

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PASTEURIZAÇÃO DE
LEITE DE BÚFALA**

GUSTAVO GREGORY

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Domeneghini Mercali

Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre

Dezembro/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PASTEURIZAÇÃO DE LEITE DE BÚFALA

Gustavo Gregory

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana
Domeneghini Mercali

Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda de
Souza da Motta

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Dezembro/2019

Trabalho de Conclusão de Curso

**CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PASTEURIZAÇÃO DE
LEITE DE BÚFALA**

Gustavo Gregory

Aprovado em: __/__/____

Profa. Giovana Domeneghini Mercali
(Orientadora)

Doutora em Engenharia Química/UFRGS

Profa. Amanda de Souza da Motta
(Co-orientadora)

Doutora em Ciências Veterinárias/UFRGS

Profa. Jordana Corralo Spada
Doutora em Engenharia Química/UFRGS

Profa. Márcia Monks Jantzen
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial/INIA(ES)

CIP - Catalogação na Publicação

Gregory, Gustavo

CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PASTEURIZAÇÃO DE LEITE DE
BÚFALA / Gustavo Gregory. -- 2019.

72 f.

Orientadoras: Giovana Domeneghini Mercali, Amanda
De Souza da Motta.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curso de
Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Fosfatase alcalina. 2. Leite bubalino. 3.
Pasteurização. I. Domeneghini Mercali, Giovana,
orient. II. De Souza da Motta, Amanda, orient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, minha saúde, e por me lembrar de que a construção de um mundo melhor começa por mim.

Aos meus pais, que sempre foram meu maior exemplo, e que me ensinaram a buscar não o caminho mais fácil, mas sim aquele que leva ao lugar certo; que me inspiram a pisar firme e olhar para a frente; que sempre me protegeram e que sempre protegerei.

À minha irmã, que me apresentou a essa Universidade, que torna minha casa lar, que me lembra a cada dia como a vida é leve e uma benção, e cujo sorriso encurta distâncias até maiores que um oceano.

Ao meu irmão, que a Universidade me proporcionou, e que a vida há de manter por perto, e que não me deixa esquecer que somos muito mais que personagens de uma Divina Comédia; somos autores de nossa própria Odisseia.

Aos meus demais familiares, dos quais me orgulho muito e que espero da mesma forma orgulhar, e que são prova de que a eventual distância física não é impeditiva de um apoio incondicional, mútuo e fraterno.

Às amizades que construí ao longo dessa caminhada, seja na sala de aula, seja na mesa de bar, seja na beira da praia, seja no fim de festa, seja no Acre ou na França. Vocês me permitiram ser inspirado e inspirar, ouvir e ser ouvido, olhar para fora e olhar para dentro, e ser grato a cada dia por compartilhar momentos tão felizes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo serviço de qualidade prestado, e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela infraestrutura laboratorial que me proporcionou oportunidades e aprendizados únicos. Ao CNPq, à CAPES e ao MEC pelo auxílio financeiro durante anos de iniciação científica.

A minhas orientadoras, que foram referência do profissional que almejo me tornar, mostrando-me que a pesquisa vai muito além do laboratório, e contribuindo com conselhos que carregarei por toda a vida.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de contribuir com este trabalho através de seus conhecimentos.

CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PASTEURIZAÇÃO DE LEITE DE BÚFALA

Autor: Gustavo Gregory

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Domeneghini Mercali

Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

RESUMO

O leite bubalino apresenta diversas características particulares, incluindo seu alto teor de gordura e proteínas e maiores diâmetros dos glóbulos de gordura e das micelas de caseína em comparação ao leite bovino, que podem influenciar na resistência térmica de suas enzimas e de sua microbiota. O presente trabalho teve como objetivo verificar se a fosfatase alcalina constitui um indicador seguro da eficiência da pasteurização no leite de búfala, e se esse processo permite a obtenção de um leite inócuo ao consumidor. Para tanto, determinou-se a cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina em leites bovino e bubalino sob diferentes temperaturas (62, 65, 68, 72 e 75 °C). Os resultados obtidos foram complementados com experimentos de inativação microbiana, realizados para o leite bubalino submetido a pasteurização LTLT (62 °C/30 min), tanto em relação a sua microbiota autóctone quanto para microrganismos inoculados individualmente em leite esterilizado (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). Os dados de inativação da fosfatase alcalina foram adequadamente ajustados ao modelo cinético de primeira ordem. Os valores de *D* obtidos para a enzima no leite bubalino foram significativamente superiores em relação ao leite bovino apenas para 62 °C e 65°C; o valor de *z* da enzima no leite bubalino ($6,58 \pm 0,01$ °C) foi significativamente inferior ao do leite bovino ($7,22 \pm 0,12$ °C). Os valores obtidos sugerem que há mecanismos particulares de resistência térmica na inativação da fosfatase alcalina em leite bubalino em baixas temperaturas de pasteurização. Observou-se que o binômio limítrofe de subpasteurização testado (62 °C/30 min) foi suficiente para garantir um produto final em conformidade com a normativa brasileira; no entanto, essas condições não foram capazes de reduzir as contagens das bactérias inoculadas em cinco ciclos logarítmicos (valores de $\Delta \log$ UFC/mL variaram entre 3,21 e 4,62), sugerindo que esse tratamento pode não ser capaz de garantir a inocuidade do leite bubalino quando este for obtido sob condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Palavras-chave: Fosfatase alcalina; Leite bubalino; Pasteurização.

INACTIVATION KINETICS OF ALKALINE PHOSPHATASE AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT IN BUFFALO MILK PASTEURIZATION

Author: Gustavo Gregory

Advisor: Profa. Dra. Giovana Domeneghini Mercali

Co-advisor: Profa. Dra. Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Buffalo milk has several particular characteristics, including high fat and protein content and larger diameters of fat globules and casein micelles compared to bovine milk, which may influence the thermal resistance of its enzymes and microbiota. The present work aimed to verify if alkaline phosphatase is a safe indicator of pasteurization efficiency in buffalo milk, and if this process allows to obtain milk innocuous to the consumer. To this end, the inactivation kinetics of the alkaline phosphatase enzyme in bovine and buffalo milk under different temperatures (62, 65, 68, 72 and 75 °C) were determined. The results obtained were supplemented by microbial inactivation experiments performed for LTLT pasteurized buffalo milk (62 °C/30 min), both for native microbiota and for microorganisms individually inoculated in sterile milk (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). Alkaline phosphatase inactivation data were appropriately adjusted to the first order kinetic model. The *D* values obtained for the enzyme in buffalo milk were significantly higher than bovine milk only at 62 °C and 65 °C; the *z* value of the enzyme in buffalo milk (6.58 ± 0.01 °C) was significantly lower than in bovine milk (7.22 ± 0.12 °C). The obtained values suggest that there are particular mechanisms of thermal resistance in the inactivation of alkaline phosphatase in buffalo milk at low pasteurization temperatures. It was observed that the tested borderline subpasteurization binomial (62 °C / 30 min) was sufficient to guarantee a final product in accordance with Brazilian regulations; however, these conditions were not able to reduce inoculated bacterial counts by five logarithmic cycles ($\Delta \log$ CFU / mL values ranged from 3.21 to 4.62), suggesting that this treatment may not be able to guarantee the safety of buffalo milk when it is obtained under inadequate hygienic-sanitary conditions.

Keywords: Alkaline phosphatase; Buffalo milk; Pasteurization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes do leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB).....	7
Tabela 2. Composição físico-química de leite de búfala (LB) e de vaca (LV) de diferentes estados do Brasil: Rio Grande do Sul (RS); Rio Grande do Norte (RN); São Paulo (SP). Resultados para LB expressos na forma média \pm desvio padrão; resultados para LV expressos na forma de [MIN,MÁX].....	9
Tabela 3. Binômios de tempo-temperatura preconizados pelo governo estadunidense para a pasteurização de leite.	12
Tabela 4. Valores de <i>D</i> e <i>z</i> para a fosfatase alcalina do leite de vaca segundo diferentes autores.....	18
Tabela 5. Tempos e temperaturas para coleta de amostras para as curvas cinéticas.	21
Tabela 6. Valores de <i>D</i> para a fosfatase alcalina em função da temperatura (62 °C, 65 °C, 68 °C, 72 °C e 75 °C) para leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB) e os coeficientes de avaliação da qualidade do ajuste do modelo.....	30
Tabela 7. Valores de <i>z</i> para leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB) e coeficientes de avaliação da qualidade do ajuste do modelo.....	31
Tabela 8. Contagens bacterianas no leite de búfala <i>in natura</i> (LBI) antes (0 min) e após (30 min) a pasteurização. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ..	37
Tabela 9. Análises microbiológicas do leite de búfala esterilizado inoculado (LBE) com bactérias indicadoras antes (0 min) e após (30 min) a pasteurização. Resultados expressos em média \pm desvio padrão ..	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparação entre a legislação estadual paulista para leite bubalino, e as legislações brasileira, estadunidense e europeia para leite em geral..	13
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da produção anual global, em milhões de toneladas, de leites de diferentes espécies, entre 1983 e 2013..	5
Figura 2. Contribuição das cinco principais espécies para a produção mundial de leite em 2017. Produção mundial total: 827 884 303 toneladas.	5
Figura 3. Mecanismo básico da reação química do teste de Aschaffenburg & Müllen para quantificação da atividade da fosfatase alcalina.	15
Figura 4. Tubos capilares de vidro utilizados no presente estudo.	20
Figura 5. Curva padrão de absorvância do pNP.	22
Figura 6. Atividade relativa (A/A_0) da fosfatase alcalina para leite bovino e bubalino ao longo do tempo em condições isotérmicas: (a) 62 °C, (b) 65 °C, (c) 68 °C, (d) 74 °C e (e) 75 °C.	29
Figura 7. Comparação entre os valores de D para leite bovino e bubalino em diferentes temperaturas*	31
Figura 8. Perfis de temperatura representativos das amostras ($T_{amostra}$) e dos banhos termostáticos (T_{banho}) para leite bubalino <i>in natura</i> (a) e leite bubalino esterilizado inoculado com <i>Listeria monocytogenes</i> (b) para o binômio (62 °C/30 min).	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A&M	Aschaffenburg e Mullen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
GGT	Gama glutamil transferase
HTST	<i>High temperature-short time</i>
LB	Leite de búfala
LBI	Leite de búfala <i>in natura</i>
LBE	Leite de búfala esterilizado inoculado
LTLT	<i>Low temperature-long time</i>
LV	Leite de vaca
MFGM	<i>Milk fat globule membrane</i>
NMP	Número Mais Provável
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
RAPD-PCR	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Leite de búfala	4
3.1.1. Parâmetros físico-químicos	6
3.1.2. Parâmetros microbiológicos.....	9
3.2. Pasteurização	10
3.3. Fosfatase alcalina	13
3.3.1. Modelos para predição da cinética de inativação da fosfatase alcalina.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Matérias-primas	19
4.2. Cinética de inativação da fosfatase alcalina	19
4.2.1. Determinação da atividade da fosfatase alcalina.....	21
4.2.2. Modelagem da cinética de inativação da fosfatase alcalina	22
4.3. Avaliação microbiológica	22
4.3.1. Avaliação do efeito de pasteurização LTLT na microbiota autóctone do leite bubalino <i>in natura</i>	23
4.3.1.1. <i>Análises microbiológicas</i>	23
4.3.2. Avaliação do efeito de pasteurização LTLT utilizando microrganismos indicadores em leite bubalino.....	24
4.3.2.1. <i>Inoculação de microrganismos indicadores</i>	24
4.3.2.2. <i>Tratamentos térmicos</i>	25
4.3.3. Contagens bacterianas de microrganismos indicadores	25
4.4. Análise dos dados	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Cinética de inativação da fosfatase alcalina	27
5.2. Avaliação microbiológica de pasteurização LTLT no leite bubalino	35
5.2.1. Avaliação da microbiota autóctone	37
5.2.2. Avaliação utilizando microrganismos indicadores.....	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
8. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Em um contexto de aumento da população global e da demanda global por alimentos, dentre os quais se destacam leite e derivados, a diversificação de rebanhos leiteiros representa um caminho promissor para garantir maior segurança econômica ao produtor, além de maior variedade e qualidade de produtos disponíveis no mercado. O leite de búfala (*Bubalus bubalis*) responde atualmente por 14,5% da produção mundial de leite, sendo o segundo mais consumido no mundo, reputado pelo alto rendimento que oferece no processamento de lácteos e por sua importância para diversas culturas tradicionais (ANDRADE et al, 2011; FAOSTAT, 2019).

O leite bubalino apresenta diversas características particulares, destacadamente seu alto teor de gordura e proteínas e os maiores diâmetros dos glóbulos de gordura e das micelas de caseína em comparação ao leite bovino; tais particularidades impactam significativamente seu processamento em termos de rendimento, estabilidade e vida útil (TSAKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016). Se por um lado, isso permite a obtenção de produtos únicos e de alta qualidade, por outro exige um monitoramento redobrado das condições higiênico-sanitárias do produto (MULINARI; ROSOLEN; ADAMI, 2017). Dessa forma, torna-se imprescindível uma caracterização aprofundada do comportamento do leite bubalino frente ao processamento, sobretudo do ponto de vista de segurança de alimentos.

