processos a 300 MPa, quando a amostra sai da válvula de homogeneização a cerca de 80 °C, sendo inferior nos processos realizados nas demais pressões. Considerando que o  $D_{140^{\circ}\text{C}}$  da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* é de 1 minuto (CROMIE, 1992), verifica-se que não existe efeito térmico na inativação da mesma observada nos processos realizados.

### **5.3.3 Avaliação da Redução da Atividade Proteolítica por Homogeneização a Ultra Alta Pressão**

Os testes preliminares realizados demonstraram que a adição de 10% de caldo permitiu a obtenção dos resultados do teste de inativação enzimática em 24 horas, quando já foram verificadas variações nos valores de absorbância obtidos para as amostras adicionadas de enzima processadas a diferentes pressões. Nos ensaios realizados com a adição de 1% de caldo enzimático ao leite desnatado, mesmo após 72 horas de incubação a 37 °C os valores de absorbância obtidos foram extremamente próximos, não sendo esta concentração, portanto, adequada para a realização dos ensaios.

Na Tabela 5.3 encontram-se os valores de absorbância obtidos nos ensaios de avaliação da redução da atividade proteolítica da enzima.

Tabela 5.3 Absorbâncias (a 570 nm) verificadas nos ensaios de avaliação da redução da atividade enzimática pelo processo de HUAP

	<b>Pressão (MPa)</b>	<b>Média *</b>
Adição de Enzima 10%	Controle	0,5939 <sup>***a</sup>
	100	***
	150	***
	200	0,6178 <sup>***a</sup>
	250	0,6700 <sup>b</sup>
	300	0,5295 <sup>b</sup>
Sem adição de Enzima	Controle	0,1126 <sup>c</sup>
	100	0,1312 <sup>c</sup>
	150	0,1041 <sup>c</sup>
	200	0,1343 <sup>c</sup>
	250	0,1211 <sup>c</sup>
	300	0,1311 <sup>c</sup>
Branco (Ág + Enz 10%)	Controle	0,1113 <sup>c</sup>

\* valor médio da absorbância a 570 nm obtida em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

\*\* valores obtidos a partir de diluição 1:1, ou seja, devem ser multiplicados por dois para cálculo da atividade enzimática

\*\*\* todas as amostras processadas a 100 e 150 MPa encontravam-se coaguladas ou na eminência de coagular após 24 horas de incubação a 37°C, em função disso a variação entre amostras foi extremamente alta e os dados não foram considerados

A partir dos valores apresentados na Tabela 5.3, foi calculada a atividade enzimática residual percentual utilizando-se a Equação 5.1. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.4 a seguir.

Tabela 5.4: Atividade Enzimática verificada após processo de HUAP

<b>Pressão (MPa)</b>	<b>A. E. (%)*</b>
controle	100,00 <sup>a</sup>
100	**
150	**
200	102,53 <sup>a</sup>
250	43,58 <sup>b</sup>
300	27,50 <sup>b</sup>

\* valor médio obtido em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

\*\* valor não considerado - amostras coagularam após 24 horas de incubação

Amostras processadas a 200 MPa apresentaram um ligeiro aumento na atividade enzimática. Já a 250 MPa ocorreu uma redução de cerca de 56,42% na atividade e nos processos realizados a 300 MPa, pressão máxima avaliada, esta redução foi de 72,50%.

Nos ensaios realizados a 100 e a 150 MPa observou-se que após 24 horas de incubação a 37°C as amostras ou encontravam-se coaguladas ou estavam na eminência de coagular. Estas amostras foram analisadas da mesma forma que as demais, entretanto, em função da alta variabilidade observada nos resultados, os mesmos foram desconsiderados. O pequeno aumento verificado a 200 MPa sugere que pressões inferiores podem aumentar a atividade enzimática a tal ponto da mesma ser capaz de coagular o leite em menos de 24 horas. Entretanto, a metodologia aplicada neste trabalho não permitiu quantificar este aumento. Isto é semelhante ao verificado por Dosualdo e Cristianini (2003), que ao avaliarem o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão sobre as enzimas polifenoxidase e peroxidase em água de coco na faixa de 50 a 300 MPa, verificaram que pressões entre 50 e 250 MPa provocaram ativação das duas enzimas e somente processos a 300 MPa causaram uma pequena redução na atividade das mesmas, 9,3% e 4,0%, respectivamente.

Considerando estes resultados cojitou-se realizar novos testes com um período de incubação menor para que fosse possível determinar a atividade enzimática a pressões inferiores a 200MPa. Entretanto, em tempos de incubação menores as variações nas absorbâncias a 250 e 300 MPa seriam mínimas, o que inviabilizaria o cálculo da atividade enzimática, já que os valores de absorbância das amostras com e sem enzima estariam bastante próximos. Além disso, a região de interesse deste estudo é a faixa onde existe inativação da enzima. Ainda, conforme demonstrado por Pinho, Franchi e Cristianini (2004; 2005a; 2005b) pressões superiores a 200 MPa são necessárias para causar uma redução significativa nas contagens de células vegetativas presentes em leite, o que não justificaria a aplicação de pressões inferiores. De qualquer forma, para a construção de uma curva de inativação completa na faixa de 100 a 300 MPa seria recomendado a utilização de um método de avaliação da atividade proteolítica mais preciso, como por exemplo o método ELISA (SENOCCQ et al, 2002; FAJARDO-LIRA et al, 2000; HAYES; NIELSEN, 2000).

Hayes, Fox e Kelly (2005) submeteram leite cru a processos de homogeneização a ultra alta pressão em um homogeneizador de duplo estágio, utilizando temperatura de entrada de 45°C a processos a 150, 200 e 250 MPa. As temperaturas de saída foram 67, 76,8 e 83,6°C, respectivamente. A amostra permaneceu nestas temperaturas por aproximadamente 20 segundos. Os autores verificaram redução de 85, 90 e 96% nos valores da atividade proteolítica nas pressões citadas. Estes resultados diferem dos encontrados neste estudo. Uma possível justificativa para esta diferença pode ser o fato dos autores terem avaliado apenas o efeito sobre a protease endógena presente no leite cru integral e não terem adicionado protease exógena produzida por microrganismos psicrotróficos como no presente trabalho.

Hayes e Kelly (2003) ao avaliarem o efeito da homogeneização a alta pressão na faixa de 18 a 200 MPa (simples e duplo estágio) na atividade enzimática da plasmina nativa do leite, observaram uma inativação apenas parcial da mesma na faixa de pressões estudadas (máximo de 65%). De modo geral, a

realização do processo em um ou dois estágios não resultou em diferenças significativas na inativação da enzima. As determinações foram feitas imediatamente após os processamentos.

#### 5.4 Conclusão

O processo de homogeneização a ultra alta pressão foi capaz de reduzir a atividade proteolítica das amostras de leite desnatado adicionadas de protease produzida por *Pseudomonas fluorescens*. Pressões da ordem de 300 MPa causaram uma redução de cerca de 72,5% na atividade enzimática verificada, demonstrando a aplicabilidade do processo para este fim.

#### 5.5 Referências Bibliográficas

ADAMS, D. M.; BARACH, J.T.; SPECK, M. L. Heat Resistant Proteases Produced in Milk by Psychrotrophic Bacteria of Dairy Origin. **Journal of Dairy Science**. v. 58, n. 6, p. 828-834, 1975.

ALICHANIDIS, E.; WRATHALL, J.H. M.; ANDREWS, A. T. Heat stability of pplasmin (milk proteinase) and plasminogen. **Journal of Dairy Research**. v. 53, n. 2, p. 259-269, 1986.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In: **IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

FAIRBAIRN, D.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**. v.53, n. 1, p. 139-177, 1986.

FAJARDO-LIRA, C.;NIELSEN, S. S. Effects of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**. v.81, n. 4, p. 901-908, 1998.

FAJARDO-LIRA, C.; HAYES, M. O. K. D.; NIELSEN, S. S. Effects of Psychrotrophic Bacteria and of an Isolated Protease from *Pseudomonas*

*fluorescens* M3/6 on the Plasmin System of Fresh Milk. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 10, p. 2190-2199, 2000.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado “longa vida”**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.

HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 3, p. 387-394, 2000.

HAYES, K. D.; WERE, L. M.; NIELSEN, S. S. Stimulation of bovine plasminogen activator by a protease isolated from *Pseudomonas fluorescens* M3/6. Paper 68-4, **Institute of Food Technologists' Annual Meeting**, New Orleans, LA, 2001.

HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. **Journal of Dairy Research**. v. 70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potencial applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in milk: characteristics, Roles, And Relationship. **Journal of Agricultural and Chemistry**. v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk. In: **3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**, 2004, Rio de Janeiro. . Book of Abstracts of the 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2004.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Lactobacillus helveticus* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

PRATA, L. F. **Espectrofotometria de Absorção na região ultravioleta para detecção de atividade proteolítica em leite e derivados**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1991.

SENOCCQ D.; DUPONT D.; ROLET-REPECAUD O., et al. ELISA for monitoring the cleavage of beta-casein at site Lys(28)-Lys(29) by plasmin during Comte cheese ripening. **Journal of Dairy Research**. v. 69, n. 3, p. 491-500, AUG 2002.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**. v.49, n. 8, p. 432-437, 1994.

## 6 Cálculo do Perfil de Velocidade de Escoamento de Leite Desnatado no Interior do Homogeneizador a Ultra Alta Pressão através de Fluidodinâmica Computacional

### Resumo

Como alternativa ao processamento térmico de alimentos, o processo de homogeneização a ultra alta pressão tem sido estudado visando a destruição de microrganismos e inativação enzimática. Neste trabalho foi calculado o perfil de velocidades no interior da válvula de homogeneização Stansted durante o processamento de leite desnatado através de fluidodinâmica computacional (CFD). As pressões de estudo variaram de 100 a 300 MPa e considerou-se fluxo em regime turbulento. O modelo de turbulência empregado na resolução das equações foi o SST (*shear stress transport model*). Os resultados obtidos demonstraram que na entrada do *gap* da válvula ocorre uma queda de pressão repentina, com aumento considerável da velocidade, sendo que a velocidade máxima é atingida pelo fluido na saída do *gap*, onde foi possível observar zonas de cavitação. A 300 MPa, o fluido atingiu 245 m/s. A fluidodinâmica computacional apresentou-se como uma ferramenta bastante útil na compreensão dos fenômenos que ocorrem no interior da válvula de homogeneização.

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite desnatado, CFD.

## Skim Milk Flow Pattern Determination in an Ultra High Pressure Homogenizer using CFD

### Abstract

As an alternative to thermal food processing, ultra high pressure homogenization has been studied as a method for destroying microorganisms and inactivating enzymes. At this work, the velocity profile inside Stansted homogenization valve during skim milk processing was calculated through computational fluid dynamics (CFD). Pressures studied varied from 100 to 300 MPa and turbulent flow was considered. The turbulence model applied to solve equations was SST (*shear stress transport model*). Results demonstrated that at valve gap inlet pressure strongly decreases as velocity increases. The maximum velocity value obtained was 245 m/s, at gap outlet for 300 MPa process. This work presents CFD as a useful tool to better understand flow pattern inside the valve.

Key-words: Ultra high pressure homogenization, skim milk, CFD.

## 6.1 Introdução

O processo de homogeneização tem sido aplicado na indústria de alimentos desde a metade do século XX na redução do tamanho de partículas de emulsões e suspensões, aumentando sua estabilidade. Com o passar dos anos, a demanda por produtos de maior vida de prateleira e com maior estabilidade estimulou o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de emulsões. Esta tecnologia é baseada na utilização de pressões muito elevadas e em equipamentos com novos desenhos. O desenvolvimento de aplicações do processo de homogeneização a alta pressão permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na medida em que causa inativação microbiana e enzimática.

Inicialmente desenvolvido para a indústria de laticínios, atualmente o processo é aplicado pela indústria farmacêutica, química e de biotecnologia para dispersar, misturar e processar emulsões e suspensões (DIELS et al, 2004).

O processo de Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) é um processo em base contínua que utiliza fundamentalmente um homogeneizador de ultra alta pressão com o intuito de romper células. O produto é bombeado por dois intensificadores de pressão, sendo forçado a fluir através de uma válvula de homogeneização. Isto produz uma velocidade muito elevada através do orifício (*gap*), e a expansão resultante é considerada como um dos fatores responsáveis pela ruptura das células dos microrganismos, causando mínimas alterações nas células dos alimentos.

Na literatura há muita controvérsia sobre o mecanismo real de destruição das células pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão. Alguns autores propuseram a cavitação e as ondas de choque e impulsos de pressão gerados no colapso das cavidades (SAVE et al, 1994 apud DIELS et al, 2004). Outros acreditam que o impacto das células contra as paredes da válvula do homogeneizador é a principal causa para a ruptura das mesmas (ENGLER; ROBINSON, 1981; MOORE; HOARE; DUNNILL, 1990). Mecanismos como

turbulência, velocidade e magnitude da queda de pressão e viscosidade dinâmica também foram propostos (DOULAH; HAMMOND; BROOKMAN, 1975). Dois parâmetros afetam fortemente a inativação microbiana pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão: a viscosidade do fluido e a temperatura (MILLER; ROGOWSKI; KELLY, 2002).