A pasteurização do leite constitui uma etapa crítica na garantia da segurança do produto final, sendo responsável pela eliminação de microrganismos patogênicos não esporulados e pela redução significativa da microbiota deteriorante (TONDO; BARTZ, 2011). Binômios comuns utilizados na pasteurização do leite bovino incluem 62-65 °C/30 min (LTLT) e 72-75 °C/15 s (HTST) (BRASIL, 2017b). Para avaliar a eficiência da pasteurização, a fosfatase alcalina é amplamente utilizada como enzima indicadora, visto apresentar uma resistência térmica ligeiramente superior aos principais patógenos encontrados no leite (RANKIN et al., 2010).

Embora haja evidências de que matérias-primas com diferenças composicionais, como por exemplo, distintos teores de lipídeos, possam apresentar suscetibilidade diferente à inativação bacteriana em tratamentos térmicos (POTTER; HOTCHKISS, 2012), atualmente não há padrões sanitários definidos especificamente para leite de búfala no Rio Grande do Sul, sendo utilizados os

binômios e indicadores definidos para o leite bovino. Faz-se necessário, portanto, verificar se tais binômios e indicadores apresentam efetividade equivalente para essa matéria-prima.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a fosfatase alcalina constitui um indicador seguro da eficiência da pasteurização no leite de búfala e se esse processo permite a obtenção de um leite inócuo ao consumidor. Para tanto, determinou-se a cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina em leite de búfala, em comparação ao leite de vaca, e validou-se microbiologicamente os resultados obtidos por meio de testes utilizando a microbiota autóctone e microrganismos indicadores.

A investigação das propriedades do leite bubalino pode proporcionar melhorias da qualidade do leite e seus derivados e subsidiar o desenvolvimento de legislações específicas, fomentando a diversificação da oferta de produtos e sua melhor integração ao mercado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a cinética de inativação da enzima indicadora fosfatase alcalina em leites bovino e bubalino sob diferentes temperaturas, e avaliar sua validade como indicadora de inocuidade microbiana no leite de búfala.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- obter curvas de inativação da enzima fosfatase alcalina sob diferentes temperaturas, em leites bovino e bubalino;
- modelar a cinética de inativação da enzima fosfatase alcalina para predição do comportamento da enzima durante processos de pasteurização;
- comparar os parâmetros cinéticos de inativação da fosfatase alcalina em leite de búfala e leite de vaca;
- quantificar a microbiota autóctone no leite de búfala cru e pasteurizado;
- avaliar a inativação de bactérias patogênicas e deteriorantes inoculadas em leite de búfala;
- discutir a validade da fosfatase alcalina como indicador de efetividade do processo de pasteurização em leite bubalino.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo estão sendo abordados aspectos relacionados ao leite de búfala, seu cenário de produção, aspectos de sua composição e microbiota, destacando suas peculiaridades em contraponto ao leite de vaca. Também está sendo abordado o estado da técnica em pasteurização de leite, legislações pertinentes e parâmetros de validação. Especial foco é dedicado à enzima fosfatase alcalina, sua utilização como indicador indireto da eficiência de pasteurização, e métodos de quantificação de sua atividade. Por fim, são abordados modelos para predição da inativação enzimática, suas vantagens e desvantagens.

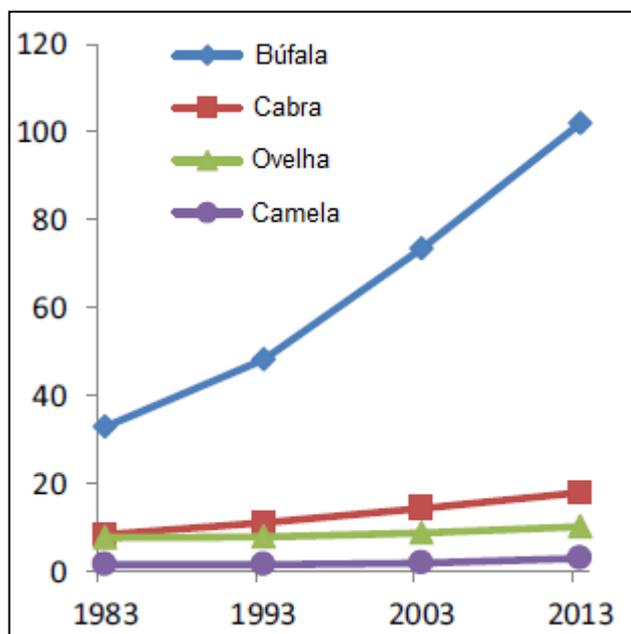
3.1. Leite de búfala

O leite de búfala (LB) representa uma alternativa de interesse ao leite de vaca (LV), possuindo alto valor nutricional e grande potencial tecnológico, notadamente na produção de derivados de alto valor agregado (ANDRIGHETTO, 2011). Seu elevado teor de proteínas, lipídeos e minerais garante um rendimento 40-50% maior na produção de derivados, em comparação ao leite bovino (ANDRADE et al., 2011; GAUCHERON, 2011), e a formação de um coágulo mais firme, de especial interesse na produção de queijos, como o muçarela e o *paneer* (ARORA; KHETRA, 2017).

A produção de leite bubalino contribui também para a segurança alimentar mundial, devido à capacidade de adaptação da espécie a diferentes ecossistemas (VERGARA et al., 2010), incluindo regiões alagadas e tropicais. Além disso, a espécie possui capacidade de produzir leite a partir de matérias-primas de baixo valor nutritivo, apresenta alta resistência a doenças (ZIA-HUL-HASSAN et al., 2011), alta longevidade e versatilidade, podendo também ser utilizada como animal de carga, transporte, tração e abate (TSAKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016).

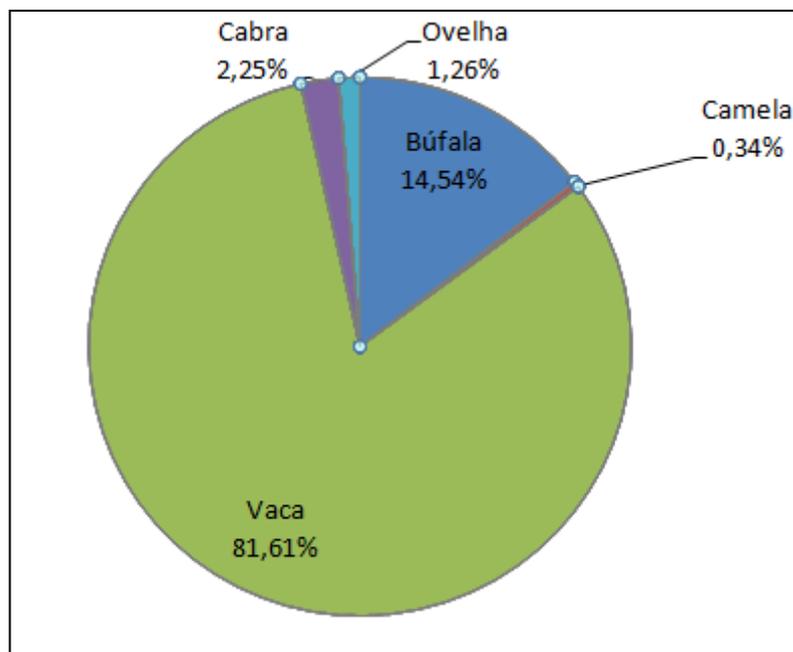
Esses fatores contribuem para que a produção de leite de búfala tenha apresentado o maior crescimento a nível global dentre todas as espécies leiteiras nas últimas décadas (265,5% de 1983 a 2017, contra 50,2% na produção de leite bovino) (FAOSTAT, 2019), consolidando-se no segundo lugar global em quantidade produzida, com 120 353 705 toneladas em 2017. Os maiores produtores são Índia e Paquistão, que respondem, respectivamente, por 71,7 e 22,7% da produção mundial. Maiores informações são apresentadas nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Desenvolvimento da produção anual global, em milhões de toneladas, de leites de diferentes espécies, entre 1983 e 2013.



Fonte: Adaptado de Tsakalidou e Papadimitriou (2016).

Figura 2. Contribuição das cinco principais espécies para a produção mundial de leite em 2017. Produção mundial total: 827 884 303 toneladas.



Fonte: elaborado a partir de FAOSTAT (2019).

No Brasil, observou-se nos últimos 50 anos um crescimento na produção de leite de búfala de 301,0%, contra 59,3% para o leite de vaca, 85% para o leite de cabra (LC), e 54,4% para o leite de ovelha (LO) (JORGE et al., 2011). O Brasil concentra a maior população de búfalos da América, com 1 390 066 cabeças. Neste cenário, o Rio Grande do Sul ocupa o 8º lugar em número de cabeças, com 56 962; os primeiros lugares são ocupados pelos estados do Pará (519 072) e Amapá (301 757) (IBGE, 2018). A produção de queijo muçarela é o principal destino do leite bubalino brasileiro, absorvendo 70% da produção (SILVA et al., 2015); outros produtos de leite de búfala incluem manteiga, iogurtes e kefir (SHOJI et al., 2013, GUL et al., 2015).

Em meio a este cenário promissor, a cadeia produtiva nacional de leite de búfala ainda apresenta algumas limitações, que incluem a estacionalidade da produção, o baixo investimento em tecnologias específicas para esse produto (e.g. trocadores de calor especialmente adaptados ao seu alto teor de sólidos), a escala de produção ainda pequena e a falta de uma legislação brasileira específica para leite de búfala (ANDRIGHETTO, 2011). Para sanar tais limitações, é imprescindível um conhecimento mais aprofundado das especificidades dessa matéria-prima.

3.1.1. Parâmetros físico-químicos

O leite de búfala possui propriedades únicas que contribuem para a alta qualidade de seus derivados. Uma comparação entre as características dos leites bubalino e bovino é apresentada na Tabela 1.

O leite bubalino apresenta alto teor de proteínas, com teores de caseína que podem chegar a 5% (m/m). Sua proporção caseína:proteínas do soro (aprox. 80:20) é semelhante à do leite de vaca e superior à de leites como o humano (0,7:1), equino (1,3:1) e de camela (3:1) (TSAKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016). Seu alto teor de α_{s1} -caseína retarda o processo de coagulação e torna o coágulo mais firme, garantindo maior rendimento e homogeneidade na produção de queijos (DEVOLD et al., 2011; SKEIE et al., 2014; Skeie et al., 2014). Por outro lado, seu alto teor de β -caseína está associado a um pH mais baixo do produto final (BONFATTI et al., 2013). As estruturas primárias de suas proteínas, apesar de apresentarem grande homologia com aquelas do leite de vaca, exibem pequenas diferenças estruturais, o

que permite obter produtos únicos a partir de sua hidrólise (DIXIT; KUTTAN; SINGH, 2012).

Tabela 1. Principais componentes do leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB).

Componente (unidade)	LV	LB
Valor Calórico (kcal/100g)	76	115
Sólidos totais (g/100g)	11,8-13,0	15,7-17,2
Proteína (g/100g)	3,0-3,9	4,2-4,4
Caseína (g/100g)	2,4-2,8	2,7-5,0
α 1-caseína (g/100g)	0,81-1,52	1,07-1,80
α 2-caseína (g/100g)	0,18-0,39	0,21-0,59
β -caseína (g/100g)	0,73-1,00	1,21-1,59
κ -caseína (g/100g)	0,24-0,52	0,38-0,55
γ -caseína (g/100g)	0,10-0,21	0,10-0,17
Proteínas do soro (g/100g)	0,5-0,7	0,6-0,10
α -lactalbumina (g/100g)	0,10-0,15	0,12-0,30
β -lactoglobulina (g/100g)	0,20-0,40	0,30-0,44
Imunoglobulinas (g/100g)	0,15-1,00	0,5-1,3
Lactoferrina (g/100g)	0,02-0,50	0,02-0,3
Albumina de soro de leite (g/100g)	0,03-0,05	0,01-0,04
Lizosima (g/100g)	Traços	Traços
Nitrogênio não proteico (NPN) (g/100g)	0,027	0,034
Lipídeos	3,3-5,4	5,3-9,0
Ácidos graxos saturados (g/100g)	2,2-3,1	4,8-6,1
Ácidos graxos monoinsaturados (g/100g)	0,8-1,4	1,8-2,3
Ácidos graxos poliinsaturados (g/100g)	0,08-0,25	0,15-0,85
Colesterol (g/100g)	12-31	6,5-16
Diâmetro do glóbulo de gordura (μ m)	3-4	4-8
Lactose (g/100g)	4,8-5,6	4,6-5,2
Cinzas (g/L)	7-8	8-9
Cálcio (mg/L)	1200-1310	1680-1975
Fósforo (mg/L)	920-940	1120-1913
Sódio (mg/L)	450-480	390-445
Magnésio (mg/L)	110-120	124-150

Fonte: Adaptado de Ahmad et al. (2013); Barlowska et al. (2011); Claeys et al. (2014); Devle et al. (2012); El-Salam e El-Shibiny (2011); Medhammar et al. (2012); Tsakalidou e Papadimitriou (2016); Walstra et al. (2005); Wijesinha-Bettoni et al. (2013).

Em comparação ao leite de vaca, as micelas de caseína do leite de búfala são maiores e mais ricas em minerais, de forma que este apresenta também maiores teores de cálcio e fósforo em sua composição (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011).