Em sistemas de alta pressão dinâmica, os fenômenos de cavitação, tensão de cisalhamento e turbulência podem estar envolvidos simultaneamente, sendo muito difícil ordená-los por importância (WALSTRA, 1983 apud FLOURY et al, 2004).

Apesar da configuração da válvula de homogeneização a ultra alta pressão ser, aparentemente, simples; a fluidodinâmica envolvida é bastante complicada. Intensas mudanças de energia ocorrem na válvula de homogeneização quando o líquido passa da zona de alta pressão e baixa velocidade para a de baixa pressão e de alta velocidade. Desta forma, a fluidodinâmica computacional apresenta-se como uma ferramenta bastante conveniente para a compreensão destas mudanças (FLUORY et al, 2004).

Kleining e Middleberg (1996; 1997) investigaram o fluxo em uma válvula de homogeneização tipo APV-Gaulin através de simulação numérica. O estudo foi feito em duas etapas: na primeira, Kleining e Middleberg (1996) modelaram o fluxo apenas na entrada da válvula e na região do *gap*. Já em um segundo passo, Kleining e Middleberg (1997) utilizaram os perfis de velocidade na região de saída do *gap* obtidos no trabalho anterior como condições de contorno da entrada da região de impacto da válvula. Na primeira parte, os autores apresentam uma expressão simples que utiliza os resultados numéricos e que permite o cálculo do gradiente de pressão, sendo que o gradiente de pressão mostrou-se uma variável independente mais adequada para correlação com a destruição celular que a pressão de operação. Já na segunda parte, foi verificado que o jato de impacto existente no sistema é aproximadamente laminar.

Stevenson e Chen (1997) foram os primeiros a construir um modelo do perfil do fluxo em toda a válvula de homogeneização através de um código de CFD comercial. O modelo obtido fornece informações detalhadas a respeito dos perfis de velocidades em válvulas de homogeneização e os autores indicam a possibilidade do mesmo ser utilizado para a produção de modelos para ruptura de células e glóbulos de gordura.

Os autores destes trabalhos, entretanto, enfatizaram a necessidade de se obter mais informações relacionadas com a mecânica de fluidos no interior do homogeneizador para um melhor entendimento dos mecanismos físicos de destruição de microrganismos verificada durante o processo. O conhecimento da queda de pressão e do tamanho do *gap* não fornece informações suficientes. Um perfil mais detalhado de velocidade e pressão no interior da válvula de homogeneização é necessário para o cálculo das forças aplicadas ao fluido durante a homogeneização.

Floury et al (2004) estudaram o fluxo em um homogeneizador a ultra alta pressão STANSTED na faixa de pressão de 26 a 340 MPa. Este homogeneizador difere do APV-Gaulin estudado por Kleining e Middleberg (1996; 1997), já que o mesmo não apresenta anel de impacto. Após estimar o tamanho do *gap* em função da pressão de operação e regime de escoamento, simulações numéricas foram conduzidas utilizando-se o software FLUENT para analisar o perfil do fluxo de água no interior da válvula de homogeneização a ultra alta pressão. O modelo considerou fluido incompressível e viscosidade e temperatura do fluido constantes (água a 20°C). O trabalho oferece detalhes interessantes com relação ao regime do fluxo, perfil de pressão, turbulência e áreas de cavitação no interior da válvula, o que não poderia ser facilmente determinado experimentalmente devido às grandes alterações que ocorrem em distâncias muito pequenas e às pressões de operação extremamente elevadas.

O objetivo do presente trabalho foi calcular o perfil de velocidades no interior da válvula do homogeneizador a ultra alta pressão Stansted Fluid Power

em diferentes pressões de operação ao processar leite desnatado utilizando-se fluidodinâmica computacional.

## 6.2 Material e Métodos

### 6.2.1 Mecanismo de Homogeneização

Nos homogeneizadores estudados por Kleining e Middleberg (1996; 1997) e Stevenson e Chen (1997), o fluido é alimentado axialmente na sede da válvula e então acelerado radialmente no *gap* entre a válvula e a sede. Quando o fluido deixa o *gap*, torna-se um jato radial que se estagna em um anel de impacto antes de deixar o homogeneizador. Já no Homogeneizador a Ultra Alta Pressão, Stansted Fluid Power, objeto deste estudo, o fluxo é axial sob alta pressão ao longo da parte móvel da válvula e flui com alta velocidade pelo estreito *gap* radial, antes de deixar a sede da válvula a pressão atmosférica. A altura do *gap* e os perfis de velocidade e pressão resultantes após a válvula dependem da força atuando sobre o pistão da válvula, que pode ser ajustado para regular a intensidade de pressão requerida em cada processo. A queda de pressão do líquido que ocorre na válvula é chamada de pressão de homogeneização. A Figura 6.1 a seguir representa esquematicamente a válvula de homogeneização bem como as respectivas dimensões consideradas no modelo elaborado.

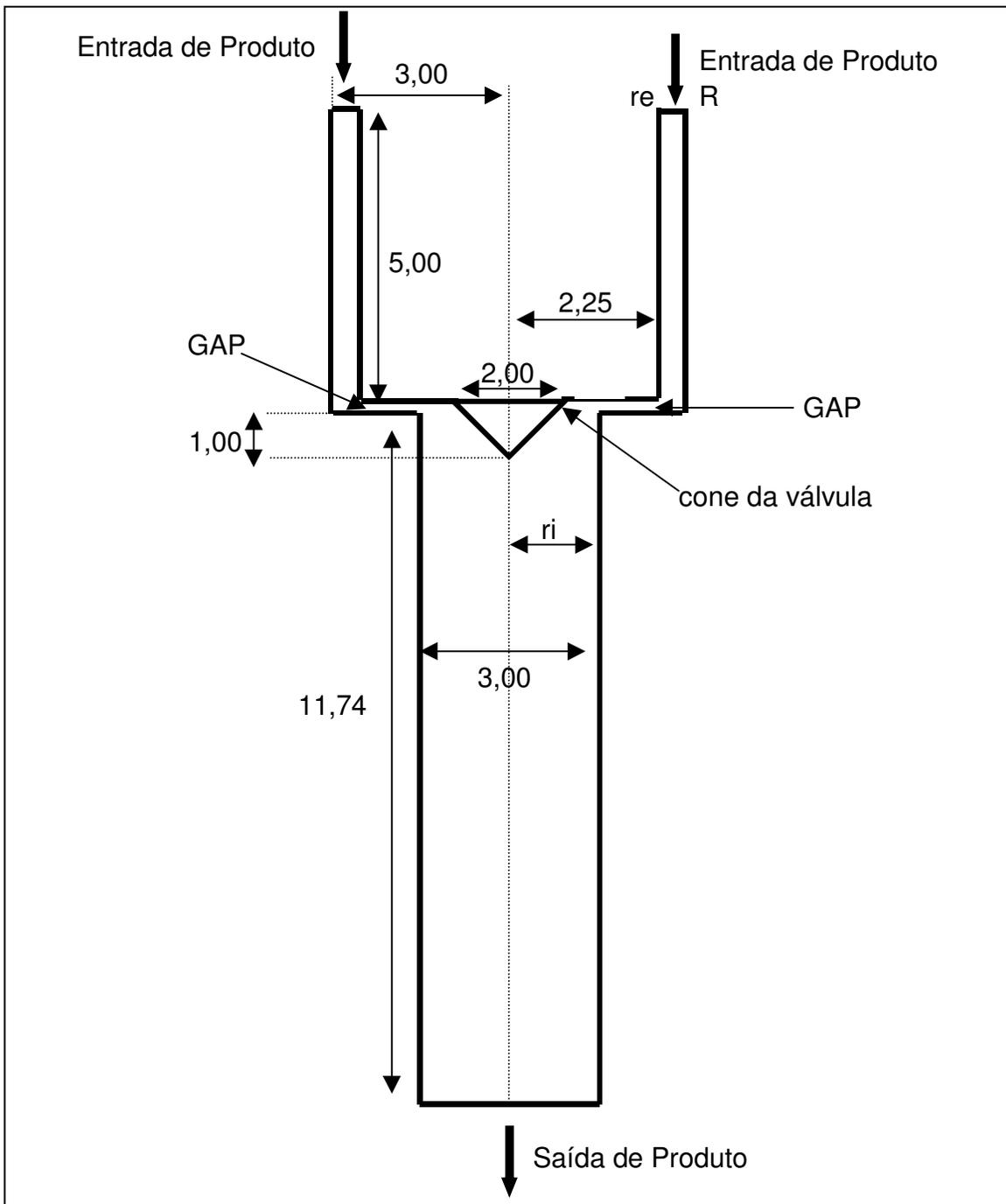


Figura 6.1: Válvula de Homogeneização STANSTED – dimensões em mm

### 6.2.2 Regime do Fluxo

As forças mecânicas que normalmente atuam através da fase contínua e são responsáveis pela ruptura de gotas, células ou ligações covalentes dependem do regime do fluxo na válvula de homogeneização. O regime do fluxo é caracterizado pelo número de Reynolds, que varia em função das dimensões da válvula, densidade e viscosidade do líquido e pressão de homogeneização.

A análise do regime do fluxo foi feita dividindo-se o sistema em 3 partes distintas: parte anterior da válvula, *gap* e parte posterior da válvula, conforme descrito por Fluory et al (2004).

#### Parte anterior da válvula:

O diâmetro hidráulico é igual à diferença entre os diâmetros do duto de entrada e o pistão da válvula:

$$d_h = 2(R - r_e) \quad \text{Eq. 6.1}$$

Onde:

$d_h$ : diâmetro hidráulico

R: raio do duto de entrada = 3,00 mm

$r_e$ : raio do pistão da válvula = 2,25 mm

$r_i$ : raio da saída da válvula = 1,50 mm

A velocidade média na entrada é dada por:

$$v = \frac{Q}{\pi(R^2 - r_e^2)} \quad \text{Eq. 6.2}$$

Onde:

Q: vazão = 270 mL/min

Então, o número de Reynolds é calculado pela Equação 6.3:

$$R_e = \frac{2\rho Q}{\mu\pi(R + r_e)} \quad \text{Eq. 6.3}$$

Onde:

$\mu$ : viscosidade = 1,89 cP

$\rho$ : densidade = 1028 kg/m<sup>3</sup>

Considerando os valores acima, obteve-se um valor de Reynolds de 296. Este valor corresponde a um regime puramente laminar independentemente da pressão aplicada.

#### Gap da válvula:

O diâmetro hidráulico do *gap* anular é igual a 2h, sendo h a altura do *gap*. A velocidade média no *gap* é calculada como:

$$v = \frac{Q}{2\pi rh} \quad \text{Eq. 6.4}$$

O valor de r na Equação 6.4 acima varia de  $r_i$  a  $r_e$ . O número de Reynolds na região do *gap* é calculado através da Equação 6.5 a seguir:

$$Re_{\text{gap}} = \frac{\rho Q}{\pi r \mu} \quad \text{Eq. 6.5}$$

Considerando-se o valor de r entre  $r_i$  e  $r_e$ , os valores de Reynolds obtidos situam-se entre 350 e 520, sendo o fluxo puramente laminar.

#### Parte posterior da válvula:

A velocidade média na parte posterior da válvula é calculada da seguinte forma:

$$v = \frac{Q}{2\pi r_i} \quad \text{Eq. 6.6}$$

O número de Reynolds pode ser então, calculado através da Equação 6.7 a seguir:

$$R_e = \frac{2\rho Q}{\mu\pi r_i} \quad \text{Eq. 6.7}$$

Na parte posterior da válvula o fluido sofre um aquecimento em função da expansão adiabática que ocorre. Isto afeta a densidade e, principalmente, a viscosidade do mesmo. O valor de Reynolds em cada uma das pressões, 100, 150, 200, 250 e 300 MPa, foi calculado considerando as temperaturas obtidas experimentalmente na saída da válvula de homogeneização durante o processamento de leite desnatado no equipamento. As temperaturas e valores de densidade, viscosidade e Reynolds correspondentes são apresentados na Tabela 6.1 a seguir.

Tabela 6.1: Temperatura, densidade, viscosidade e número de Reynolds correspondentes a cada umas das pressões dos ensaios de HUAP

Pressão (MPa)	$T_{\text{saída da válvula}}$	Densidade*	Viscosidade*	Reynolds
	(°C)	(kg/m <sup>3</sup> )	(cP)	
100	45,5	1026	1,20	2177
150	56,3	1024	1,90	2794
200	64,3	1018	0,70	2946
250	69,9	1015	0,63	3077
300	80,2	1010	0,57	3384

\*Fonte: KESSLER, 1981

Neste tipo de geometria, a transição de regime laminar para turbulento ocorre em Reynolds em torno de 2000. Observa-se que na faixa de pressões avaliadas neste estudo, o regime é de transição na região posterior da válvula. Este fato complica muito o entendimento do mecanismo de ruptura das partículas neste tipo de homogeneizador.