O leite bubalino possui teores de colesterol inferiores em cerca de 30% em relação ao leite bovino (PIGNATA et al., 2014); apresenta ainda maior teor de ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos poli-insaturados e ácido linoleico conjugado. Enquanto em leites como o bovino, ovino e humano, os triglicerídeos representam 97-98% do total de lipídeos, no leite de búfala esse valor é inferior (95%), havendo maior proporção de ácidos graxos livres e fosfolipídeos (TSKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016).

Dentre todas as espécies leiteiras, o leite de búfala apresenta o mais elevado diâmetro médio de glóbulo de gordura (5 μm), seguido pelo leite de vaca (3,2 μm), ovelha (3 μm), cabra (2,6 μm), cavalo (2 μm) e burra (1,9 μm), o que influencia a digestibilidade da gordura e a resistência química e térmica dos microrganismos (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; AHMAD, 2013; FUQUAY; MCSWEENEY; FOX, 2011; MARTINI et al., 2014). A diferença de tamanho é tão expressiva que pode ser utilizada como parâmetro para discriminar leites de búfala e vaca através de ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C) (ANDREOTTI et al., 2000). Os glóbulos de gordura apresentam ainda maiores valores de densidade e temperatura de fusão (32-43,5 $^{\circ}\text{C}$) e menor estabilidade em relação às do leite de vaca (AMARAL, 2005).

A distribuição de sais nas diferentes fases da emulsão varia entre espécies: enquanto no leite de vaca apenas 1% do cálcio fica associado aos lipídeos; no leite de búfala essa fração atinge 13%, o que pode impactar em parâmetros de desnate e aumentar a formação de incrustações em equipamentos (GAUCHERON, 2013; HUNT; NIELSEN, 2009).

Os teores de oligossacarídeos (0,1 g/L) no leite de búfala também superam aqueles do leite bovino (0,03-0,09 g/L) e ovino (0,02-0,04 g/L), podendo influenciar positivamente a fermentação e maturação de seus produtos (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011).

Por fim, o leite de búfala apresenta maior teor de vitaminas A, B6, B7, C e E em relação ao leite de vaca; assim como o leite de pequenos ruminantes, o leite de búfala apresenta altos teores de vitamina A como consequência da conversão

eficiente de carotenoides em vitamina A; isso também contribui para sua coloração esbranquiçada (TSAKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016).

Fatores que influenciam na composição do leite incluem a espécie do animal, raça, idade, fase de lactação, saúde, regime e estação do ano (CHILLIARD; FERLAY, 2004; JENKINS; MCGUIRE, 2006). Apesar disso, os dados para composição do leite de búfala no Brasil demonstram certa homogeneidade, conforme exposto na Tabela 2. Por outro lado, observa-se que o leite de búfala do Rio Grande do Sul apresenta diferenças marcantes em sua composição quando comparado ao leite de vaca do estado, o que sugere que normas específicas para o processamento daquele são aconselháveis.

Tabela 2. Composição físico-química de leite de búfala (LB) e de vaca (LV) de diferentes estados do Brasil: Rio Grande do Sul (RS); Rio Grande do Norte (RN); São Paulo (SP). Resultados para LB expressos na forma média \pm desvio padrão; resultados para LV expressos na forma de [MIN,MÁX].

Parâmetro	LB – RS	LB – RN	LB – SP	LV - RS
Lipídeos (g/100g)	5,62	5,44 \pm 0,55	4,26 \pm 0,71	3,60 - 3,5
Proteína (g/100g)	4,05	4,24 \pm 0,14	3,05 \pm 0,21	3,67 - 3,74
Lactose (g/100g)	5,07	4,77 \pm 0,11	4,27 \pm 0,26	4,83 - 4,54
Sólidos totais (g/100g)	15,57	15,42 \pm 0,58	12,47 \pm 0,29	12,93 - 13,21
Índice crioscópico (°C)	-0,527	-	-	-
Densidade relativa (15°C)	1,035	-	1,029 \pm 0,01	-

Fonte: adaptado de De Lima et al. (2014); Godinho et al. (2019, não publicado); Mielke, Suñé e Müller (2011); Pignata et al. (2014).

3.1.2. Parâmetros microbiológicos

Devido à sua riqueza de nutrientes, o leite de búfala constitui um ambiente favorável para a proliferação de inúmeros microrganismos, que podem afetar suas qualidades sensoriais e constituir perigo ao consumidor se não controlados (HASHMI; SALEEM, 2014).

A microbiota do leite de búfalo cru é amplamente representada por bactérias ácido-láticas, como as dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, assim como coliformes, *E. coli*, *S. aureus* e esporos bacterianos (ERCOLINI et al., 2004). Outros microrganismos detectados em baixa concentração em leite de búfala cru incluem os gêneros *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Chryseobacterium*, *Clostridium*,

Corynebacterium, e *Haloanella*, e bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae (ERCOLINI et al., 2012). Silva et al. (2015), analisando muçarela de búfala produzida no Brasil via RAPD-PCR, relataram a presença de *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. durans*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus* e *L. helveticus*.

Já foram relatadas contagens de microrganismos psicrotróficos na faixa de 2,52 a 5,76 log UFC/mL no leite de búfala cru (DUANGPAN; SURİYAPHAN, 2009), e de 5,69 log UFC/g (ABDALLA; IBRAHIM, 2010) e 3,15 log UFC/mL (LOSITO et al., 2014) em muçarela de búfala. Foram ainda relatados valores de coliformes na faixa de 2,83 a 3,59 log UFC/mL (BATTOOL et al., 2012; GÜRLER et al., 2013; HASHMI; SALEEM, 2015). Bactérias que já receberam particular atenção no leite bubalino em diversos estudos incluem:

- *E. coli*: Han et al. (2007) relataram contagens de cerca de 1,53 log UFC/mL no leite de búfala;

- *S. aureus*: Oliveira et al. (2011) relataram sua presença em 11,1% das amostras de leite bubalino brasileiro testadas, e Gürler et al. (2013) relataram contagens de até 2,46 log UFC/mL. Sua presença foi ainda relatada em amostras de queijo muçarela de búfala brasileiro (FACCHIN et al., 2013);

- *L. monocytogenes*: presente em 2,9% das amostras analisadas por Rahimi et al. (2014);

- *Pseudomonas* spp.: presente em 7% das amostras analisadas por Batool et al. (2012) com um número médio de 0,92 log UFC/ mL.

O leite bubalino é também mais rico em bactérias bifidogênicas do que o leite de vaca, contribuindo para a manutenção da saúde intestinal do consumidor (KIARELLY et al., 2005). Além das bactérias, as leveduras constituem parte importante da microbiota do leite de búfala, com contagens que podem atingir 4-6 log UFC/mL (APONTE et al., 2010; PISANO et al., 2016).

A complexa microbiota acima descrita deve ser efetivamente controlada na cadeia produtiva do leite bubalino, através de medidas de higiene e monitoramento dos pontos críticos de controle, dentre os quais se destaca a pasteurização.

3.2. Pasteurização

Define-se a pasteurização como o tratamento térmico aplicado ao leite para evitar que microrganismos patogênicos eventualmente presentes neste ofereçam perigo à saúde pública, e que promove modificações mínimas em suas propriedades químicas, físicas, sensoriais e nutricionais (BRASIL, 2017a).

Os processos de pasteurização se dividem em duas classes: a pasteurização lenta (LTLT, *Low temperature-long time*), que consiste no aquecimento indireto do leite e sua manutenção (63-65°C/30 min) sob agitação mecânica, lenta, em aparelhagem própria; e a pasteurização rápida (HTST, *High temperature-short time*), que consiste no aquecimento do leite em escoamento laminar (72-75°C/15-20 s) em aparelhagem própria (BRASIL, 2017a).

A legislação de diversos países (BRASIL, 2017a; EC, 2006; FDA, 2009) considera o binômio (63 °C/30 min) como o mínimo aceito para a pasteurização lenta; esses valores foram instituídos com base na inativação da bactéria *Coxiella burnetti*, que não é capaz de sobreviver a um tratamento de 62.8 °C/30 min (HOLSINGER; RAJKOWSKI; STABEL, 1997). No caso do Brasil, abre-se uma exceção para os estabelecimentos agroindustriais de pequeno porte de produtos de origem animal, para os quais é aceita a pasteurização lenta a 62 °C, de acordo com a Instrução Normativa Nº 5, de 14 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017b).

A legislação estadunidense define ainda binômios de pasteurização envolvendo temperaturas mais altas, conforme demonstrado na Tabela 3. Vale ressaltar que tais binômios encontram maior aplicabilidade na indústria de leites fermentados e de outros produtos que não sejam negativamente afetados pela desnaturação da β -lactoglobulina que começa a ocorrer a partir de 70 °C (LOVEDAY, 2016).

Ainda com relação à legislação estadunidense, observa-se que uma ressalva é feita para leites que possuem teores de gordura a partir de 10% ou de sólidos totais a partir de 18%, em que a temperatura do tratamento térmico deve ser acrescida de 3°C. Isso se deve ao efeito da gordura no aumento da resistência térmica dos microrganismos, decorrente do retardo na penetração do calor e da redução da atividade de água (POTTER; HOTCHKISS, 2012). Conforme previamente descrito, o leite de búfala pode apresentar teores de gordura de até 9 g/100 g e de sólidos totais de até 17,2 g/100 g, próximos aos limites para os quais o governo estadunidense preconiza temperaturas maiores (+3 °C) de pasteurização. Evidencia-se assim a

necessidade de uma validação dos tratamentos térmicos para esse tipo de matéria-prima.

Tabela 3. Binômios de tempo-temperatura preconizados pelo governo estadunidense para a pasteurização de leite.

Temperatura (°C)	Tempo
Pasteurização lenta (LTLT)	
63	30 min
Pasteurização rápida (HTST)	
72	15 s
89	1 s
90	0,5 s
94	0,1 s
96	0,05 s
100	0,01 s

Fonte: adaptado de FDA (2009).

A única legislação brasileira que trata de padrões de qualidade específicos para o leite bubalino é a Resolução SAA - 24, de 01/08/1994, alterada pela Resolução SAA-03 de 10/01/2008 (SÃO PAULO, 1994). No Quadro 1, são comparados os parâmetros estabelecidos pela SAA-03 de 10/01/2008 para leite de búfala, e pela Instrução Normativa 76/2018 (BRASIL, 2018), pela normativa estadunidense (FDA, 2009), e pelas normas da comissão europeia (EC, 2006; EC, 2005), que estabelecem certos parâmetros para leite de vaca e outros para leite de outras espécies.

Observa-se que, enquanto a legislação do estado de São Paulo para leite bubalino (e também caprino) exige Contagens de Mesófilos Totais no leite cru inferiores àquelas definidas para leite bovino pela legislação nacional, a normativa europeia prevê um limite aceitável 15 vezes maior para Contagem de Mesófilos Totais em leite de outras espécies com relação ao leite de vaca. Quanto à validação da inocuidade do leite pasteurizado, não é consenso o parâmetro microbiológico adotado na fiscalização, na medida em que países como os EUA quantificam microrganismos mesófilos totais, enquanto normas como a europeia se baseiam na contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae.

Quadro 1. Comparação entre a legislação estadual paulista para leite bubalino e as legislações brasileira, estadunidense e europeia para leite em geral.

Parâmetro	Res. SAA 24/1994 (SÃO PAULO, 1994)	IN 76/2018 (BRASIL, 2018)	Legislação EUA (FDA, 2009)	Legislação Europeia (EC, 2006; EC, 2005)
Temperatura de entrega ao consumo do leite envasado	≤ 6°C	≤ 7°C	≤ 7°C	≤ 6°C
Temperatura de refrigeração na indústria	≤ 4°C	≤ 4°C	≤ 7°C	≤ 6°C
Mesófilos totais em leite cru (UFC/mL)	≤ 500 000	≤ 900 000*	≤ 100 000	≤ 100 000 para leite de vaca (≤ 1 500 000 para leite de outras espécies)
Mesófilos totais em leite pasteurizado (UFC/mL)	≤ 40 000	-	≤ 20 000	-
Coliformes totais em leite pasteurizado (UFC/mL)	≤ 2	-	≤ 10	-
Coliformes fecais em leite pasteurizado (UFC/mL)	Ausência	-	-	-
Enterobacteriaceae em leite pasteurizado (UFC/mL)	-	≤5	-	≤ 5

*antes do seu processamento no estabelecimento beneficiador. O leite cru refrigerado de tanque individual ou de uso comunitário deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os parâmetros para a garantia da segurança dos alimentos ao longo da cadeia produtiva devem ser viáveis econômica e proceduralmente; justifica-se, portanto, que sua definição atenda às limitações e riscos específicos de cada região, sempre apoiando-se amplamente em dados científicos (MEGHWAL; PATRA; RAO, 2018).

Se por um lado, os países acima citados divergem em seus parâmetros microbiológicos de validação da pasteurização, todos aceitam a fosfatase alcalina como indicador indireto da eficiência de pasteurização, para todos os leites com produção regulamentada (BRASIL, 2018; EC, 2006; FDA, 2009), evidenciando o papel central que essa enzima assume na garantia da segurança do leite.

3.3. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (FA) é uma das mais de sessenta enzimas encontradas em leite cru (SCHLIMME et al., 1997). Apesar de seu baixo impacto na degradação do leite, essa enzima adquiriu relevância tecnológica no controle da pasteurização a

partir da década de 30, quando Kay e Graham (1933) observaram que os binômios tempo-temperatura necessários para a inativação térmica da FA em leite de vaca são ligeiramente mais severos do que os necessários para reduzir a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (um dos patógenos mais resistentes à pasteurização) a níveis aceitáveis. Desde então, outros testes foram realizados com diferentes bactérias, incluindo *Salmonella senftenberg*, *Listeria monocytogenes* e *Coxiella burnetti* (ECKNER, 1992; HOLSINGER; RAJKOWSKI; STABEL, 1997), de forma que, atualmente, a inativação completa dessa enzima é amplamente aceita como parâmetro de validação indireta da pasteurização do leite (BRASIL, 2018; EC, 2006; FDA, 2009;).

A fosfatase alcalina já foi amplamente descrita para o leite de vaca: possui baixa lipossolubilidade, e se concentra na interface entre as fases lipídica e aquosa (MFGM, *Milk fat globule membrane*) (KOSIKOWSKI, 1988); sua massa molecular é de cerca de 187 kDa; seu ponto isoelétrico se situa em pH 5.4-6.0; e sua atividade máxima é observada em pH 9,65-10,1 a 37 °C (VEGA-WARNER et al., 1999).

No entanto, para leites de outras espécies, o número de estudos de caracterização da enzima e sua relação com a pasteurização é ainda insuficiente. Além disso, ressalta-se que, muito embora essa enzima seja utilizada como indicador de pasteurização para diversos tipos de leite, estudos têm demonstrado que a atividade e resistência térmica dessa enzima variam significativamente entre espécies. Por exemplo, Raynal-Ljutovac et al. (2007) encontraram atividades da FA no leite de ovelha de 3,5 e 18 vezes maiores do que no leite de vaca e de cabra, respectivamente; Marchand et al. (2009) relataram no leite equino atividades da FA de 35 a 350 vezes menores do que no leite de vaca. Vamvakaki et al. (2006) e Anifantakis e Rosakis (1983) descreveram menores resistências térmicas da FA em leite de cabra ou ovelha do que em leite de vaca. Wernery et al. (2008) apontaram que a FA não é um indicador viável da efetividade da pasteurização no leite de camela, visto requerer para sua inativação binômios muito superiores aos comumente adotados no processamento de leite.

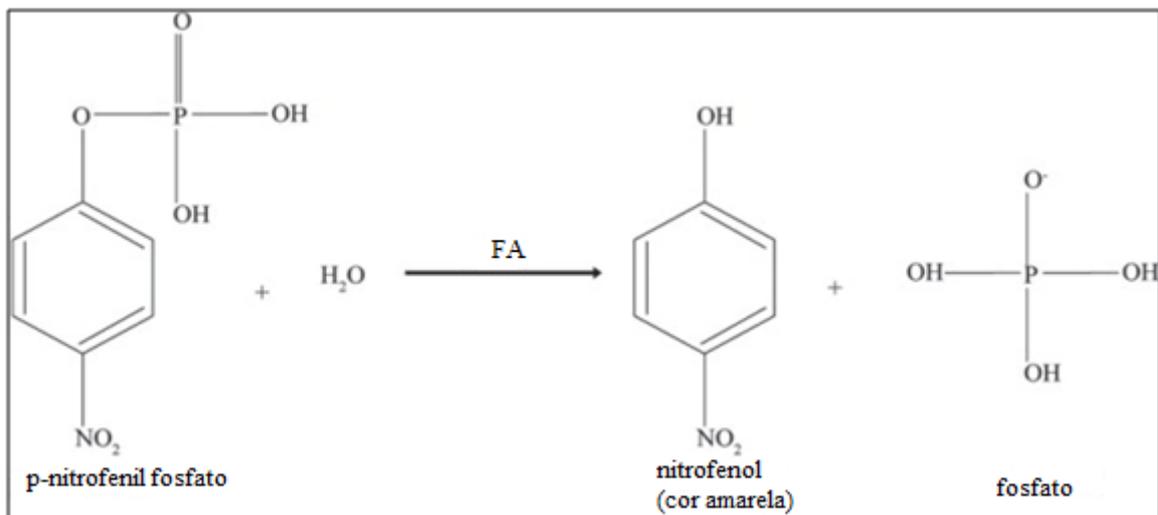
Em comparação aos leites ovino e caprino, o leite de búfala foi alvo de menos estudos de caracterização da FA: Sharma et al. (2009) apontaram que a atividade da FA nos leites bovino e bubalino não apresentam diferenças significativas; no entanto, estudos de avaliação da inativação térmica da FA em leite bubalino ainda

são escassos, evidenciando a necessidade de maiores pesquisas com essa matéria-prima.

Para quantificar a atividade da FA no leite, são descritos na literatura métodos colorimétricos, fluorimétricos, imunoquímicos e de quimioluminescência (RANKIN et al., 2010).

Dentre os métodos colorimétricos, aquele proposto por Aschaffenburg e Mullen (A&M) (1949) se destaca por apresentar boa linearidade e baixo limite de detecção (PAYNE; WILBEY, 2009). O método se baseia na formação de p-nitrofenol (pNP), de coloração amarela, através da reação da fosfatase alcalina com um substrato que consiste em p-nitrofenil fosfato (pNPP) em solução-tampão, conforme exposto na Figura 3.

Figura 3. Mecanismo básico da reação química do teste de Aschaffenburg & Müllen para quantificação da atividade da fosfatase alcalina.



Fonte: Rankin et al. (2010).

Os métodos fluorimétricos, como o método FluorophosTM, apresentam maior precisão e limite de detecção ainda mais baixo; no entanto, seu custo é muito mais elevado em comparação aos métodos colorimétricos (PAYNE; WILBEY, 2009). No Brasil, o método comumente utilizado é qualitativo (baseado na mudança de cor de tiras contendo substrato para a enzima), não sendo efetivo para fornecer curvas de inativação dessa enzima (ANDRADE; OLIVEIRA; KICH, 2013).

3.3.1. Modelos para predição da cinética de inativação da fosfatase alcalina

Diversos modelos são encontrados na literatura para descrever o comportamento de inativação enzimática, incluindo modelos cinéticos de primeira ordem, modelos multicomponentes de primeira ordem, modelos de isoenzimas distintas, duas frações, conversão fracionária, distribuição de Weibull, *n*-ésima ordem, etapas consecutivas e séries (BROCHIER, 2018). O modelo mais utilizado é o de primeira ordem, que parte do princípio de que a inativação ocorre em apenas uma etapa, por exemplo, a ruptura de uma ligação simples (LADERO; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2006). Embora se saiba que o processo de inativação enzimática envolva várias etapas consecutivas, o modelo de primeira ordem tem sido capaz de descrever com precisão satisfatória a inativação da FA (CLAEYS; LUDIKHUYZE; HENDRICKX, 2000; LEVIEUX et al., 2007). Esse modelo é expresso pela seguinte equação:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -kt \quad (1)$$

Em que:

k = constante de reação, velocidade

A = concentração de enzima ativa após um dado tempo de tratamento

A_0 = concentração de enzima ativa no tempo zero

t = tempo

O modelo cinético de primeira ordem pode ser reescrito em base logarítmica, sendo conhecido como o modelo de destruição térmica (Equação 2) (Bigelow, 1921). Esse modelo é amplamente utilizado para descrever cinéticas de inativação de primeira ordem na área de processamento de alimentos, em que se define o valor D como o tempo necessário para reduzir o valor de concentração inicial A_0 em 90% a uma temperatura constante.

$$\log \left(\frac{A}{A_0} \right) = -\frac{t}{D} \quad (2)$$

Em que:

A_0 = concentração de enzima ativa no tempo zero

A = concentração de enzima ativa após um dado tempo de tratamento

t = tempo de tratamento

D = tempo de redução decimal

A relação entre D e k é dada por:

$$D = \frac{2,303}{k} \quad (3)$$

Vale ressaltar que os valores de D e K devem ser obtidos para condições isotérmicas (temperatura constante). A partir da determinação dos valores de K ou D para diferentes temperaturas, é possível modelar a dependência dessas variáveis com a temperatura. Para isso, podem-se utilizar dois modelos matemáticos consolidados: o modelo de Arrhenius (Arrhenius, 1889), utilizado particularmente para reações químicas em que se deseja avaliar a energia de ativação E_a (J/mol); e o modelo de Bigelow (1921) que define o parâmetro z , conforme Equação 4. Esse último modelo é frequentemente utilizado em curvas cinéticas de inativação de microrganismos e enzimas e, portanto, será a equação utilizada no presente trabalho.

O valor de z é definido como o aumento de temperatura necessário para reduzir D em 90% em relação a um valor de referência. A temperatura de referência, correspondente ao valor D de referência, é definida arbitrariamente para cada processo, e não interfere no valor de z para um conjunto de dados. Temperaturas de referência tipicamente adotadas incluem temperaturas padrão de pasteurização, como 63 °C ou 71,7 °C (LUDI KHUZE; CLAEYS; HENDRICKX, 2000).

$$z = -(T - T_{ref}) / (\log D - \log D_{ref}) \quad (4)$$

Em que

T_{ref} = temperatura de referência

T = temperatura desejada

D_{ref} = tempo de redução decimal para uma temperatura de referência

D = tempo de redução decimal para a temperatura desejada

z = coeficiente térmico z

Diversos valores de D e z já foram relatados para essa enzima em leite bovino, conforme disposto na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de D e z para a fosfatase alcalina do leite de vaca segundo diferentes autores.

Referência	D, segundos (Temperatura, °C)	z (°C)
Mistry (1989)	15,9 (71,7)	5,8
Murthy et al. (1990)	6,9-9,4 (71,7)	4,85-5,4
Ludikhuze, Claeys e Hendrickx (2000)	5,2 (71,7)	4,8
Claeys, Ludikhuze e Hendrickx (2001)	579 (62)	5,38
Eckner (1992)	362 (63)	6,7

Fonte: elaborado pelo autor (2019).

No leite bubalino, os poucos estudos que se voltaram à avaliação do comportamento da fosfatase alcalina frente à pasteurização (LOMBARDI et al., 2000; SHARMA et al., 2009) não realizaram modelagem da inativação enzimática. Não foram encontrados dados de parâmetros D e z para a FA no leite de búfala na literatura, o que dificulta a comparação de sua resistência térmica à do leite de vaca.

Para melhor caracterizar essa matéria-prima e a resistência de suas enzimas e microrganismos ao tratamento térmico, é imperativo o desenvolvimento de estudos de modelagem da pasteurização do leite bubalino. Nesse contexto, são apresentados a seguir os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais e métodos utilizados na execução do presente trabalho e está dividido em duas seções principais: a primeira seção consiste na obtenção de curvas cinéticas de inativação da FA para leites bovino e bubalino em diferentes temperaturas e cálculo de seus respectivos coeficientes cinéticos; na segunda seção, é descrita a avaliação microbiológica do leite bubalino, inicialmente em sua forma *in natura*, com o intuito de observar o comportamento da microbiota autóctone, e, em seguida, em amostras de leite de búfala esterilizadas e inoculadas com microrganismos indicadores, para avaliação de sua inativação específica.

Os experimentos realizados nesse estudo foram conduzidos no Laboratório de Química e Processamento de Alimentos e no Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia Aplicada, localizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.1. Matérias-primas

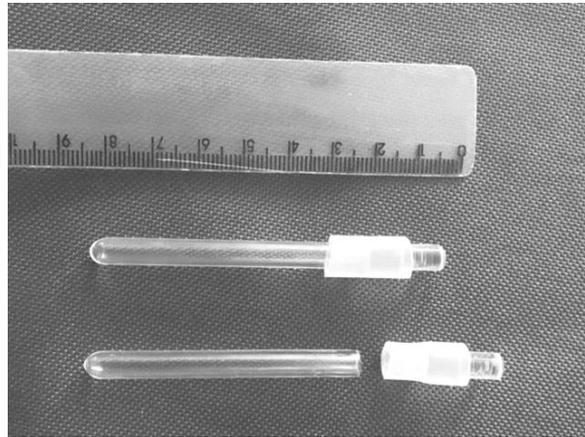
Amostras de leites de vaca e de búfala crus foram obtidos da empresa Laticínios Kronhardt, no município de Glorinha, Brasil, e transportados (<4 °C) em caixas isotérmicas até o laboratório de Química e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para serem analisados. As amostras de leite de búfala e vaca destinadas à realização da curva cinética de inativação da FA, bem como as amostras de leite de búfala a serem esterilizadas para inoculação de microrganismos indicadores, foram aliqüotadas em tubos *falcon* de 50 mL e congeladas e mantidas a -18 °C. As amostras de leite de búfala para avaliação microbiológica do leite cru foram estocadas a <4°C por não mais que 24 h.

4.2. Cinética de inativação da fosfatase alcalina

A cinética de inativação da FA foi avaliada em cinco temperaturas diferentes entre 62 °C e 75 °C, conforme apresentado na Tabela 5. Tubos capilares de vidro (0,5 cm x 6 cm, conforme Figura 4) foram utilizados a fim de minimizar a resistência à transferência de calor entre as amostras e o meio. Os tubos foram preenchidos com aproximadamente 0,65 mL de leite cru (de vaca ou de búfala), e vedados com tampa de borracha. Os tubos foram imersos simultaneamente em banhos

termostáticos com circulação de água (Alpha RA8, LAUDA, Brasil), e foram mantidos 3 cm abaixo da linha d'água durante todo o tratamento.