### 6.2.3 Gap da válvula x pressão de operação

Inicialmente, é necessário obter uma relação entre o *gap* da válvula e a pressão de operação para construir a malha do fluxo do domínio e então modelar o fluxo na válvula a partir de um método numérico. A queda de pressão que ocorre é constituída por 3 partes: uma perda na entrada, uma perda na saída e uma perda friccional. Existem algumas correlações que podem ser aplicadas. Kleining e Middleberg (1996; 1997), Stevenson e Chen (1997) e Flourey et al (2004) verificaram experimentalmente a validade das correlações de Nakayama (1964) e Phipps (1975) para estimar o tamanho do *gap* em função da pressão.

Flourey et al (2004) validaram estas correlações em um equipamento de homogeneização a ultra alta pressão semelhante ao utilizado neste trabalho. Os resultados obtidos demonstraram que estas correlações permitem obter uma boa aproximação da magnitude do *gap* a baixas pressões (10 MPa). Kleining e Middleberg (1996) e Stevenson e Chen (1997) também provaram que estas correlações fornecem boas aproximações do tamanho do *gap* da válvula de um homogeneizador APV-Gaulin.

Para fluxo laminar Flourey et al (2004) apresentam a Equação 6.8 abaixo, derivada da Equação de Nakayama (1964).

$$\Delta p_L = \frac{\rho}{4} \left[ \frac{Q}{2\pi r_e h} \right]^2 + \frac{6\mu Q}{\pi h^3} \ln \left( \frac{r_e}{r_i} \right) + \frac{\rho}{4} \left[ \frac{Q}{2\pi r_i h} \right]^2 \quad \text{Eq. 6.8}$$

Para regime de transição ( $1000 < Re < 5000$ ), os autores apresentam a Equação 6.9, derivada de Phipps (1975):

$$\Delta p = \frac{\rho}{4} \left[ \frac{Q}{2\pi r_e h} \right]^2 + \frac{5\rho\gamma^{3/5}}{h^3} \left( \frac{Q}{2\pi} \right)^{7/5} \left( \frac{1}{r_i^{2/5}} - \frac{1}{r_e^{2/5}} \right) + \frac{\rho}{4} \left[ \frac{Q}{2\pi r_i h} \right]^2 \quad \text{Eq. 6.9}$$

Conhecendo-se a vazão ( $Q$ ) na válvula, as dimensões da sede ( $r_e$  e  $r_i$ ) e as propriedades do fluido (viscosidade  $\mu$ , viscosidade cinemática  $\nu$  e densidade  $\rho$ ) foi possível estimar os valores do *gap* para cada uma das pressões.

No presente trabalho, apesar do regime na parte posterior da válvula ser de transição, optou-se por estimar o *gap* utilizando-se a correlação de Nakayama (Equação 6.8). Isto porque foi observado nos trabalhos citados que os valores previstos pela mesma aproximam-se mais dos obtidos experimentalmente, especialmente em pressões elevadas. Apesar das velocidades serem muito altas, o fato do *gap* ser extremamente estreito faz com que o regime seja aproximadamente laminar (STEVEYSON; CHEN, 1997). Segundo Kleining e Middleberg (1996) a correlação de Phipps tende a superestimar a queda de pressão nos homogeneizadores para destruição de células. Os autores obtiveram desvios da ordem de 1% entre os resultados numéricos obtidos a partir do código CFD e aqueles previstos pela correlação de Nakayama. Este desvio foi o mesmo verificado entre os previstos a partir do código e os dados obtidos experimentalmente.

## 6.2.4 Método Numérico

### 6.2.4.1 Equações

Um aspecto extremamente importante na implementação de códigos de fluidodinâmica computacional é a escolha do regime. No item 6.2.2, demonstrou-se que o fluxo é laminar, ou no máximo de transição na saída da válvula. Entretanto, era esperado que o líquido ao sair da válvula a altas velocidades se expandisse, causando a formação de regiões de recirculação. Em função desta incerteza, as simulações foram realizadas considerando regime turbulento. Isto é semelhante ao considerado por Flourey et al (2004).

As equações que governam o fluxo principal são as equações de conservação de massa (6.10), momento (6.11) e energia (6.12) apresentadas a seguir. Maiores detalhes podem ser encontrados em Patankar (1980).

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{U}) = 0 \quad \text{Eq. 6.10}$$

$$\frac{\partial \rho \mathbf{U}}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{U} \otimes \mathbf{U}) = \nabla \cdot (-p \delta + \mu (\nabla \mathbf{U} + (\nabla \mathbf{U})^T)) + \mathbf{S}_M \quad \text{Eq. 6.11}$$

$$\frac{\partial \rho h_{\text{tot}}}{\partial t} - \frac{\partial p}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{U} h_{\text{tot}}) = \nabla \cdot (\lambda \nabla T) + S_E \quad \text{Eq. 6.12}$$

Onde:

$\rho$ : densidade

$\mathbf{U}$ : vetor de velocidade ( $U_{x,y,z}$ )

$p$ : pressão estática

$\delta$ : matriz identidade

$\mu$ : viscosidade

$\mathbf{S}_M$ : termo fonte de momento

$h_{\text{tot}}$ : entalpia específica total

$\lambda$ : condutividade térmica

$S_E$ : fonte de energia

Considerou-se fluido newtoniano, isotérmico, incompressível e com densidade e viscosidade constantes ao longo do domínio.

#### 6.2.4.2 Modelo de Turbulência

O modelo de turbulência escolhido foi o modelo SST (*shear stress transport model*) descrito por Menter (1994) e disponível no software ANSYS CFX 10.0 utilizado nas simulações deste estudo. O autor apresenta detalhadamente as equações envolvidas no mesmo bem como as principais vantagens deste modelo em relação aos demais modelos de turbulência.

Resumidamente, o modelo SST combina as vantagens dos modelos  $k-\omega$  e  $k-\epsilon$ . O modelo SST utiliza o modelo  $k-\omega$  nas proximidades da parede e  $k-\epsilon$  na borda da camada limite e também fora da mesma. A definição da viscosidade cinemática é modificada de modo a considerar o transporte da tensão principal de cisalhamento. A formulação da tensão de cisalhamento em modelos de duas equações leva a superestimar valores em fluxos com gradientes de pressão adversos.

A formulação na proximidade da parede (*near wall treatment*) é importante na medida em que determina a precisão da tensão de cisalhamento e da transferência de calor na parede e tem influência no desenvolvimento da camada limite, incluindo o ponto de separação. Tal fato é de extrema importância neste trabalho, já que em função das pequenas dimensões da válvula, especialmente na região do *gap*, os efeitos das paredes podem ser significativos no fluxo. O modelo SST do ANSYS CFX 10.0 tem este tipo de tratamento automaticamente. Um modelo para baixo números de Reynolds que trata a sub-camada viscosa é usado se a malha próxima à parede é refinada e a função de parede é utilizada após esta camada.

#### 6.2.4.3 Método Numérico e Convergência

O método numérico utilizado é baseado no método de volumes finitos, sendo descrito em detalhes por Menter (1994) e no Manual do software ANSYS CFX 10.0.

Estabeleceu-se que todos os resíduos normalizados deveriam ser inferiores a  $5 \times 10^{-5}$ , valor este considerado bastante satisfatório para os problemas de engenharia (ANSYS CFX 10.0 User Guide, 2005).

#### 6.2.4.4 Domínio Computacional e Malha

As malhas foram geradas através do software ANSYS ICEM CFD 10.01. Para todas as simulações foram utilizadas malhas hexaédricas, compostas por 77.049 elementos e 158.082 nós. Considerou-se a simetria radial da válvula e a geometria utilizada representa  $0,1^\circ$  dos  $360^\circ$  totais. Isto foi feito com o intuito de diminuir o esforço computacional necessário para a resolução do problema. Na região do *gap* foi utilizada uma maior concentração de elementos (malha mais refinada) em função da drástica redução nas dimensões da válvula que ocorre nesta área, como pode ser observado na Figura 6.2 a seguir.

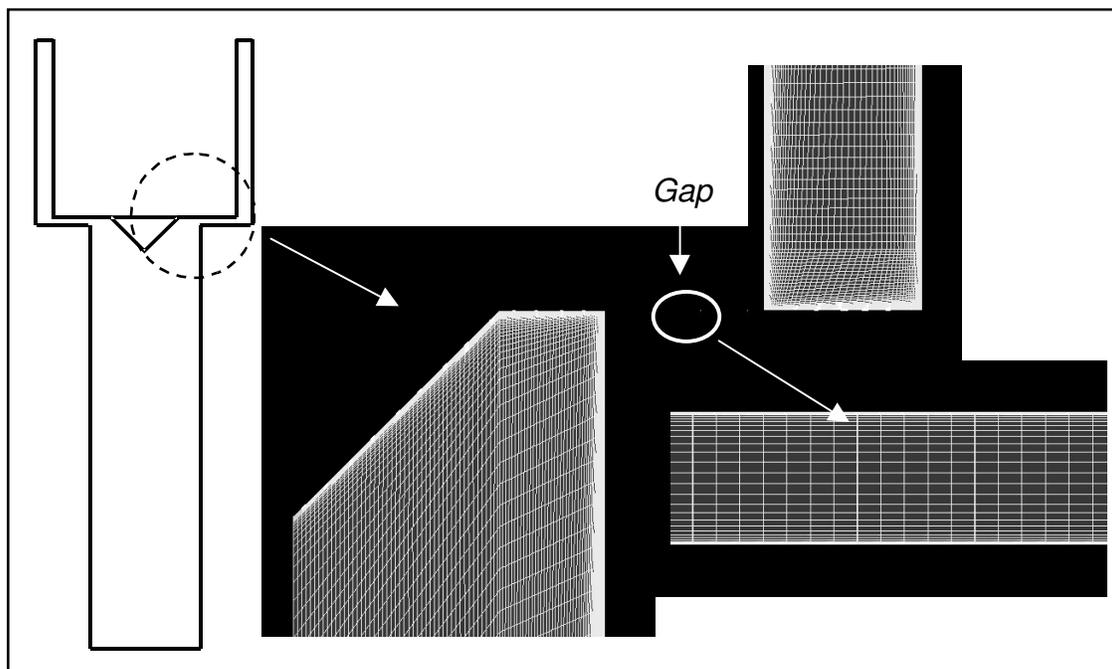


Figura 6. 2: Malha hexaédrica utilizada

As malhas foram importadas para o software ANSYS CFX 10.0, onde foram realizados os cálculos.

### 6.2.4.5 Simulações

As simulações foram realizadas utilizando-se um microcomputador PC com processador Pentium 4 de 3 GHz e 1 Gb de memória RAM. Com o intuito de acelerar a convergência dos cálculos, adotou-se a seguinte estratégia: inicialmente as simulações foram realizadas considerando-se escoamento em regime laminar. Nesta etapa utilizou-se como condição de contorno a velocidade na entrada da válvula, 0,36 m/s, calculada em função da vazão de 270 mL/min. Os resultados obtidos nesta etapa foram utilizados como valores iniciais para a segunda simulação realizada. Na segunda etapa, a queda de pressão foi a condição de contorno aplicada e o modelo de turbulência empregado foi o SST já descrito. Com esta estratégia, cada uma das etapas durou aproximadamente 24 horas, sendo possível a obtenção dos resultados finais após 48 horas de simulação para cada uma das pressões.

Considerou-se regime transiente com passo de tempo de  $10^{-9}$  segundos.

## 6.3 Resultados e Discussões

### 6.3.1 Cálculo do *gap*

A Figura 6.3 apresenta os valores do *gap* em função da pressão obtidos partir da correlação de Nakayama (Equação 6.8). Estes valores foram utilizados na construção da geometria a ser utilizada nos cálculos dos perfis de velocidade através de CFD. Conforme esperado, pode-se observar que quanto maior a pressão aplicada, menor o tamanho do *gap*.

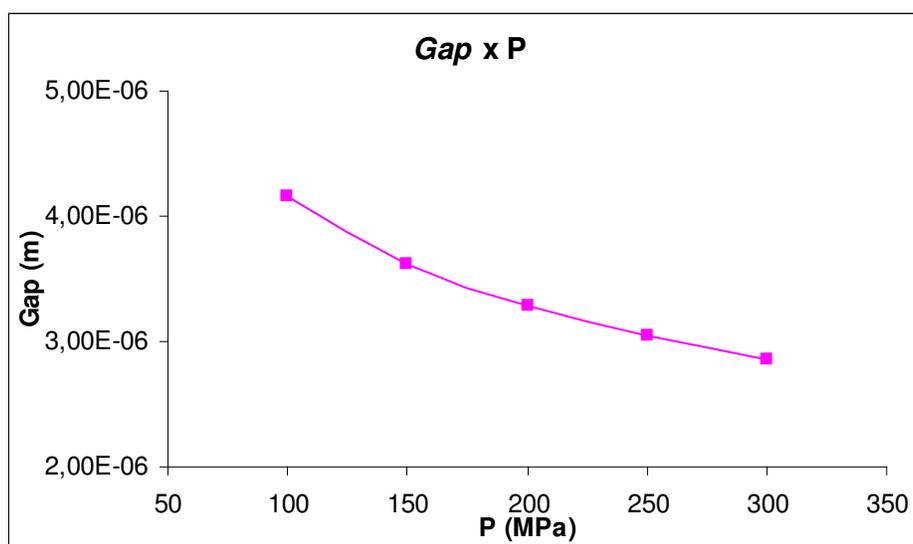


Figura 6.3: Valores preditos pela correlação de Nakayama para o tamanho do *gap* em função da queda de pressão no interior da válvula de homogeneização (considerando-se leite desnatado)

### 6.3.2 Simulações

A Tabela 6.2 apresenta os valores de pressão obtidos numericamente na primeira etapa de simulação e de vazão obtidos na segunda etapa. O desvio foi calculado pela diferença entre valores medidos e calculados, dividido pelo valor medido experimentalmente, multiplicando-se por 100 para leitura em porcentagem.

Tabela 6. 2: Resultados de pressão e vazão obtidos nas duas etapas de simulação

Pressão (MPa)	Etapa 1: <i>Laminar</i>		Etapa 2: <i>Turbulento</i>	
	Pressão Calculada*	Desvio (%)	Vazão Calculada**	Desvio (%)
100	102,4	2,40	265,0	1,85
150	155,4	3,60	266,2	1,41
200	204,3	2,15	266,4	1,33
250	256,5	2,60	267,2	1,04
300	306,4	2,13	268,9	0,41

\* utilizando-se vazão prescrita

\*\* utilizando-se pressão prescrita

Observa-se que mesmo utilizando modelo laminar (com velocidade prescrita na entrada), os resultados obtidos para queda de pressão já aproximaram-se bastante dos esperados, com desvios inferiores a 4%. Os resultados destas simulações foram então utilizados como valores iniciais para as simulações finais onde se empregou o modelo de turbulência SST e a pressão de homogeneização como condição de contorno. Neste caso, as respostas obtidas foram as vazões, também bastante próximas do valor obtido experimentalmente (desvios inferiores a 2%). Estes resultados também podem ser verificados na Tabela 6.2.

Os resultados apresentados nos itens a seguir são todos provenientes da segunda etapa da simulação, ou seja, após a realização do cálculo considerando-se escoamento em regime turbulento. O sistema de coordenadas utilizado como referência nos gráficos dos próximos itens encontra-se na Figura 6.4.

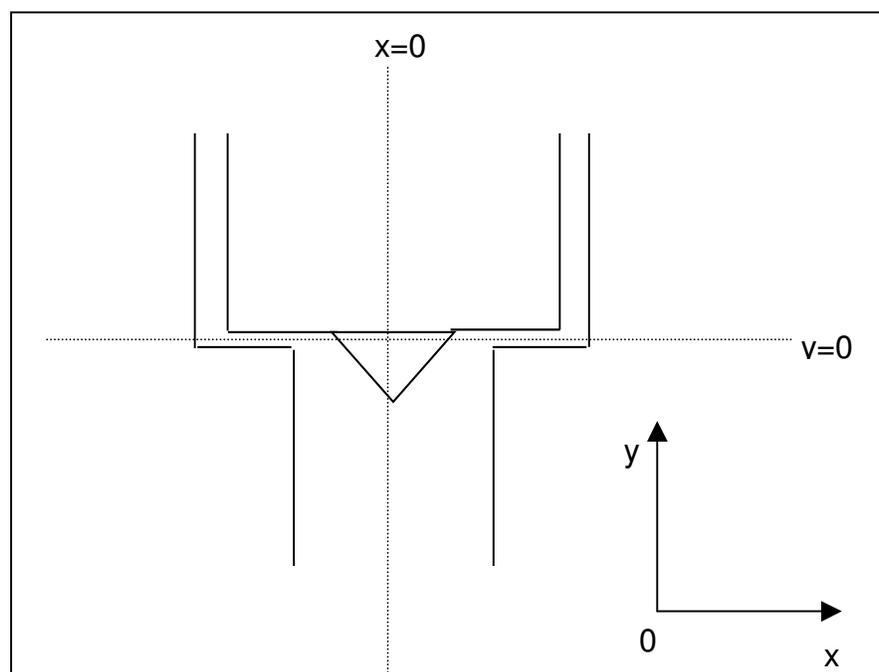


Figura 6.4: Sistema de coordenadas utilizado

### 6.3.3 Perfis de Velocidade

Quando o fluido aproxima-se da região do *gap*, extremamente estreita, observa-se um rápido aumento na velocidade do fluido e uma correspondente queda da pressão. Desta forma, a pressão é convertida em energia cinética. Segundo Flourey et al (2004), diversos autores (WALSTRA, 1983; LANDER, 2000; SMULDERS, 2000) consideram que toda a pressão transforma-se em energia cinética. Entretanto, caso isso ocorresse no presente trabalho, a 300 MPa corresponderia uma velocidade de 764 m/s sendo que a velocidade máxima observada na referida pressão foi de 245 m/s na saída do *gap*. O que ocorre é que a queda total de pressão é dividida em energia cinética e perdas por atrito (Equação 6.8). As Figuras 6.5 e 6.6 a seguir apresentam o rápido aumento de velocidade na entrada do *gap* e a queda de pressão observada ao longo do mesmo ( $y=0$ ).

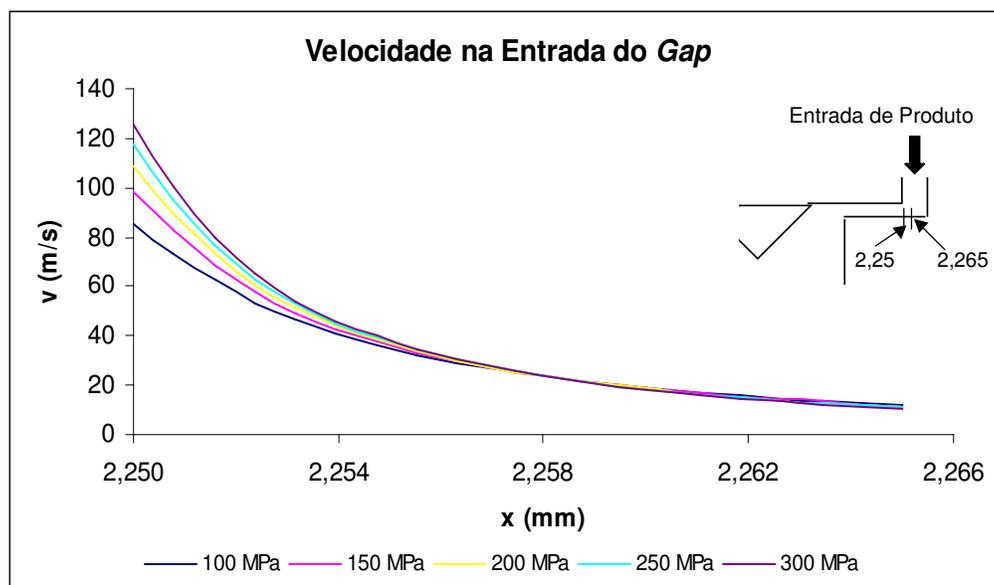


Figura 6.5: Velocidade na entrada do *gap*

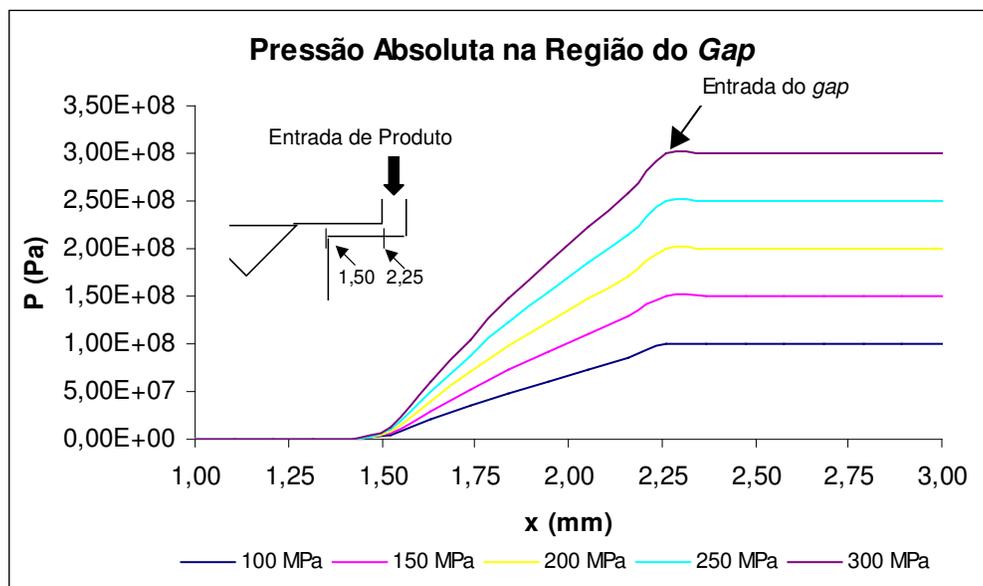


Figura 6.6: Perfis de pressão ao longo do *gap*

Observa-se que quanto maior a pressão de homogeneização e, portanto, menor o tamanho do *gap*, maiores são as velocidades obtidas.

A Figura 6.7 apresenta os perfis de velocidade em três pontos diferentes ao longo do *gap* para a simulação de 300 MPa: 2,25 mm (entrada), 1,87 mm (interior) e 1,50 mm (saída). Observa-se que os perfis de velocidade obtidos são aproximadamente parabólicos e que quanto mais próximo da saída do *gap*, maiores são as velocidades.

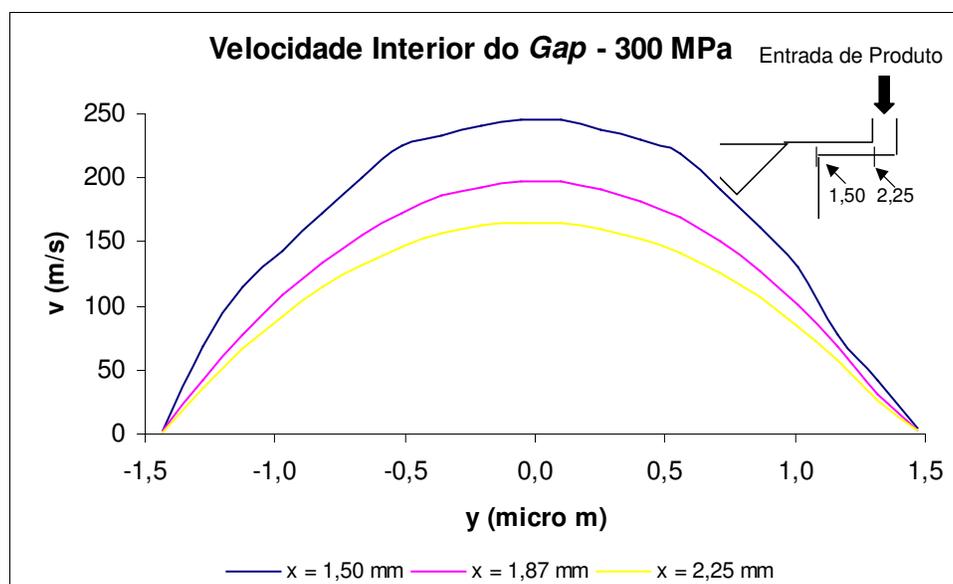


Figura 6.7: Perfis de velocidade ao longo do *gap* – pressão de 300 MPa

Na Figura 6.8 podem ser observados os perfis de velocidades na saída do *gap* para as diferentes pressões avaliadas ( $x=1,5$  mm).