Figura 4. Tubos capilares de vidro utilizados no presente estudo.



Para cada temperatura, após os intervalos de tempo descritos na Tabela 5, transferiu-se imediatamente um dos tubos capilares para banho de gelo para resfriamento até temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo em seguida aliquoteado do tubo um volume de $100\text{ }\mu\text{L}$ a ser submetido ao procedimento Aschaffenburg & Mullen para quantificação da atividade da FA (esta foi realizada em duplicata) (IDF, 1987). Amostras dos leites crus foram também submetidas ao teste, para obtenção de valores absolutos de atividade da FA nos leites bovino e bubalino *in natura* (análise realizada em quadruplicata). Foram realizados testes preliminares para garantir que os tempos de tratamento considerassem apenas o intervalo em que a amostra realmente atingisse o *setpoint* de temperatura; assim, a contagem de tempo em todos os tratamentos iniciou-se 5 segundos após a imersão das amostras. Todos os experimentos foram repetidos, pelo menos, em duplicata, totalizando pelo menos quatro ensaios para cada binômio de tempo-temperatura.

Tabela 5. Tempos e temperaturas para coleta de amostras para as curvas cinéticas.

T ($^{\circ}\text{C}$)*	Tempos de tratamento (s)						
62	0	180	360	720	1080	1440	1800

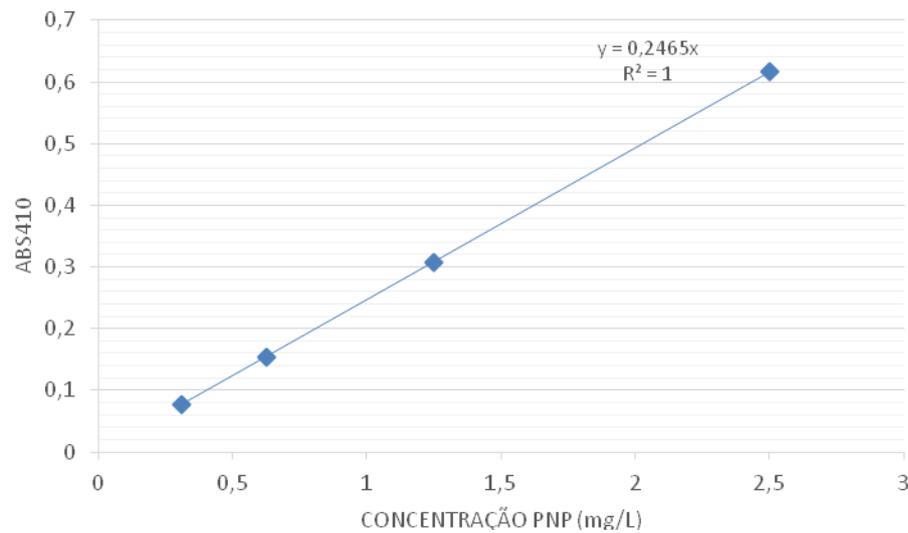
65	0	90	150	270	390	510	660
68	0	30	60	120	180	240	300
72	0	3	6	12	18	24	30
75	0	4	8	12	16	20	24

* Temperaturas oscilaram $\pm 0,5$ em relação ao valor mostrado.

4.2.1. Determinação da atividade da fosfatase alcalina

O método de quantificação da atividade da FA, consiste numa determinação espectrofotométrica a 410 nm utilizando p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato. A solução de substrato foi preparada contendo 4mM de p-nitrofenil fosfato di (tris), 3,5 g.L⁻¹ de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) e 1,5 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) em água destilada. A amostra de leite tratada foi diluída em água destilada (10 a 50 vezes, dependendo da atividade esperada de FA). Um branco foi preparado fervendo leite cru por 2 min. Cem microlitros de leite diluído foram adicionados a 1 mL de solução de substrato em tubos *ependorf* de 2 mL e incubados por 2 h a 37 \pm 2°C em banho termostático (Dubnoff NT 232, Novatecnica, Brasil). Subsequentemente, adicionou-se 33 μ L de sulfato de zinco (ZnSO₄, 1,05 M) a cada tubo, o qual foi agitado e deixado em repouso durante 3 min. Após adição de 33 μ L de hexacianoferrato de potássio (K₄[Fe(CN)₆], 0,36 M), os tubos foram centrifugados por 10 min a 10 000 g (5415R, EPPENDORF, Brasil). O sobrenadante foi então cuidadosamente transferido para cubetas e a absorbância medida no espectrofotômetro a 410 nm (SP-220, Biospectro, Brasil). Os resultados foram lidos contra uma curva padrão preparada usando diluições de p-nitrofenol (pNP), conforme Figura 5, e expressos em μ g de p-nitrofenol equivalente/mL (μ g pNP/mL) (LUDI KHUYZE; CLAEYS; HENDRICKX, 2000; PAYNE; WILBEY, 2009; SHAMSI et al., 2008).

Figura 5. Curva padrão de absorbância do pNP.



4.2.2. Modelagem da cinética de inativação da fosfatase alcalina

A partir dos valores obtidos para os diferentes binômios testados, foram obtidas curvas cinéticas isotérmicas de inativação da FA em leite bovino e bubalino. As curvas foram ajustadas ao modelo cinético de primeira ordem (descrito em detalhes na seção 3.3.1) calculando-se os valores D e z para os leites bovino e bubalino, de acordo com as Equações (2) e (4). Nos cálculos dos parâmetros cinéticos, considerou-se o tempo de inativação da enzima como aquele necessário para que sua atividade atinja um valor abaixo de $10 \mu\text{g pNP/mL}$, conforme descrito em Rocco (2004).

4.3. Avaliação microbiológica

A fim de avaliar a inativação bacteriana e compará-la à inativação enzimática, foram realizados ensaios de pasteurização em batelada (LTLT) com binômio de tempo-temperatura comumente utilizado no processamento de leite de búfala ($62^\circ\text{C}/30 \text{ min}$). Em um primeiro momento, este binômio foi testado em leite bubalino *in natura* para observação do comportamento da microbiota autóctone; em um segundo momento, o mesmo binômio foi testado para leite bubalino esterilizado inoculado com microrganismos indicadores. Os procedimentos adotados são descritos detalhadamente a seguir.

4.3.1. Avaliação do efeito de pasteurização LTLT na microbiota autóctone do leite bubalino *in natura*

Amostras (5 mL) de leite bubalino cru integral foram submetidas a tratamento em banho termostático com agitação (Alpha RA8, LAUDA, Brasil) a $62 \pm 0,5$ °C por 30 min. Os perfis de temperatura no banho e na amostra foram acompanhados e registrados utilizando medidores de temperatura PT-100 (JMD, Brasil) com haste de aço inoxidável acoplados a um transmissor de sinais codificados para temperatura (TxRail-USB, Novus, Brasil). O equipamento realizava nova medida de temperatura a cada 2 segundos, e foi realizada medição com termômetro de expansão de líquido a cada 5 minutos para conferência. A contagem de tempo iniciou-se quando a amostra atingiu o *setpoint* de temperatura. Ao final do tratamento, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo até a temperatura ambiente e alíquotas foram submetidas a avaliação qualitativa da atividade da FA utilizando tiras para fosfatase alcalina (CAP-LAB, Brasil), e a avaliação quantitativa conforme descrita na seção 4.2.1.

As amostras foram em seguida submetidas a análises microbiológicas. Contagens de Mesófilos Totais, Contagens de Termófilos Totais e Contagens de Psicrotróficos Totais foram realizadas antes e após o tratamento. O tratamento foi realizado em triplicata.

4.3.1.1. Análises microbiológicas

Para a Contagem de Mesófilos Totais, Termófilos Totais e Psicrotróficos Totais, diluições seriadas (1:9) do leite foram realizadas em solução de NaCl 0,85%. Para pelo menos três diluições diferentes, foram inoculados 100 µL em placas de Petri (duplicata) contendo meio de cultura *Plate count agar* (PCA) através da técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*). As placas foram incubadas por 37°C/48h (mesófilos), 42°C/48h (termófilos) ou 5°C/10d (psicrotróficos) (BANWART, 2012). Após incubação, fez-se as contagens das colônias e multiplicou-se as médias aritméticas das duplicatas pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em log UFC/mL de leite.

4.3.2. Avaliação do efeito de pasteurização LTLT utilizando microrganismos indicadores em leite bubalino

Buscando ainda avaliar a inativação de microrganismos específicos no leite bubalino, amostras de leite integral previamente esterilizado em batelada foram inoculadas, separadamente, com quatro bactérias de interesse (concentração inicial pretendida: aprox. 10^7 UFC/ml) e submetidas ao processo de pasteurização, conforme etapas a seguir.

Foi adotado o procedimento de esterilização prévia do leite para garantir a inativação da microbiota naturalmente presente neste, a fim de quantificar unicamente os microrganismos inoculados. A esterilização foi realizada em frascos Duran adotando um binômio de 110 °C/10 min (binômio previamente validado pela equipe de pesquisa para a esterilização do leite de búfala), para minimizar a formação de grumos que pode ocorrer a temperaturas mais altas, devido aos altos teores de sólidos no leite bubalino. Após a esterilização, uma amostra foi coletada e inoculada sem diluição em placa de meio PCA (duplicata) para estimar a presença de microrganismos no leite esterilizado. Não foi verificado crescimento de microrganismos em nenhuma amostra.

A concentração inicial adotada foi de 10^7 UFC/mL, concentração esta superior à normalmente encontrada em leites, para que fosse possível quantificar reduções na carga microbiana na faixa de 5 log UFC/mL, uma vez que o método adotado para contagem tem como limite de quantificação 10^2 UFC/mL.

4.3.2.1. Inoculação de microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores testados foram:

- *Staphylococcus aureus* (cepa: ATCC 25923), bactéria gram-positiva, produtora de toxina e contaminante dos tetos dos animais leiteiros;
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), bactéria gram-positiva psicrotrófica, formadora de biofilmes e associada a inúmeros surtos envolvendo leite;
- *Escherichia coli* fecal (ATCC 10536), bactéria gram-positiva, indicativa de contaminação; e
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), bactéria deteriorante formadora de biofilme, pode apresentar resistência a múltiplos antibióticos.

As cepas acima descritas foram obtidas do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. As culturas foram propagadas em 10 mL de caldo BHI estéril a 37 °C por 24 h. Concentrações esperadas do inóculo foram de 10⁹ UFC/mL. As culturas de cada microrganismo foram adicionadas separadamente a amostras de leite, numa proporção de 1 mL para 99 mL, para uma concentração inicial esperada de 10⁷ UFC/mL.

4.3.2.2. Tratamentos térmicos

As amostras de leite de búfala previamente esterilizadas e inoculadas com cada bactéria indicadora foram submetidas a pasteurização LTLT (62 ± 0,5 °C/30 min, conforme etapas descritas na seção 4.3.1). O tratamento foi realizado em triplicata.

4.3.3. Contagens bacterianas de microrganismos indicadores

Avaliou-se a concentração pré-tratamento e pós-tratamento dos microrganismos indicadores no leite. Para tal, as amostras foram diluídas em série e inoculadas conforme descrito na seção 4.3.1.1, variando o meio de cultura utilizado conforme descrito a seguir: ágar Baird Parker para *S. aureus*, ágar Oxford para *L. monocytogenes*, ágar McConkey para *E. coli* e ágar Cetrimide para *P. aeruginosa* (FORSYTHE, 2013; MAHON; LEHMAN; MANUSELIS, 2018) e em seguida incubadas a 37 °C durante 48 h. Os resultados foram expressos em UFC/mL de leite.

4.4. Análise dos dados

Os valores absolutos obtidos para atividade da FA em leite *in natura* bovino e bubalino foram comparados via teste t de Student a 5% de significância.

Os valores dos parâmetros cinéticos calculados foram expressos por sua média e desvio padrão. O desempenho do ajuste das curvas ao modelo exponencial foi avaliado através do coeficiente de determinação (R^2), valor de chi-quadrado (χ^2) e raiz do erro médio quadrático (REM_Q), conforme equações a seguir:

$$\chi^2 = \frac{\sum(\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2}{n-p} \quad (5)$$

$$\text{REMQ} = \frac{1}{n} \left[\sum_n (\alpha_{\text{observado}} - \alpha_{\text{predito}})^2 \right]^{0,5} \quad (6)$$

Os coeficientes foram comparados estatisticamente segundo o tipo de leite via teste t de *Student*, sendo utilizada significância de 5%.

Os dados microbiológicos foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. A diferença entre as contagens antes e após o tratamento foi expressa como $\Delta \log$ UFC/mL, como forma de avaliar a eficiência de pasteurização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados a seguir os resultados do presente trabalho, e sua comparação com a literatura e legislações pertinentes. Vale ressaltar que os resultados aqui apresentados foram obtidos a partir de amostras de leite bovino e bubalino do Rio Grande do Sul, cuja composição aproximada já foi descrita (vide Tabela 2).

5.1. Cinética de inativação da fosfatase alcalina

As curvas de inativação da fosfatase alcalina em leite bovino (LV) e bubalino (LB) em diferentes temperaturas são apresentadas na Figura 6. Amostras com atividade enzimática inferior a 10 μg pNP/mL não foram consideradas no cálculo dos parâmetros cinéticos. Os valores absolutos obtidos para a atividade da fosfatase alcalina nos leites *in natura* para o leite de vaca (LV) e o leite de búfala (LB) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$), o que vai ao encontro do relatado por Sharma et al. (2009), que obteve resultados semelhantes utilizando o método espectrofotométrico de Scharer, que apresenta menor precisão em relação ao método de A&M (PAYNE; WILBEY, 2009; RANKIN et al., 2010).

Como pode ser observado na Figura 6, o perfil de inativação enzimática se aproxima de uma curva de inativação de primeira ordem, conforme previamente descrito na literatura (LEVIEUX et al, 2007; CLAEYS, LUDIKHUYZE; HENDRICKX, 2001). As curvas cinéticas foram ajustadas a esse modelo, e os parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 6. O modelo de primeira ordem apresentou valores satisfatórios para os coeficientes de ajuste. Como regra geral, considera-se que valores altos para o coeficiente R^2 e valores baixos para χ^2 e REMQ indicam um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo. Os valores de R^2 se mantiveram acima de 0,95, os valores de χ^2 abaixo de 0,01 e os valores de REMQ abaixo de 0,04, com exceção do tratamento 65 °C – LV, onde obteve-se valores de variabilidade superiores aos demais. No entanto, apesar da maior variabilidade, ainda foi observada diferença significativa entre os dois tipos de leite para essa temperatura.

Nas temperaturas mais altas avaliadas (72 °C e 75 °C), há uma aparente instabilidade nos primeiros pontos coletados; a razão provável para esse fenômeno

é o tempo curto utilizado para esses tratamentos, de tal forma que a homogeneização da temperatura ao longo de toda a amostra é mais difícil de ser alcançada.

Os tempos de tratamento necessários para inativação completa da enzima no LB foram de 30 minutos para 62 °C, 11 minutos para 65 °C, 4 minutos para 68 °C, 30 segundos para 72 °C e 16 segundos para 75 °C. Os valores de *D* obtidos para o LB decresceram com o aumento da temperatura, conforme esperado. Não há na literatura estudos que reportem valores *D* para inativação da enzima FA em LB. Portanto, uma comparação será realizada com o leite de vaca. Para avaliar se houve diferença significativa na inativação térmica da FA no LB em relação ao LV, os parâmetros cinéticos calculados a partir do modelo de Bigelow foram submetidos a análise estatística; os resultados estão incluídos na Tabela 6.

Os valores de *D* obtidos para o LV estão de acordo com a literatura: para 62 °C, obteve-se um valor de *D* de $8,5 \pm 1,1$ minutos, enquanto Claeys, Ludhikhuze e Hendrickx (2001) relataram um valor de $9,65 \pm 0,82$ minutos; para 72 °C, o valor de *D* obtido foi de $19,69 \pm 1,85$ segundos, enquanto Eckner (1992) relatou valores de 18,2 segundos e Mistry (1989) relatou valores de 15,9 segundos, ambos para 71,7 °C. Tais resultados servem como validação para o método do presente estudo.

Os valores de *D* obtidos para as temperaturas de 62 °C (LV = 8,5 minutos; LB = 18,7 minutos) e 65 °C (LV = 3,5 minutos; LB = 6,0 minutos) exibiram diferenças significativas em função da variável tipo de leite, sendo que a enzima apresentou maior resistência térmica no LB do que no LV. Por outro lado, em temperaturas mais altas, não foi verificada diferença significativa entre os dois leites avaliados. Esse resultado indica que a resistência térmica da enzima tem uma dependência em relação à temperatura diferente nos dois tipos de leite. A maior resistência térmica da enzima em temperaturas de 62 e 65°C pode impactar a avaliação da qualidade do processo de pasteurização LTLT que é conduzido geralmente utilizando essa faixa de temperaturas.

Figura 6. Atividade relativa (A/A_0) da fosfatase alcalina para leite bovino e bubalino ao longo do tempo em condições isotérmicas: (a) 62 °C, (b) 65 °C, (c) 68 °C, (d) 72 °C e (e) 75 °C.

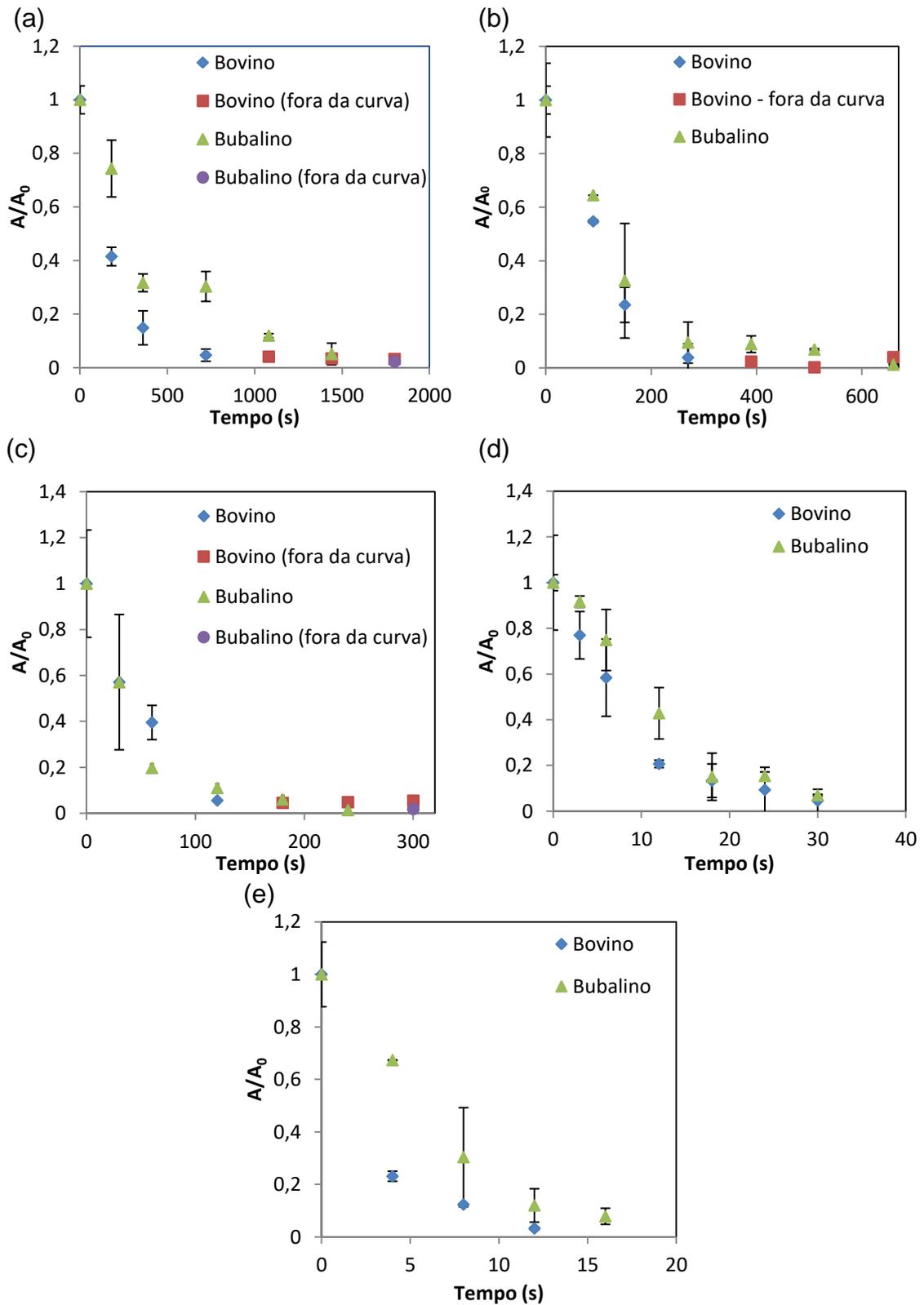


Tabela 6. Valores de D para a fosfatase alcalina em função da temperatura (62 °C, 65 °C, 68 °C, 72 °C e 75 °C) para leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB) e os coeficientes de avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

T (°C)	Leite	Valor D (s)	DP	χ^2	REMQ	R ²
62	LV	512*	64	0,0043	0,0283	0,977
	LB	1120*	167	0,0071	0,0313	0,958
65	LV	208*	21	0,0115	0,0464	0,956
	LB	361*	39	0,0031	0,0194	0,940
68	LV	104	7	0,0068	0,0356	0,953
	LB	138	13	0,0048	0,0259	0,970
72	LV	20	12	0,0018	0,0148	0,981
	LB	26	1	0,0089	0,0331	0,958
75	LV	9	1	0,0028	0,0228	0,977
	LB	13	2	0,0058	0,0305	0,977

*Efeito significativo da variável tipo de leite ($p \leq 0,05$).

Esses resultados são corroborados pelos valores de z obtidos no presente estudo, conforme descrito na Tabela 7. O valor de z obtido para o LV ($7,22 \pm 0,12$ °C) se assemelha ao já descrito por outros autores: Eckner (1992) relatou valores de 6,7 °C, enquanto Stănciuc et al. (2011) relataram valores de $9,19 \pm 0,2$ °C. Possíveis razões para diferenças entre estudos incluem os métodos de aquecimento utilizados, e diferenças regionais de composição do leite. Para o LB, o valor de z foi de $6,58 \pm 0,01$ °C. Como pode ser observado na Tabela 7, foi verificada diferença significativa entre os valores de z para os leites bovino e bubalino. Os coeficientes de ajuste foram satisfatórios, com valores de R² acima de 0,99, valores de χ^2 não superiores a 0,0005 e valores de REMQ de no máximo 0,0042. Esses valores, combinados aos valores de D , permitem descrever o comportamento da FA em temperaturas de 62 a 75 °C, mostrando que há efeito significativo da temperatura sobre a resistência térmica da enzima. O valor de D no LB é reduzido em um ciclo logarítmico quando a temperatura aumenta em 6,58 °C, enquanto que no LV necessita-se de um aumento de 7,22 °C para que seu valor de D seja reduzido da mesma forma.

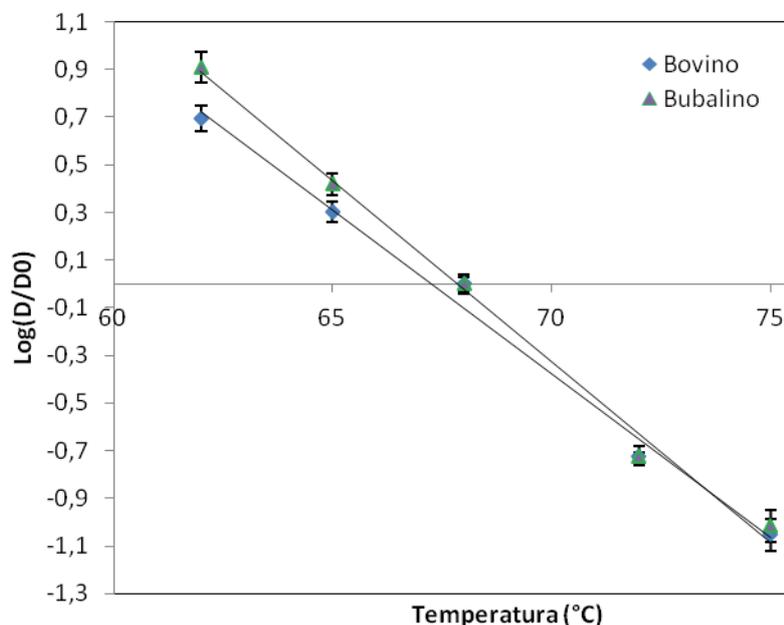
Tabela 7. Valores de z para leite de vaca (LV) e leite de búfala (LB) e coeficientes de avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

	Leite	Média (°C)	DP	χ^2	REMQ	R ²
z	LV	7,22*	0,12	0,0005	0,008	0,992
	LB	6,58*	0,01	0,0001	0,0042	0,994

*Efeito significativo da variável tipo de leite ($p \leq 0,05$).

Assim, a diferença entre os valores z é útil para expressar como a variação da resistência térmica em função da temperatura é diferente entre LV e LB. O valor de z mais baixo para o LB mostra que a enzima, apesar de apresentar valores D superiores a 62 °C e 65 °C, se mostra mais sensível ao aumento de temperatura. Dessa forma, conforme a temperatura testada aumenta, observa-se uma diminuição progressiva da diferença entre os valores D para os dois leites, de modo que a partir de 68 °C não mais é possível relatar diferença significativa entre esses valores. As curvas logarítmicas de D em função da temperatura podem ser visualizadas na Figura 7, em que é visível a aproximação entre as duas retas (obtidas seguindo o modelo de Bigelow) com o aumento da temperatura. A temperatura de 68 °C foi definida como a temperatura de referência (T_0) simplesmente para facilitar a visualização do gráfico.

Figura 7. Comparação entre os valores de D para leite bovino e bubalino em diferentes temperaturas.



Diversas hipóteses podem ser levantadas para justificar o comportamento acima descrito: a ocorrência de um efeito protetivo dos glóbulos de gordura no leite de búfala variando com a temperatura; efeito protetivo das proteínas; diferenças estruturais na FA segundo a espécie; e retardo na transferência de calor devido aos altos teores de gordura e sólidos totais. Cada hipótese será discutida mais detalhadamente a seguir.