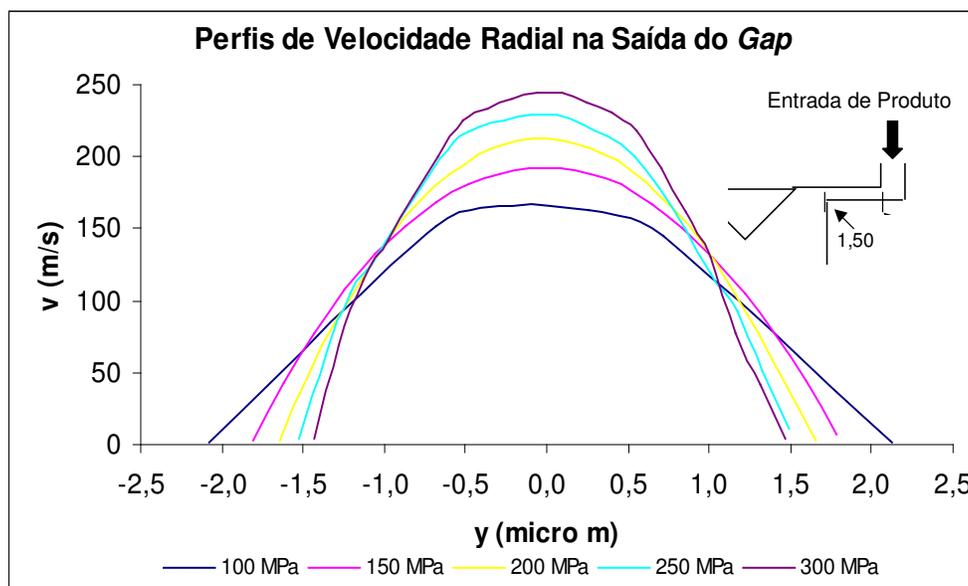


Figura 6.8: Perfis de velocidade na saída do *gap*

Conforme esperado, quanto maior a queda de pressão, maiores são os valores de velocidades obtidos.

A Figura 6.9 apresenta um gráfico da velocidade máxima verificada à saída do *gap* em função da pressão de homogeneização.

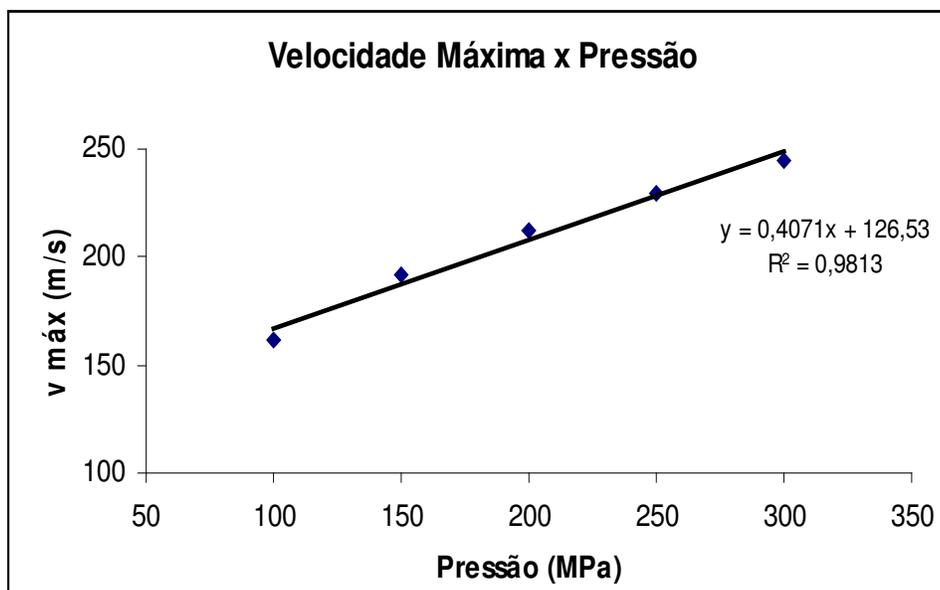


Figura 6.9: Pressão de homogeneização x velocidade máxima (saída do *gap*)

O valor de  $R^2$  de 0,98 obtido indica que a velocidade máxima aumenta de maneira linear com o aumento da pressão de homogeneização, sendo que o valor máximo obtido neste trabalho foi de 245 m/s na saída do *gap* nos processos a 300 MPa.

Conforme já apresentado na introdução deste capítulo, em homogeneizadores do tipo APV, onde a presença do anel de impacto é significativa no processo, o fluido atinge o citado anel com velocidades altíssimas. No homogeneizador objeto deste estudo isto não ocorre. Na região próxima ao cone da válvula as velocidades são baixíssimas. Isto pode ser observado na Figura 6.10 a seguir ( $y=0$ ).

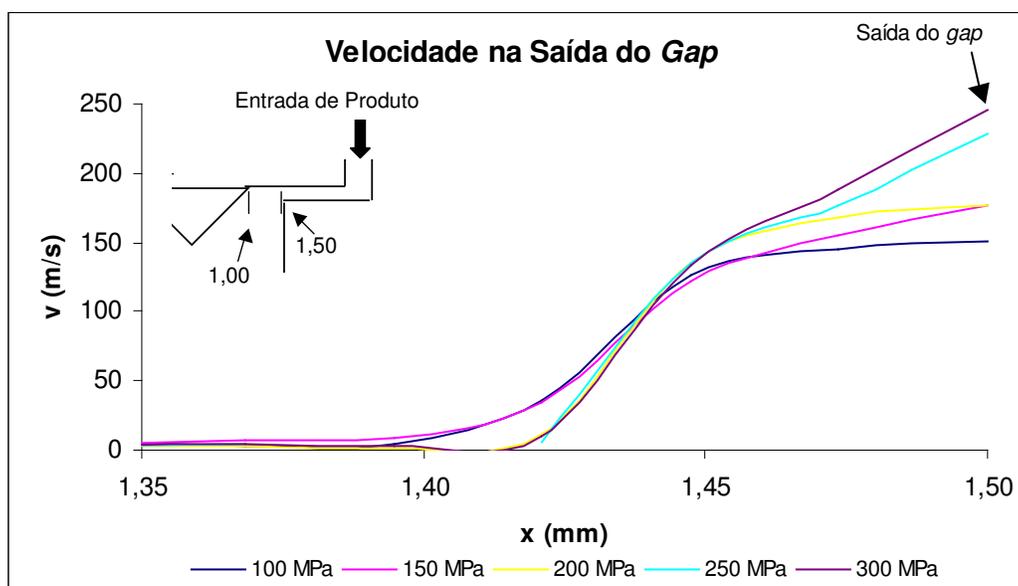


Figura 6.10: Velocidade na saída do *gap*

Isto permite concluir que não existe efeito de choque do fluido contra a sede da válvula na destruição de microrganismos produzida por este equipamento. Este fato pode ser explicado pelas linhas de fluxo principal apresentadas na Figura 6.11.

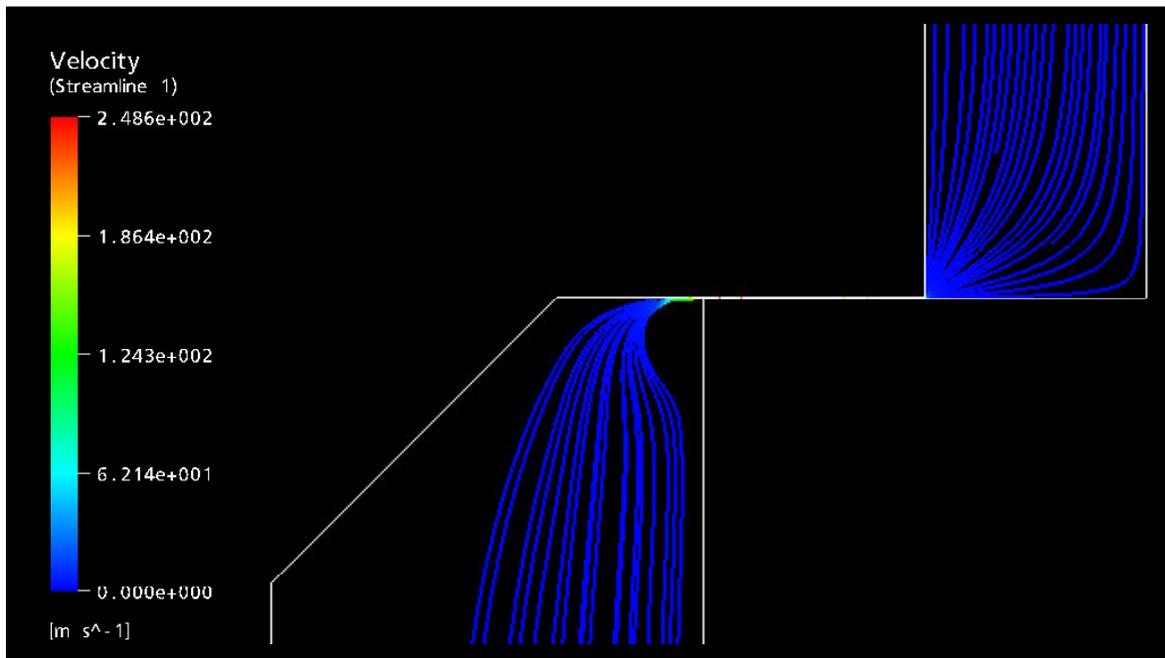


Figura 6.11: Linhas de fluxo – simulação a 300 MPa

As linhas de fluxo principal apresentadas na Figura 6.11 correspondem à simulação de 300 MPa. Nas demais pressões as linhas de fluxo obtidas foram bastante semelhantes.

Na Figura 6.12 são apresentados os perfis de pressão na saída do *gap* para as simulações de 100 e 300 MPa. Observa-se que quanto maior a pressão empregada, maior é a zona de cavitação, assinalada pela linha pontilhada branca. Isto valida a hipótese de turbulência na saída do *gap*.

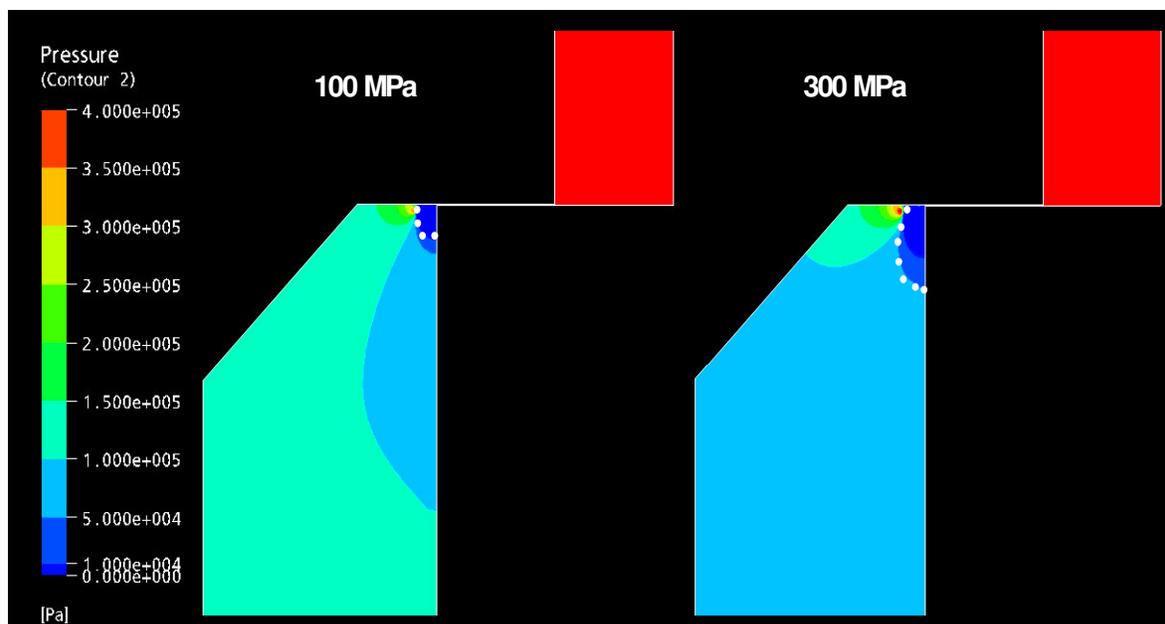


Figura 6.12: Perfil de pressão na saída do *gap*

Os resultados apresentados neste estudo estão bastante próximos dos obtidos por Flourey et al (2004) em trabalho semelhante, porém considerando água a uma vazão de aproximadamente 167 mL/min. O valor máximo de velocidade obtido pelos autores em simulações considerando pressão de 340 MPa foi cerca de 200 m/s. Isto pode ser explicado pela vazão consideravelmente menor do equipamento em questão.

Na literatura diversas hipóteses sobre o mecanismo real de destruição das células pelo processo de homogeneização a ultra alta pressão foram levantadas. Alguns autores propuseram a cavitação e as ondas de choque e impulsos de pressão gerados no colapso das cavidades. Outros acreditam que o impacto das células contra as paredes da válvula do homogeneizador seja a principal causa para a ruptura das mesmas (ENGLER; ROBINSON, 1981; MOORE; HOARE; DUNNILL, 1990), o que no tipo de homogeneizador utilizado neste trabalho não ocorre. Mecanismos como turbulência, velocidade e magnitude da queda de pressão na saída da válvula já descritos na literatura (DOULAH; HAMMOND; BROOKMAN, 1975) provavelmente são os responsáveis pela destruição microbológica causada pelo tipo de válvula (STANSTED) utilizado neste trabalho.

## 6.4 Conclusão

O estudo dos perfis de velocidade no interior da válvula de homogeneização demonstrou que a mesma aumenta linearmente com o aumento da pressão, atingindo seu valor máximo na saída do *gap*. Neste local, foi observada a existência de zonas de turbulência, que é tanto maior, quanto maior é a pressão de homogeneização.

Uma sugestão para futuros estudos, seria modelar o que ocorre na célula do microrganismo no processo (tensão na parede etc) e também o efeito de diferentes formatos de agulha nos perfis de velocidade e pressão e também nas zonas de cavitação. Além disso, seria interessante modelar a transferência de calor que ocorre no interior da válvula.

## 6.5 Referências Bibliográficas

ANSYS CFX 10.0 User Manual, 2005.

BERNARDO, S. **Estudo dos Escoamentos Gasoso e Gás-Sólido em Ciclones pela Aplicação de Técnicas de Fluidodinâmica Computacional**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

DOULAH, M. S.; HAMMOND, T. H.; BROOKMAN, J. S. G. A Hydrodynamic Mechanism for the Disintegration of *Saccharomyces cerevesiae* in an Industrial Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 6, p. 845-858, 1975.

ENGLER, C. R.; ROBINSON. C. W. Disruption of *Candida utilis* Cells in High Pressure Flow Devices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 4, p. 765-780, 1981.

FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. **Chemical Engineering Science**. v. 59, n. 4, p. 843-853, 2004.

- KESSLER, H. G. **Food Engineering and Dairy Technology**. 1981, 654p.
- KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. The correlation of cell disruption with homogeniser valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. **Chemical Engineering Science**. v. 51, n. 23, p. 5103-5110, 1996.
- KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. Numerical and experimental study of a homogeniser impinging jet. **AIChE Journal**. v. 43, n. 4, p. 1100-1107, 1997.
- KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. **Chemical Engineering Science AIChE Journal**. v. 53, n. 5, p. 891-898, 1998.
- MENTER, F. R. Two-equation eddy-viscosity turbulence models for engineering applications. **AAIA Journal**. v. 32, n. 8, p. 1598-1604, 1994.
- MILLER, J.; ROGOWSKI, M.; KELLY, W. Using a CFD Model To Understand the Fluid Dynamics Promoting *E. coli* Breakage in a High-Pressure Homogenizer. **Biotechnological Progress**. v. 18, n. 5, p. 1060-1067, 2002.
- MOORE, E. K.; HOARE, M.; DUNNILL, P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, n. 10, p. 764-770, 1990.
- NAKAYAMA, Y. Action of the fluid in the air-micrometer (3<sup>rd</sup> report, characteristics of double-disc nozzle No. 1, in the case of compressibility being ignored). **Bulletin of the JSME**, v. 7, p. 689-707, 1964.
- PATANKAR, S. V. **Numerical Heat Transfer and Fluid Flow**. Ed. Hemisphere Pub. Co., New York, 1980, 197p.
- PHIPPS, L. W. The fragmentation of oil drops in emulsions by a high-pressure homogeniser. **Journal of Applied Physics D: Physics**, v. 8, p. 448-462, 1975.
- STEVENSON, M. J.; CHEN, X. D. Visualization of the Flow Patterns in a High-pressure Homogenizing Valve Using a CFD Package. **Journal of Food Engineering**. v. 33, n. 1/2, p. 151-165, 1997.

## 7 Efeito da Homogeneização a Ultra Alta Pressão (HUAP) na Cor e na Viscosidade de Leite Cru Desnatado

### Resumo

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma técnica alternativa para processamento de alimentos que vai ao encontro da crescente demanda dos consumidores por produtos cujas características aproximem-se das dos produtos frescos. Neste trabalho avaliou-se o efeito do processo na cor ( $L^*a^*b^*$ ) e na viscosidade de amostras de leite cru desnatado. A faixa de pressão estudada foi de 100 a 300 MPa. Os resultados demonstraram que embora as variações nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  detectadas instrumentalmente tenham sido estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na maior parte dos casos testados, visualmente as mesmas são imperceptíveis. Com relação à viscosidade, apenas as amostras processadas a 300 MPa diferiram estatisticamente das demais ( $p < 0,05$ ).

Palavras-chave: homogeneização a ultra alta pressão, leite cru desnatado, cor,  $L^*a^*b^*$ , viscosidade.

## **Ultra High Pressure Homogenization Effect on Color and Viscosity of Raw Skim Milk**

### **Abstract**

Ultra high pressure homogenization is an alternative food processing technique. As product heating is minimum, its characteristics are closer to not processed food. At this work, the effect of ultra high pressure homogenization process on color ( $L^*a^*b^*$ ) and viscosity of raw skim milk was studied. Pressures varied from 100 to 300 MPa. Results showed that although variations on  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  parameters were statistically significant ( $p < 0.05$ ) at the majority of samples analyzed, visually this was not verified. Only viscosity of samples processed at 300 MPa differed in a statistically significant way from the others ( $p < 0.05$ ).

Key-words: Ultra high pressure homogenization, raw sim milk, color,  $L^*a^*b^*$ , viscosity.

## 7.1 Introdução

A crescente preferência dos consumidores por produtos processados com características as mais próximas possíveis dos produtos frescos levou os processadores de alimentos a procurar alternativas de processos não térmicos que combinassem redução eficiente da população microbiana com máxima retenção das propriedades químicas, físico-químicas e sensoriais dos produtos.

O processo de homogeneização a ultra alta pressão é usado na indústria farmacêutica, cosmética, química e de alimentos no preparo ou estabilização de emulsões e suspensões ou para criar alterações físicas, como mudanças de viscosidade nos produtos. Para aplicações que exigem um alto grau de dispersão, pressões acima de 200 MPa estão sendo investigadas. Outra aplicação do processo é a ruptura celular de leveduras ou bactérias para a obtenção de produtos intracelulares, tais como proteínas (WUYTACK et al, 2002). O desenvolvimento de aplicações do processo de homogeneização a alta pressão permitiu ainda a utilização do mesmo como método de preservação, na medida em que causa inativação microbiana (DIELS et al, 2004).

No caso do leite, produto extremamente susceptível a deterioração microbiológica em função das características intrínsecas (pH, atividade de água e composição), o processo de homogeneização a ultra alta pressão é uma alternativa ao processo de pasteurização, na medida em que promove a redução da carga microbiana sem expor o produto a temperaturas elevadas por tempos excessivamente longos (PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI, 2004; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005a; PINHO; FRANCHI; CRISTIANINI 2005b; HAYES; FOX; KELLY, 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do processo de homogeneização a ultra alta pressão na cor e na viscosidade de leite cru desnatado.

## 7.2 Material e Métodos

### 7.2.1 Amostra

Na realização dos ensaios foi utilizado leite cru desnatado ( $0,48 \pm 0,04$  % de gordura) doado pela empresa Malibu situada em Itatiba-SP.

### 7.2.2 Equipamento

O equipamento utilizado foi um homogeneizador contínuo de ultra alta pressão (nG7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra). O mesmo opera com pressões entre 0 e 300 MPa e tem uma vazão de aproximadamente 270 mL/min.

O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Após a passagem pelos pistões, o fluido pressurizado passa por uma válvula de retenção que realiza o desvio do fluido conforme o fluxo de pressurização necessário. O fluido é conduzido para uma válvula de homogeneização, na qual ocorre a expansão adiabática do mesmo, que retorna à pressão ambiente. Imediatamente após esta válvula, o fluido passa por um trocador de calor, com circulação externa de água a temperatura ambiente, de forma que, no final do trocador, atinja uma temperatura próxima à temperatura ambiente.

Para facilitar o processamento, foi acoplado ao homogeneizador um sistema de alimentação composto por duas válvulas de abertura e fechamento, de modo a permitir alternar água e produto. O processo era iniciado utilizando-se água para eliminar o ar do sistema e estabilizar a pressão de processo. Alcançado o regime, a válvula de alimentação foi aberta iniciando-se a alimentação do produto. A estabilização de pressão foi realizada fazendo-se circular água no interior do equipamento para que não houvesse desperdício de amostra. Após 90

segundos da abertura da alimentação de produto foi realizada a coleta da amostra tratada.

O tempo de residência do fluido no interior do equipamento é de cerca de 40 segundos, incluindo o trocador de calor. Padronizou-se a retirada das amostras somente após 90 segundos para garantir que não houvesse nenhum efeito de diluição da amostra devido ao fato da estabilização do equipamento ter sido realizada com água.

O equipamento apresenta três termopares para controle de temperatura, posicionados nos seguintes pontos:

T<sub>1</sub> – Entrada da válvula de homogeneização;

T<sub>2</sub> – Saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor;

T<sub>3</sub> – Saída do trocador de calor.

A função dos termopares era monitorar o produto sendo tratado e certificar-se que a temperatura não influenciou nas eventuais alterações de cor e viscosidade verificadas.

Após a coleta das amostras, o equipamento foi despressurizado e iniciou-se a limpeza da seguinte maneira: inicialmente fez-se circular água destilada por cerca de 20 minutos, a seguir utilizou-se soda 2,5% também por 20 minutos, após o que foi feito enxágüe com água. Após remoção da soda (monitorada pela utilização de papel indicador), o equipamento foi preenchido e permaneceu com etanol 70% até a realização do próximo experimento.

### **7.2.3 Processos Realizados**

O leite cru foi mantido sob refrigeração até a realização dos experimentos. Foram realizados ensaios a 100, 150, 200, 250 e 300 MPa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **7.2.4 Cor**

Amostras de leite cru desnatado antes e após o processo de homogeneização a ultra alta pressão foram analisadas com relação a cor utilizando-se o sistema Cielab ( $L^*a^*b^*$ ). As determinações foram feitas utilizando-se o espectrofotômetro de cor modelo COLORQUEST II da HunterLab disponível no Laboratório de Instrumentação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp. Foram utilizados o iluminante  $D_{65}$  e ângulo de observação de  $10^\circ$ . O modo de calibração foi Reflectância RSIN (especular incluída) e as determinações foram feitas em uma cubeta de 20 mm.

#### **7.2.5 Viscosidade**

A viscosidade das amostras de leite cru desnatado submetidas ao processo de homogeneização a ultra alta pressão nas pressões 100, 150, 200, 250 e 300 MPa foi determinada utilizando-se o viscosímetro Brookfield DV-III Rheometer V3.0 LV com o spindle SC4-18 do Laboratório Geral do Departamento de Ciência de Alimentos da Unicamp. A determinação foi feita variando-se a rotação de 150 a 250 rpm em 5 minutos. Esta faixa foi escolhida de modo a manter o torque sempre superior a 10%. Foi determinada ainda a viscosidade de uma amostra controle, ou seja, uma amostra de leite cru desnatado não submetida ao tratamento. As amostras foram analisadas a  $20^\circ\text{C}$ .

#### **7.2.6 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA 5.0 através de ANOVA e teste de média (Tukey).

### 7.3 Resultados e Discussões

#### 7.3.1 Cor

Os valores obtidos nas análises de cor são apresentados na Tabela 7.1.

Tabela 7.1: Efeito do processo de HUAP nos parâmetros L\*, a\*, b\*

	Pressão (MPa)	Média*	DP	CV (%)
<b>L*</b>	Controle	81,33 <sup>a</sup>	0,26	0,32
	100	81,17 <sup>a</sup>	0,13	0,17
	150	80,64 <sup>b</sup>	0,08	0,10
	200	79,72 <sup>c</sup>	0,25	0,31
	250	79,12 <sup>d</sup>	0,12	0,15
	300	79,17 <sup>d</sup>	0,11	0,13
<b>a*</b>	controle	-3,90 <sup>a,b</sup>	0,04	1,04
	100	-3,86 <sup>a</sup>	0,03	0,79
	150	-3,96 <sup>b</sup>	0,03	0,77
	200	-4,21 <sup>c</sup>	0,02	0,49
	250	-4,47 <sup>d</sup>	0,03	0,56
	300	-4,45 <sup>d</sup>	0,01	0,13
<b>b*</b>	controle	5,05 <sup>a</sup>	0,15	2,92
	100	5,04 <sup>a</sup>	0,10	1,89
	150	4,81 <sup>a,b</sup>	0,32	6,57
	200	4,30 <sup>b,c</sup>	0,39	9,02
	250	4,16 <sup>c</sup>	0,01	0,14
	300	4,06 <sup>c</sup>	0,02	0,51

\* valor médio do parâmetro avaliado obtido em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

Conforme pode ser observado na Tabela 7.1, nos três parâmetros analisados de modo geral quanto maior a pressão de homogeneização aplicada maior foi a diminuição no valor do mesmo. A análise estatística dos dados (Tukey,  $p < 0,05$ ) revelou que não existem diferenças significativas entre a amostra controle

e as amostras processadas a 100 MPa em nenhum dos parâmetros analisados. Já as amostras processadas 250 e 300 MPa não diferiram entre si, mas diferiram das demais também em todos os parâmetros avaliados. Entretanto, as diferenças entre os valores dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  mesmo que estatisticamente significativas, foram muito pequenas, não sendo observadas visualmente. Isto é semelhante ao reportado por Hayes, Fox e Kelly (2005) e pode ser considerado extremamente positivo para uma possível aplicação comercial do processo, já que diferenças pronunciadas na cor do produto poderiam levar à rejeição do mesmo por parte do consumidor.