Efeito protetivo dos glóbulos de gordura: para investigar os diversos mecanismos potencialmente envolvidos nesse efeito, recorre-se à análise publicada por Mozhaev e Martinek (1982), em que se definem sete principais fenômenos envolvidos na inativação de uma enzima: agregação de proteínas; troca tiol/dissulfeto; alterações na estrutura primária; clivagem de ligações S-S; dissociação do grupo prostético do centro ativo da enzima; dissociação de proteínas oligoméricas em subunidades; e alterações conformacionais na macromolécula. A partir disso, aponta-se que esses fenômenos podem sofrer influência de fatores como os teores de lipídeos mais elevados no LB em relação ao LV (aprox. 5,6 g/100g, contra aprox. 3,6 g/100g), além do maior diâmetro médio (5 µm, contra 3,2 µm) e maior densidade dos glóbulos de gordura (AMARAL, 2005; TSAKALIDOU; PAPADIMITRIOU, 2016).

Conforme apontado por Kosikowski (1988) e Sharma et al., (2009), a FA se concentra na membrana do glóbulo de gordura do leite. Dessa forma, com relação ao fenômeno de agregação, tem-se que o maior tamanho dos glóbulos de gordura no LB contribui para uma redução da área interfacial entre as fases lipídica e aquosa, podendo contribuir para a redução de agregação entre as proteínas. O mesmo efeito poderia ser observado sobre o fenômeno de alterações conformacionais na macromolécula.

Em relação ao fenômeno de dissociação do grupo prostético do centro ativo da enzima, deve-se atentar ao íon Ca^{2+} , que é um grupo prostético da FA (CHU et al., 2019): além do teor mais alto de cálcio observado no LB em relação ao LV, a proporção de cálcio associado à fração lipídica atinge 13% no LB, contra apenas 1% no LV, o que pode impactar na estabilidade da enzima frente a alterações de temperatura (GAUCHERON, 2013; HUNT; NIELSEN, 2009).

Uma melhor elucidação da magnitude do efeito protetivo dos glóbulos de gordura nas enzimas do leite poderia ser obtida através de estudo comparativo de sua inativação em amostras de leite com diferentes teores de gordura ajustados.

Efeito protetivo das proteínas: conforme apontado por diversos autores (SANT'ANNA; CLADERA-OLIVERA; BRANDELLI, 2012; XIONG et al., 2005), o teor de proteínas pode exercer um efeito protetivo na inativação térmica de enzimas. O teor ligeiramente superior em proteínas no LB (aprox. 4,0 g/100g) com relação ao LV (3,7 g/100g) poderia colaborar para um aumento da resistência térmica no leite. A redução do efeito protetivo com o aumento de temperatura ocorreria, portanto, devido a uma desnaturação parcial das proteínas do leite que ocorre a partir de 60 °C (ČURDA et al. 1997). No entanto, a diferença não muito elevada entre os teores proteicos dos diferentes leites e o fato do mecanismo protetivo das proteínas na inativação enzimática ainda não estar bem elucidado prejudicam a sustentação dessa hipótese.

Diferenças estruturais da FA segundo a espécie: Wernery et al. (2008) apontaram que a FA em leite de camelos e dromedários não é um bom indicador de pasteurização, sendo a enzima muito mais termorresistente do que no leite de vaca. No entanto, a homologia dos proteomas dos leites bubalino, ovino e caprino para com o leite bovino é muito superior à de leites como o leite de camelos, dromedários, éguas ou o leite humano, conforme apontado por Tsakalidou e Papadimitriou (2016), que relataram ainda que LB e LV apresentaram homologia de 96,7% para a β -lactoglobulina e de 99,3% para a α -lactalbumina. No entanto, visto não haver estudos aprofundados sobre a estrutura da FA em LB, a hipótese de um efeito estrutural na resistência térmica dessa enzima não deve ser descartada.

Retardo na transferência de calor devido aos altos teores de gordura e sólidos totais: a presença de teores maiores de lipídeos e sólidos totais no leite provocam um aumento de sua viscosidade e, conseqüentemente, uma menor taxa de transferência de calor na amostra (SUN, 2012). No entanto, a metodologia adotada no presente estudo envolvendo tubos capilares tem como objetivo minimizar os efeitos da resistência às trocas de calor no interior da amostra; assim, a partir da consideração de que toda a amostra atinge o *setpoint* de temperatura simultaneamente, esse fenômeno não deve provocar efeitos significativos nos valores de *D*.

Analisando os dados já publicados para LB, não foi encontrado estudo algum em que tenham sido calculados parâmetros cinéticos para esse produto. Autores que investigaram a inativação térmica da FA em LB incluem: Lombardi et al. (2000), que relataram que tratamentos a 60 °C por 30 minutos e a 70 °C por 1 minuto foram

suficientes para reduzir os níveis da FA a zero; e Sharma et al. (2009), que relataram a inativação da FA para LV e LB após 15 s a 70 °C, em que os valores absolutos de atividade residual para LB foram maiores do que para LV ao longo do tempo, não tendo sido feita, no entanto, análise estatística.

Estudando-se a literatura para outras espécies de animais, aponta-se o estudo de Lorenzen et al. (2010), que avaliaram a inativação da FA em leites bovino, ovino e caprino. Os autores reportaram que apesar de uma resistência notavelmente maior da enzima no leite caprino em relação aos demais, o binômio 62 °C/30 min foi suficiente para inativar a enzima; relataram ainda que, embora a resistência térmica da FA no leite ovino tenha se mostrado semelhante à do leite bovino, sua concentração inicial superior fez com que o binômio 62 °C/30 min não fosse suficiente para garantir a inativação da enzima (a atividade obtida foi de 593 mU/L). Isso evidencia como diferenças sutis entre os parâmetros cinéticos de inativação da FA em leites de diferentes espécies podem não ser suficientes para influenciar a tomada de decisão quanto à efetividade da pasteurização, que se baseia em um critério qualitativo (enzima ativa ou inativa).

No entanto, é importante observar que ambos os binômios relatados na literatura como suficientes para a inativação da FA em LB (60 °C/30 min; 70 °C/15 s) estão abaixo das definições estabelecidas por órgãos reguladores (62-63 °C/30 min) (BRASIL, 2017b; EC, 2006; FDA, 2009). Já foi também descrita em amostras de LV a inativação da FA em binômios de subpasteurização, como 70 °C/16 s (FOX; KELLY, 2006). Esses resultados são obtidos através de métodos espectrofotométricos, cujo limite de quantificação (LOQ, *limit of quantification*) é relativamente alto: para o método A&M, o LOQ do método é 10 µg/mL; para outros métodos, como o método de Scharer, o LOQ é de 500 mU/L. Payne e Wilbey (2009) apontam que os valores obtidos através do método A&M (expressos em µg/mL) e os valores de atividade (mU/L) obtidos através de métodos como o de Scharer e o fluorimétrico demonstram entre si uma relação linear a uma proporção de 1:50 para valores acima de 10 µg/mL, facilitando a comparação entre resultados obtidos segundo diferentes métodos.

Em vista do acima disposto, a partir de 2005, países como os EUA (MICCICHE, 2005) e a Europa (EC, 2006) passaram a adotar como LOQ aceitável para testes de fosfatase alcalina o valor de 350 mU/L. Esse LOQ é inferior aos atingíveis através dos métodos espectrofotométricos, tornando-se necessária a

utilização de métodos fluorimétricos ou de quimioluminescência (PAYNE, WILBEY, 2009). No entanto, esse valor ainda é largamente superior ao esperado para um processo de pasteurização conduzido corretamente, onde se espera atividades na faixa de 30 mU/L (ECKNER, 1992).

O método fluorimétrico é capaz de detectar concentrações de leite cru tão baixas quanto 0,006% (CORNELL, 1998), o que equivale a 10 mU/L, enquanto os métodos espectrofotométricos detectam apenas concentrações de no mínimo 0,1 % de leite cru (cerca de 500 mU/L). O método oficial brasileiro, por outro lado, se baseia apenas em teste qualitativo, podendo apresentar limite de detecção superior a 0,8% de leite cru adicionado, por exemplo, ao leite pasteurizado (MARTINS, 2006).

A implementação de uma norma exigindo a realização de testes fluorimétricos ou de quimioluminescência em todas as unidades processadoras de leite no Brasil não apresenta viabilidade econômica atualmente; dessa forma, faz sentido que a regulamentação brasileira, sobretudo para pequenos produtores, mantenha o binômio 62 °C/30 min como binômio aceitável de pasteurização, uma vez que este se mostrou suficiente para a inativação completa da fosfatase alcalina tanto para LV quanto para LB, segundo o método adotado no presente estudo. Para a garantia de que o leite pasteurizado tenha atingido o binômio de 63 °C/30 min, conforme preconizado pelas legislações europeia e estadunidense (EC, 2004; FDA, 2009), seria necessário no Brasil a revisão dos métodos aceitos para avaliação da FA, ou sua substituição por outra enzima indicadora, como a gama glutamil transferase (GGT), conforme proposto por Anjos et al. (1998), a fim de garantir a aplicação de tal binômio.

Nesse contexto, buscou-se realizar a avaliação microbiológica do binômio 62 °C/30 min, limítrofe da subpasteurização, para a microbiota autóctone e para microrganismos indicadores. Os resultados são expostos a seguir.

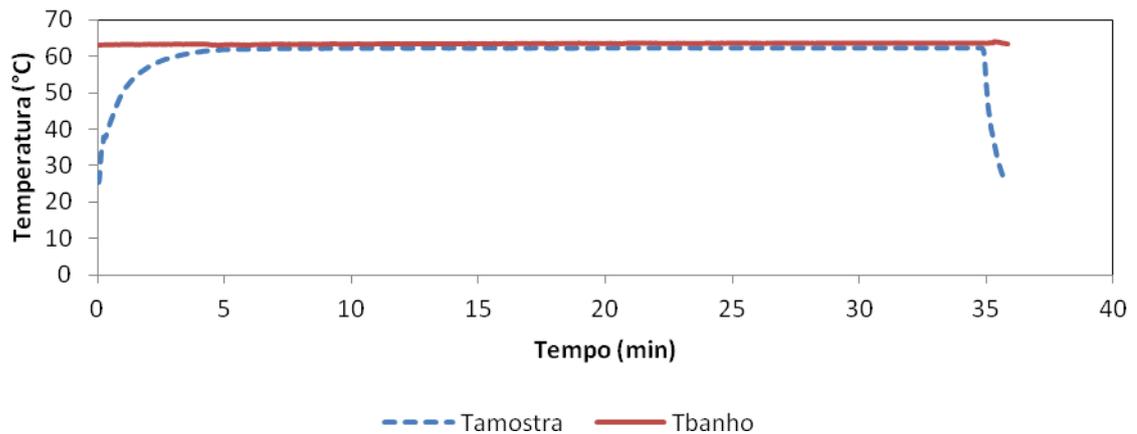
5.2. Avaliação microbiológica do efeito de pasteurização LTLT no leite bubalino

As amostras de LB (*in natura* e esterilizada e inoculada com bactérias indicadoras) foram submetidas ao binômio 62 °C/30 min, e suas temperaturas monitoradas ao longo do tempo. Na Figura 8, são mostrados perfis de temperatura representativos para leite bubalino *in natura* (LBI) e para leite bubalino esterilizado

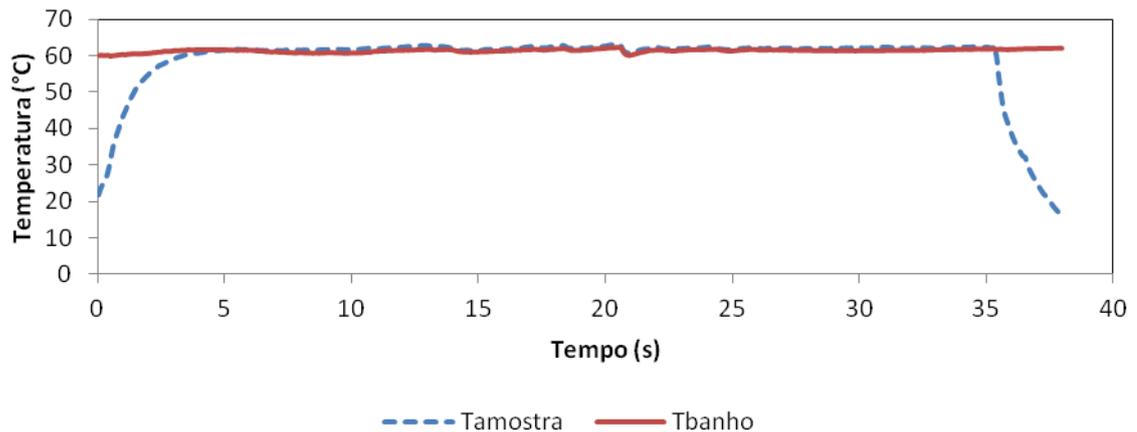
inoculado com bactérias indicadoras (LBE). Todos os demais experimentos para os respectivos leites LBI e LBE seguiram perfis de temperatura semelhantes, por isso não serão apresentados no presente trabalho.

Figura 8. Perfis de temperatura representativos das amostras (Tamostra) e dos banhos termostáticos (Tbanho) para leite bubalino *in natura* (a) e leite bubalino esterilizado inoculado com *Listeria monocytogenes* (b) para o binômio 62 °C/30 min.