### 7.3.2 Viscosidade

A Tabela 7.2 apresenta os dados obtidos nos ensaios de determinação da viscosidade.

Tabela 7.2: Efeito do processo de HUAP na viscosidade de leite cru desnatado

Viscosidade (cP)						
Processo	Pressão (MPa)					
	Controle	100	150	200	250	300
1	1,86	1,76	1,73	1,78	1,90	2,26
2	1,89	1,88	1,88	1,95	2,01	2,29
3	1,91	1,93	1,89	1,92	2,05	2,35
<b>Média*</b>	1,89 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	1,83 <sup>b</sup>	1,88 <sup>b</sup>	1,99 <sup>b</sup>	2,30 <sup>a</sup>
<b>DP</b>	0,03	0,09	0,09	0,09	0,08	0,05
<b>CV (%)</b>	1,33	4,71	4,89	4,82	3,91	1,99

\* valor médio do parâmetro avaliado obtido em três ensaios - valores sem letras em comum diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )

Testes estatísticos revelaram que não existem diferenças significativas a um nível de significância de 95% (Tukey,  $p < 0,05$ ) entre a amostra controle (sem processar) e as amostras submetidas ao processo de homogeneização a ultra alta pressão na faixa de pressões de 100 e 250 MPa. Apenas as amostras

processadas a 300 MPa diferiram estatisticamente das demais, sendo que foi observado um ligeiro aumento no valor da viscosidade.

Não foram encontrados na literatura resultados que pudessem ser diretamente comparados com os obtidos neste trabalho.

Lee e Sherbon (2002) avaliaram o efeito da homogeneização (20 MPa) na viscosidade de leite cru integral. Os autores não detectaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostras de leite cru e de leite processado.

Musa e Ramaswamy (1997) avaliaram o efeito da alta pressão hidrostática na faixa de 200 a 400 MPa na viscosidade de leite cru fresco. Os autores verificaram um ligeiro, porém não substancial, aumento da viscosidade na faixa de pressão avaliada.

#### 7.4 Conclusão

O processamento de leite desnatado por homogeneização a ultra alta pressão causou alterações significativas ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , entretanto, estas diferenças não foram perceptíveis visualmente. A viscosidade também praticamente não foi alterada na faixa de pressão estudada (100 a 300 MPa), sendo que apenas nos processos realizados a 300 MPa foi verificado um ligeiro aumento.

#### 7.5 Referências Bibliográficas

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

LEE, S. J.; SHERBON, J. W. Chemical changes in bovine milk fat membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. **Journal of Dairy Research**. v. 69, n. 4, p. 555-567, 2002.

MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S. Ultra High Pressure Pasteurization of Milk: Kinetics of Microbial Destruction and Changes in Physico-Chemical Characteristics. **Lebensmittel-Wissenschaft&-Technologie**. v. 30, n. 6, p. 551-557, 1997.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk. In: **3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**, 2004, Rio de Janeiro. . Book of Abstracts of the 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2004.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Lactobacillus helveticus* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

## CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados apresentados neste trabalho foi possível concluir que:

- O processo de homogeneização a ultra alta pressão foi capaz de causar inativação da carga total de células vegetativas inoculada ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/mL) em leite.
- Pressões da ordem de 200, 250 e 260 MPa foram capazes de inativar a carga inoculada ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/mL) de *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente.
- O processo de homogeneização a ultra alta pressão não foi capaz de causar qualquer redução nas contagens de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em leite desnatado UHT tão pouco de diminuir de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) a resistência térmica dos mesmos.
- Pressões da ordem de 300 MPa não causaram reduções nas contagens de *Clostridium sporogenes*.
- Pressões de até 250 MPa causaram apenas pequenas alterações na atividade enzimática da fosfatase e nos processos a 270 MPa a enzima foi totalmente inativada.
- Em toda a faixa de pressões estudada (100 a 300 MPa) não foi observada inativação total da enzima lactoperoxidase, sendo que a maior redução da atividade da mesma ocorreu a 300 MPa, onde se observou uma redução de 28,48% no valor da atividade enzimática.
- Pressões da ordem de 300 MPa causaram uma redução de 72,50% na atividade da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens*.
- O cálculo dos perfis de velocidade no interior da válvula de homogeneização a ultra alta pressão demonstrou que a máxima velocidade é atingida na saída do

*gap* da válvula, onde foram observadas regiões de cavitação, especialmente a pressões mais elevadas. O máximo valor de velocidade obtido foi 245 m/s nos processos a 300 MPa.

- O processamento de leite cru desnatado por homogeneização a ultra alta pressão causou alterações significativas ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , entretanto, estas diferenças não foram perceptíveis visualmente.
- A viscosidade praticamente não foi alterada na faixa de pressão estudada (100 a 300 MPa), sendo que apenas nos processos realizados a 300 MPa foi verificado um ligeiro aumento.
- A tecnologia de processamento de leite por homogeneização a ultra alta pressão pode ser uma alternativa à indústria de laticínios para aumentar a vida de prateleira durante a estocagem de leite cru anterior a processos de produção de leite UHT, queijos, achocolatados e outros produtos na medida em que diminui consideravelmente as contagens de células vegetativas presentes no mesmo além de reduzir a proteólise devido à ação da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens*.

### **Sugestões para Futuros Estudos**

- Avaliar o efeito da atividade proteolítica da enzima produzida por *Pseudomonas fluorescens* a partir de um método mais preciso do que o utilizado neste estudo.
- Modelar através de CFD o que ocorre na célula do microrganismo no processo (tensão na parede etc) e também o efeito de diferentes formatos de agulha nos perfis de velocidade, pressão e zonas de cavitação.
- Avaliar ainda a transferência de calor que ocorre no interior da válvula.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ABLV – Associação Brasileira do Leite Vida** <www.ablv.org.br> acesso em: 17/10/06.

ADAMS, D. M.; BARACH, J.T.; SPECK, M. L. Heat Resistant Proteases Produced in Milk by Psychrotrophic Bacteria of Dairy Origin. **Journal of Dairy Science**. v. 58, n. 6, p. 828-834, 1975.

ANSYS CFX 10.0 User Manual, 2005.

ALFENAS, R. D. Thermoresistence of acid producing psychrotrophic bacteria isolated from milk. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v. 49, n. 1, p. 72-75, 1999.

ALICHANIDIS, E.; WRATHALL, J.H. M.; ANDREWS, A. T. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen. **Journal of Dairy Research**. v. 53, n. 2, p. 259-269, 1986.

ALPAS, H.; BOZOGLU, F. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, n. 4, p. 387-392, 2000.

BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. **Review: Plasmin in milk and dairy products**: an update – International Dairy Journal, v. 6, n. 5, p.435-457, 1996.

BERNARDO, S. **Estudo dos Escoamentos Gasoso e Gás-Sólido em Ciclones pela Aplicação de Técnicas de Fluidodinâmica Computacional**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

BRASIL. Portaria nº307, de 4 de setembro de 1997. Estabelece padrões de identidade e qualidade para o leite UHT/UAT. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 4 set. 1997.

CAMARGO, L.M.Q. **Uso de um sistema indicador biológico na avaliação do valor de esterilização aplicado a purê de cenoura processado em retorta rotativa**. Tese de Mestrado. – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.

CAMPOS, F.P. **Estudo do Processamento de Suco de Laranja através da Tecnologia de Homogeneização a Ultra Alta Pressão**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

CASADEI, M. A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J. E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**. v. 63, n. 1/2, p. 125-134, 2001.

CHÁVARRI, F.; SANTISTEBAN, M.; VIRTO, M.; RENOBALLES, M. Alkaline Phosphatase, Acid Phosphatase, Lactoperoxidase, and Lipoprotein Lipase Activities in Industrial Ewe's Milk and Cheese. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, n. 8, p. 2926-2932, 1998.

CHEFTEL, J.C. **Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation** – Food Science and Technology International, 1(2/3):75—0,1995.

CLAEYS, W. L.; LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation, and of  $\beta$ -lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 4, p. 541-553, 2002.

**CNPGL – Embrapa Gado de Leite** <[www.cnpgl.embrapa.br](http://www.cnpgl.embrapa.br)> acesso em: 17/10/06.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A review. **Journal of Food Protection**. v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

CRAWFORD, Y. J.; MURANO, E. A.; OLSON, D. G.; SHENOY, K. Use of High Hydrostatic Pressure and Irradiation To Eliminate *Clostridium sporogenes* Spores in Chicken Breast. **Journal of Food Protection** v.59, n. 7, p. 711-715, 1996.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

DATTA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenization on milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 393-399, 2005.

DEETH, H. C.; DATTA, N. Alternative technologies for producing sterile low acid food products. **Food Australia**. v. 54, n. 7, p. 273-277, 2002.

DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E. Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnological Progress**. v. 20, n. 5, p. 1512-1517, 2004.

DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Inactivation rates of polyphenoloxidase and peroxidase from coconut water processed by high pressure homogenization. In: **IFT ANNUAL MEETING**, 2003, Chicago, Illinois (USA) : Institute of Food Technologists. p. 237-237.

DOULAH, M. S.; HAMMOND, T. H.; BROOKMAN, J. S. G. A Hydrodynamic Mechanism for the Disintegration of *Saccharomyces cerevesiae* in an Industrial Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 6, p. 845-858, 1975.

ENGLER, C. R.; ROBINSON, C. W. Disruption of *Candida utilis* Cells in High Pressure Flow Devices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 4, p. 765-780, 1981.

ERTUGAY, M. F.; YUKSEL, Y.; SENGUL, M. The effect of ultrasound on lactoperoxidase and alkaline phosphatase enzymes from milk. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 11/12, p. 593-595, 2003.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**. v. 53, n. 1, p. 139-177, 1986.

FAIRCHILD, T. M.; FOEGEDING, P. M. A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytoges* Proteinases. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 4, p. 1247-1250, 1993.

FAJARDO-LIRA, C.; NIELSEN, S. S. Effects of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**. v.81, n. 4, p. 901-908, 1998.

FAJARDO-LIRA, C.; HAYES, M. O. K. D.; NIELSEN, S. S. Effects of Psychrotrophic Bacteria and of an Isolated Protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the Plasmin System of Fresh Milk. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 10, p. 2190-2199, 2000.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.LANCIOTTI, R; MEDICI, A; PEDRINI, P; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 7, n. 10, p. 2879-2887, 1996.

FEEHERRY, F. E.; MUNSEY, D.; ROWLEY, D. B. Thermal Inactivation and Injury of *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 365-370, 1987.

FERNANDEZ, P. S.; OCIO, M. J.; MARTINEZ, A. Relation between thermal resistance and DPA content in variants of the same strains of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Letters in Applied Microbiology**. v. 19, n. 2, p. 118-120, 1994.

FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. **Chemical Engineering Science**. v. 59, n. 4, p. 843-853, 2004.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1ed. Editora Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.

FURUKAWA, S.; NAKAHARA, A.; HAYAKAWA, I. Effect of reciprocal pressurization on germination and killing of bacterial spores. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 35, n. 5, p. 529-532, 2000.

FURUKAWA, S.; HAYAKAWA, I. Effect of Temperature on the Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 Spores by Low Hydrostatic Pressure Treatment. **Biocontrol Science**. v. 6, n. 1, p. 33-36, 2001.

FURUKAWA, S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 5, p. 836-841, 2003.

GAO, Y. L.; JIANG, H. H. Optimization of process conditions to inactivate *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and mild heat using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 24, n. 1, p. 43-48, 2005.

GARCIA-RISCO, M.R.; CORTÉS, E.; CARRASCOSA, V.; LÓPEZ-FANDINO. **Microbiological and Chemical Changes in High-Pressure-Treated Milk during Refrigerated Storage** – Food of Journal Protection, v. 61, n. 6, p. 735-737, 1998.

GASPARINO FILHO, J; AGUIRRE, J. M. **Desidratação de frutas e hortaliças**. Manual técnico, ITAL, Campinas, 2001.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 1, p. 33-37, 1997.

GERVILLA, R.; FELIPE, X.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. **Journal of Dairy Science**. v. 80, n. 10, p. 2297-2303, 1997.

GERVILLA, R.; MOR-MUR, M.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated into ewe's milk by high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**. v. 16, n. 2, p. 173-184, 1999.

GERVILLA, R.; SENDRA, E.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* inoculated into ewe's milk to high hydrostatic pressure. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 6, p. 1099-1107, 1999.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "longa vida"**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.

GOULD, G. W. Inactivation of Spores in Food by Combined Heat and Hydrostatic Pressure. **Acta Alimentaria**. v. 2, n. 4, p. 377-383, 1973.

GRISCHY, R. O.; SPECK, R. V.; ADAMS, D. M. New Media for Enumeration and Detection of *Clostridium sporogenes* (PA3679) Spores. **Journal of Food Science**. v. 48, n. 5, p. 1466-1469, 1983.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

HAYAKAWA, I.; KANNO, T.; TOMITA, M.; FUJIO, Y. Application of High Pressure for Spore Inactivation and Protein Denaturation. **Journal of Food Science**. v. 59, n. 1, p. 159-163, 1994.

HAYAKAWA, I. et al. Mechanism of inactivation of heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilis* IFO 12550 by rapid decompression. **Journal of Food Science**. v. 63, n. 3, p. 371-374, 1998.

HAYES, P. R. D. **Food Microbiology and Higiene**. 2º ed. Editora Chapman & Hall, 1996. 578p.

HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. Plasmin Levels in Fresh Milk Whey and Commercial Whey Protein Products. **Journal of Dairy Science**. v.83, n. 3, p. 387-394, 2000.

HAYES, K. D.; WERE, L. M.; NIELSEN, S. S. Stimulation of bovine plasminogen activator by a protease isolated from *Pseudomonas fluorescens* M3/6. Paper 68-4, **Institute of Food Technologists' Annual Meeting**, New Orleans, LA, 2001.

HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. **Journal of Dairy Research**. v. 70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HAYES, M. G.; LEFRANCOIS, D. S.; WALDRON, D. S.; GOFF, H. D.; KELLY, A. L. Influence of high pressure homogenisation on some characteristics of ice cream. **Milchwissenschaft**. v. 58, n. 9/10, p. 519-523, 2003.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potencial applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**. v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

HEIJI, W. B. C.; SCHEPDAEL, L. J. M. M.; MOEZELAAR, R.; HOOGLAND, H; MATSER, A. M.; BERG, W. High-Pressure Sterilization: Maximizing the Benefits of Adiabatic Heating. **Food Technology**. v. 57, n. 3, p. 37-41, 2003.

HENDRICKX, M.; LUDI KHUYZE, L.; VAN den BROECK, I; WEEMAS, C. **Effects of High pressure on enzymes related to food quality (review)**. Trends in Food Science and Technology, v. 9, n. 5, p. 197-203, 1998.

HOLSCHUH, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L)**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

HOOVER, D.G; METRICK, C; PAPINEAU, A.M; FARKAS, D.F; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. **Food Technology**. v. 43, n. 3, p. 99-106, 1989.

HOOVER, D. G. Pressure effects on Biological Systems. **Food technology**. v. 47, n. 6, p. 150-154, 1993.

ITO, A. K. Thermophilic Organisms in Food Spoilage: Flat-Sour Aerobes. **Journal of Food Protection**. v. 44, n. 2, p. 157-163, 1981.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ed. Zaragoza, 1994. 804p.

KESSLER, H. G. **Food Engineering and Dairy Technology**. 1981, 654p.

KHEADR, E. E.; VACHON, J. F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** v.12, n. 5, p.435-446, 2002.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. The correlation of cell disruption with homogeniser valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. **Chemical Engineering Science**. v. 51, n. 23, p. 5103-5110, 1996.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. Numerical and experimental study of a homogeniser impinging jet. **AIChE Journal**. v. 43, n. 4, p. 1100-1107, 1997.

KLEINIG, A. R.; MIDDLEBERG, A. P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. **Chemical Engineering Science AIChE Journal**. v. 53, n. 5, p. 891-898, 1998.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. v. 18, n. 6, p. 319-322,1994.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F; SINIGAGLIA, M; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**. v. 22, n. 2, p. 165-168,1996.

LECHOWICH, R. V. Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method. **Food Technology**. v. 47, n. 6, p. 170-172, 1993.

LEE, S. Y.; DOUGHERTY, R. H.; KANG, D. H. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores in Apple Juice. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 4158-4161, 2002.

LEE, S. J.; SHERBON, J. W. Chemical changes in bovine milk fat membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. **Journal of Dairy Research**. v. 69, n. 4, p. 555-567, 2002.

LOPEZ FANDINO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science** . v. 79, n. 6, p. 929-936, 1996.

LÓPEZ-PEDEMONTE, T. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B. Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n. 10, p. 3075-3081, 2003.

LU, D. D.; NIELSEN, S. Heat inactivation of native plasminogen activators in bovine milk. **Journal of Food Science**. v. 58, n. 5, p. 1010-1016, 1993.

LUDI KHUYZE, L.; CLAEYS, W.; HENDRICKX, M. Combined Pressure-temperature Inactivation of Alkaline Phosphatase in Bovine Milk: A Kinetic Study. **Journal of Food Science**. v. 65, n. 1, p. 155-160, 2000.

MAGGI, A.; GOLA, S.; ROVERE, P.; MIGLIOLI, L.; DALL'AGLIO, G.; LONNEBORG, N. G. Effects of combined high pressure-temperature treatments on *Clostridium sporogenes* spores in liquid media. **Industria Conserve**. v. 71, n. 1, p. 8-14, 1996.

MALISKA, C. R. **Transferência de Calor e Mecânica dos Fluidos Computacional**. 1ed. Editora LTC – Livros Técnicos e Científicos, 1995. 424p.

MARGOSCH, D.; EHRMANN, M. A.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and other Endospores in Mashed Carrots. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 11, p. 2530-2537, 2004.

MENTER, F. R. Two-equation eddy-viscosity turbulence models for engineering applications. **AAIA Journal**. v. 32, n. 8, p. 1598-1604, 1994.

MERMELSTEIN, N. H. High-Pressure Pasteurization of Juice. **Food Technology**. v. 53, n. 4, p. 86-95, 1999.

MILLER, J.; ROGOWSKI, M.; KELLY, W. Using a CFD Model To Understand the Fluid Dynamics Promoting *E. coli* Breakage in a High-Pressure Homogenizer. **Biotechnological Progress**. v. 18, n. 5, p. 1060-1067, 2002.

MILLS, G.; EARNSHAW, R.; PATTERSON, M. F. Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 227-230, 1998.

MOERMAN, F.; MERTENS, B.; DEMEY, L.; HUYGHEBAERT, A. Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. **Meat Science**. v. 59, n. 2, p. 115-125, 2001.

MOERMAN, F. High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. **Meat Science**. v. 69, n. 2, p. 225-232, 2005.

MOORE, E. K.; HOARE, M.; DUNNILL, P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 12, n. 10, p. 764-770, 1990.

MOSTERT, J. F.; LÜCK, H.; HURMANN, R. A. Isolation, identification e practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. **South Africa Journal of Dairy Technology**. v. 211, n. 3, p. 125-132, 1979.

MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S. Ultra High Pressure Pasteurization of Milk: Kinetics of Microbial Destruction and Changes in Physico-Chemical Characteristics. **Lebensmittel-Wissenschaft&-Technologie**. v. 30, n. 6, p. 551-557, 1997.

NAKAYAMA, Y. Action of the fluid in the air-micrometer (3<sup>rd</sup> report, characteristics of double-disc nozzle No. 1, in the case of compressibility being ignores. **Bulletin of the JSME**, v. 7, p. 689-707, 1964.

NAKAZATO, L. **Influência de Palmitato de Sacarose sobre o desenvolvimento de *B. stearothermophilus* em extrato de café** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in milk: characteristics, Roles, And Relationship. **Journal of Agricultural and Chemistry**. v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

OPTSAL, I. V.; BAGAMBOULA, C. F.; VANMUYSEN, S. C. M.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. **International Journal of Food Microbiology**. v. 92, n. 2, p. 227-234, 2004.

PATANKAR, S. V. **Numerical Heat Transfer and Fluid Flow**. Ed. Hemisphere Pub. Co., New York, 1980, 197p.

PATANKAR, S. V.; SPALDING, D. B. A Calculation Procedure for Heat, Mass and Momentum Transfer in 3D Parabolic Flows. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 15, n. 10, p.1787-1806, 1972.

PATANKAR, S. V. A Calculation Procedure for 2D Elliptic Situations Heat, Mass and Momentum Transfer in 3D Parabolic Flows. **Numerical Heat Transfer**, v. 4, n. 4, p.409-425, 1981.

PATTERSON, M. F.; QUINN, M.; SIMPSON, R.; GILMOUR, A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. High-Pressure. **Journal of Food Protection**. v. 58, n. 5, p. 524-529, 1995.

PETRUS, R. R. **Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

PFLUG, I. J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**. Seventh Edition, Minneapolis, 1990.

PHIPPS, L. W. The fragmentation of oil drops in emulsions by a high-pressure homogeniser. **Journal of Applied Physics D: Physics**, v. 8, p. 448-462, 1975.

PINHO, C. R. G. **Modelamento matemático do processo de esterilização de alimentos condutivos em embalagem de vidro**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk. In: **3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**, 2004, Rio de Janeiro. . Book of Abstracts of the 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2004.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Lactobacillus helveticus* in skim milk. In: **VI Slaca**, Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2005, Campinas.

POPPER, L; KNORR, D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**. v. 44, n. 7, p. 84-89, 1990.

PRATA, L. F. **Espectrofotometria de Absorção na região ultravioleta para detecção de atividade proteolítica em leite e derivados**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1991.

REDDY, N. R.; SOLOMON, H. M.; TETZLOFF, R. C.; RHODEHAMEL, E. J. Inactivation of *Clostridium botulinum* Type A Spores by High-Pressure Processing at Elevated Temperatures. **Journal of Food Protection**. v. 66, n.8, p. 1402-1407, 2003.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 15th Ed., 1985. 412p.

RITZ, M.; FREULET, M.; ORANGE, N.; FEDERIGHI, M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 55, n.1/3, p. 115-119, 2000.

ROBERTS, C. M.; HOOVER, D. G. Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 81, n. 4, p. 363-368, 1996.

RODRIGUEZ, A. C.; LARKIN, J. W.; DUNN, J.; PATAZCA, E.; REDDY, N. R.; ALVAREZ-MEDINA, M.; TETZLOFF, R.; FLEISCHMAN, G. J. Model of Inactivation of Bacterial Spores by Moist Heat and High Pressure. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. 367-373, 2004.

SENOCC D.; DUPONT D.; ROLET-REPECAUD O., et al. ELISA for monitoring the cleavage of beta-casein at site Lys(28)-Lys(29) by plasmin during Comte cheese ripening. **Journal of Dairy Research**. v. 69, n. 3, p. 491-500, AUG 2002.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**. v.49, n. 8, p. 432-437, 1994.

SIMPSON, R. K.; GILMOUR, A. The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. **Food Microbiology**. v. 14, n. 6, p. 567-573, 1997.

SIZER, C. E.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; TING, E. Validation High-Pressure Processes for Low-Acid Foods. **Food Technology**. v. 56, n. 2, p. 36-42, 2002.

STEVENSON, M. J.; CHEN, X. D. Visualization of the Flow Patterns in a High-pressure Homogenizing Valve Using a CFD Package. **Journal of Food Engineering**. v. 33, n. 1/2, p. 151-165, 1997.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. Academic Press Inc. New York, N. Y., 1973. 263p.

TEUBER, M.; BUSSE, M. Microbial aspects. **FIL/IDF Bulletin**, n. 133, cap. 1, p. 5-9. 1981.

THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTAL, J. C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 427-439, 2003.

TOMASULA, P. M.; KONSTANCE, R. P. The Survival of Foot-and-Mouth Disease Vírus and Pasteurized Milk and Milk Products. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n. 4, p. 1115-1121, 2004.

TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 3, n. 4, p. 295-307, 2002.

VANNINI, L.; LANCIOTTI, R.; BALDI, D.; GUERZONI, M. E. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 2, p.123-135, 2004.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and Milk Products – Technology, Chemistry and Microbiology**. Chapman & Hall. London, 1996, 451p.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Effect of Coagulants, Somatic Cell Enzymes, and Extracellular Bacterial Enzymes on Plasminogen Activation. **Journal of Dairy Science**. v. 74, n. 3, p.772-782, 1991.

VON BOCKELMANN, B. Sterilizing efficiency. **Long Life Products – from raw materials to finished products**, Tetra Pak, p.21-23, 1998, 68p.

WUYTACK, E. Y.; BOVEN, S.; MICHIELS, C. W. Comparative Study of Pressure-Induced Germination of *Bacillus subtilis* Spores at Low and High Pressures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 9, p. 3220-3224, 1998.

WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, n. 3, p. 333-341, 2001.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A. M. J.; MICHIELS, C. W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

WUYTACK, E. Y.; PHUONG, L. D. T.; AERTSEN, A. et al. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 1, p. 31-37, 2003.

ZACARCHENCO, P. B. **Aperfeiçoamento da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans* e sua ocorrência em leite UAT/UHT.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

ZAPICO, P.; PAZ, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua* **International Journal of Food Microbiology** .v. 46, n. 2, p. 151-157, 1999.