(a)



(b)



Por meio de uma análise visual, notou-se que as amostras de LBE exibiram pequenos grumos devido à coagulação do leite, de acordo com o esperado para um processo de esterilização em batelada. No entanto, os grumos não prejudicaram a coleta de amostras ou a homogeneização dos inóculos. Comparou-se os tempos necessários para se atingir o *setpoint* de temperatura a fim de verificar se a formação de grumos impactou a transferência de calor do banho para a amostra.

Considerou-se o atingimento do *setpoint* quando a temperatura da amostra atingiu 61,5 °C. Os valores obtidos foram: $4,27 \pm 0,37$ min e $4,90 \pm 0,25$ min para LBI e LBE, respectivamente. Através de um teste de comparação t de *Student*, não foi verificada diferença significativa entre os tempos acima mencionados, indicando que o aquecimento das amostras ocorreu de forma semelhante em todos os experimentos.

5.2.1. Avaliação da microbiota autóctone

As amostras de LB *in natura* após tratamento térmico exibiram resultados negativos no teste qualitativo e também no teste quantitativo de A&M para atividade enzimática da FA (atividade < 10 µg/mL), ou seja, o processamento seria considerado adequado de acordo com os procedimentos rotineiros na indústria. Os valores obtidos para microrganismos mesófilos totais, termófilos totais e psicotróficos totais são expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Contagens bacterianas no leite de búfala *in natura* (LBI) antes (0 min) e após (30 min) a pasteurização. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Contagem	Amostra LBI / 0 min (log UFC/mL)	Amostra LBI / 30 min (log UFC/mL)	Redução (log UFC/mL)
Mesófilos totais	5,41 \pm 0,02	3,69 \pm 0,04	1,72
Termófilos totais	3,77 \pm 0,20	1,89 \pm 0,04	1,88
Psicotróficos totais	4,20 \pm 0,08	< LOD	3,2

As Contagens de Mesófilos Totais antes do tratamento térmico ($2,6 \times 10^5$ mL) estão de acordo com o descrito por Godinho et al. (2019), que relataram 3×10^5 UFC/mL para o leite de búfala produzido no Rio Grande do Sul, Brasil, e Da Costa Filho et al. (2014), que relataram $2,6 \times 10^5$ mL para LB produzido no Rio Grande do Norte, Brasil.

Confrontando os resultados obtidos com a Instrução Normativa 76/2018, que versa sobre leite em geral a nível nacional (BRASIL, 2018), e com a Res. SAA 24/1994, utilizada no estado de São Paulo especificamente para o leite bubalino (SÃO PAULO, 1994), percebe-se que o LBI antes do tratamento térmico apresentou Contagens de Mesófilos Totais (260 000 UFC/mL) inferiores aos máximos permitidos tanto pela legislação nacional (900 000 UFC/mL) quanto pela legislação específica paulista (500 000 UFC/mL);). O valor obtido para Contagem de Mesófilos Totais

após a pasteurização (4 900 UFC/mL) também se mostrou de acordo com a legislação proposta pelo estado de São Paulo (máx. 40 000 UFC/mL). A legislação nacional não versa sobre valores máximos para microrganismos mesófilos. Dessa forma, pode-se estimar que o tratamento térmico a 62 °C/30 min foi suficiente para garantir um leite inócuo ao consumidor. Uma validação completa seria possível realizando ainda a quantificação de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae antes e após o tratamento térmico, o que não foi o foco do presente trabalho.

O valor obtido na Contagem de Psicotróficos Totais (4,20 log UFC/mL) está em conformidade com Duangpan e Suriyaphan (2009), que encontraram valores variando de 2,52 a 5,76 log UFC/mL. Vale ressaltar que a concentração de microrganismos psicotróficos sofre grande impacto do tempo de armazenamento, em que as temperaturas de refrigeração, ao mesmo tempo em que retardam o desenvolvimento dos demais microrganismos, tornam o ambiente propício para o desenvolvimento das bactérias psicotróficas devido à redução da competição pelo substrato. A multiplicação de psicotróficos deve ser evitada, pois em concentrações elevadas produzem enzimas termodúricas que podem reduzir a vida útil do produto, podendo produzir também fosfatase alcalina termorresistente, que resultará em falsas indicações durante o processo de pasteurização (SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L., 1997).

Não foi possível detectar microrganismos psicotróficos após a pasteurização, conforme esperado, uma vez que esse processo deveria ser capaz de eliminá-las quase que completamente (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). Não há especificações na legislação brasileira quanto a contagens de microrganismos psicotróficos em leite.

Com relação às Contagens de Termófilos Totais, obteve-se um valor de 3,77 log UFC/mL no leite não tratado. Garg e Mandokhot (1997) relataram valores de 3,48 log UFC/mL para esse grupo de microrganismos em LBI, e Chye, Abdullah e Ayob (2004) relataram valores de 3,78 – 4,08 log UFC/mL, ambos próximos ao encontrado no presente estudo. Uma vez que a Contagem de Termófilos Totais não é habitualmente utilizada como parâmetro sanitário para leite fluido, são raros os estudos que avaliaram a eficiência da pasteurização nesse grupo de microrganismos. Não foram encontrados estudos nessa área para LB; para LV, Kikuchi et al. (1996) relataram em leite pasteurizado comercial contagens de bactérias termodúricas de cerca de 2 log UFC/mL, podendo atingir até 3 log

UFC/mL; sugere-se então que os valores obtidos para microrganismos termófilos no LBI tratado a 62 °C/30 min estão dentro dos padrões de qualidade do leite pasteurizado.

Assim, tem-se que o leite bubalino pasteurizado sob o binômio 62 °C/30 min se mostrou apto ao consumo, de acordo com a legislação vigente em São Paulo para o leite de búfala. Apesar de um maior valor *D* para inativação da FA em leite bubalino, sugere-se que os valores mais altos de lipídeos e de sólidos totais no LB não tenham exercido efeito protetivo apreciável sobre os microrganismos ao ponto de inviabilizar a obtenção da inocuidade do produto, seguindo o mesmo binômio proposto para LV.

5.2.2. Avaliação utilizando microrganismos indicadores

Na Tabela 9, são apresentados os resultados obtidos na pasteurização do leite de búfala esterilizado inoculado com microrganismos indicadores (LBE). A maior redução logarítmica devido à pasteurização foi observada para *P. aeruginosa*, bactéria Gram-negativa psicrotrófica, com uma redução de 4,62 log UFC/mL. Para os demais microrganismos, obteve-se uma inativação na faixa de 3,5 log UFC/mL. Nenhum dos microrganismos testados exibiu uma inativação de cinco ciclos logarítmicos, valor considerado padrão para a pasteurização (FELLOWS, 2018).

A redução das contagens obtidas para *L. monocytogenes* foi de 3,76 log UFC/mL; o fato de a maior parte dos estudos trabalharem com a avaliação dessa bactéria em termos de presença/ausência (em função das diversas legislações que adotam esse critério para esse microrganismo) dificulta a comparação quantitativa com a literatura. Ainda assim, é possível contrastar os resultados obtidos com o estudo de Eckner (1992), que realizou a inoculação de aprox. 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes* em leite bovino, e submeteu as amostras à pasteurização a diferentes temperaturas (63 °C, 65 °C, 67 °C, 71°C). Para todas as amostras que demonstraram inativação da FA em seu estudo, foi verificada ausência da bactéria indicadora; isso indica que seu processo de pasteurização foi capaz de reduzir a concentração de *L. monocytogenes* em, pelo menos, 4 log UFC/mL (de modo a garantir uma concentração final <1 UFC/mL). Os resultados do presente estudo indicam que o processo de pasteurização do LB se mostrou menos efetivo do que o proposto por Eckner (1992), de forma que uma amostra com contaminação inicial de

10⁴ UFC/mL (cenário crítico) não teria sua inocuidade garantida pelo binômio 62 °C/30 min para LB.

Tabela 9. Análises microbiológicas do leite de búfala esterilizado inoculado (LBE) com bactérias indicadoras antes (0 min) e após (30 min) a pasteurização. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Contagem	Amostra LBE / 0 min (log UFC/mL)	Amostra LBE 30 min (log UFC/mL)	Redução (log UFC/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	7,26 ± 0,07	3,50 ± 0,36	3,76
<i>P. aeruginosa</i>	7,01 ± 0,02	2,39 ± 0,15	4,62
<i>E. coli</i>	7,26 ± 0,02	4,05 ± 0,11	3,21
<i>S. aureus</i>	7,24 ± 0,01	4,00 ± 0,40	3,24

Com relação a *P. aeruginosa*, observou-se a maior taxa de inativação entre os microrganismos testados (4,62 log UFC/mL). Tomando essa espécie como representativa do gênero *Pseudomonas*, que inclui inúmeras bactérias de importância na degradação do leite, a literatura revela que a concentração de *Pseudomonas* spp. no leite bovino *in natura* pode ser tão baixa quanto 0,92 log UFC/mL (BATTOOL et al., 2012) ou tão alta quanto 6,6 log UFC/mL (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; Scatamburlo et al., 2015). De acordo com Sørhaug e Stepaniak (1997), a pasteurização deveria ser capaz de inativar praticamente a totalidade das bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. dentro de seu caráter psicrotófico, sendo a maior causa da proliferação desse microrganismo no leite a contaminação pós-pasteurização. A partir disso, tem-se que a redução alcançada através do binômio 62 °C/30 min para o LB foi insatisfatória para *P. aeruginosa*, e poderia ocasionar degradação acelerada do produto pós-pasteurização.

Avaliando as contagens de *E. coli*, ressalta-se que, de acordo com a RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001, o valor máximo aceitável para coliformes termotolerantes (*E. coli*) em leite pasteurizado é de 4 UFC/mL, valor este normalmente quantificado através do método do Número Mais Provável (NMP). Uma vez que as concentrações de *E. coli* descritas na literatura giram em torno de 1,5 log UFC/mL (HAN et al., 2007), é possível imaginar que o tratamento descrito no presente estudo, que garantiu uma redução de 3,21 log UFC/mL no LB, seria adequado para garantir a inocuidade do leite processado dentro das normas

vigentes para esse microrganismo. No entanto, faz-se a ressalva de que cepas de *E. coli* que desenvolveram termorresistência podem apresentar valores de *D* até 10 vezes maiores do que as cepas regulares, incluindo a *E. coli* O157:H7, com alta virulência; dessa forma, recomenda-se uma maior margem de segurança no binômio adotado para a pasteurização nesse caso (LI; GÄNZLE, 2016).

Referindo-se ao microrganismo indicador *S. aureus*, a redução decimal obtida no presente estudo foi de 3,24 ciclos logarítmicos. Um estudo publicado por Gürler et al. (2013) revelou contagens de até 2,46 log UFC/mL desse microrganismo em leite bubalino *in natura*, enquanto Han et al. (2007) relataram contagens de cerca de 1,80 log UFC/mL. Necidova et al. (2016), partindo de concentrações de *S. aureus* inoculado em leite bovino na faixa de 8,7 log UFC/mL, obtiveram para um tratamento HTST (72 °C/15 s) reduções superiores a 6 ciclos logarítmicos, com concentrações finais da bactéria entre 0,85 e 2,47 log UFC/mL. Os mesmos autores relataram ainda que concentrações mínimas ou abaixo do limite de quantificação desse microrganismo podem ser suficientes para provocar quadros de enterotoxose estafilocócica. De acordo com EC (2005) e Necidova et al. (2012), contagens de 5 log UFC/mL para *S. aureus* são consideradas como contagens de alto risco, em que ocorre a produção de enterotoxinas; em vista disso, a redução decimal obtida no presente estudo não seria suficiente para garantir a eliminação do microrganismo no leite quando este estivesse em concentrações próximas a 5 log UFC/mL. Assim, sugere-se que a redução obtida foi insuficiente e incapaz de garantir a inocuidade do produto final.

É importante ressaltar que, nessa etapa do trabalho, optou-se pela inoculação de concentrações excepcionalmente altas dos microrganismos indicadores a fim de garantir uma melhor observação de sua inativação. As concentrações efetivas esperadas de tais bactérias no LB sob condições normais de produção são notadamente inferiores.

Os resultados aqui apresentados levam a conclusão de que o binômio 62 °C/30 min, capaz de inativar a fosfatase alcalina segundo os testes adotados no Brasil, é capaz de garantir a adequação do produto final à legislação pertinente; no entanto, esse binômio é insuficiente para garantir a inativação bacteriana para leite bubalino obtido sem boas práticas agropecuárias, onde as condições higiênico-sanitárias estariam comprometidas em sua ordenha e conservação. Dessa forma, sugere-se a adoção de binômios ligeiramente mais intensos de pasteurização, como 63 °C/30

min ou 72 °C/15 s, para a garantia da inocuidade desse produto, bem como a realização de mais estudos da pasteurização de leite bubalino, a fim de estabelecer binômios seguros e capazes de conservar ao máximo as propriedades do leite de búfala.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a cinética de inativação da fosfatase alcalina (enzima indicadora consolidada para o leite bovino) e avaliar microbiologicamente a pasteurização do leite bubalino, comparando os resultados obtidos.

Os dados experimentais de inativação da fosfatase alcalina em leite bubalino foram adequadamente ajustados ao modelo cinético de primeira ordem proposto, obtendo valores satisfatórios para os coeficientes de ajuste. Além disso, foi possível a obtenção dos valores de z através do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Bigelow. Os valores de D obtidos para o leite bubalino foram significativamente diferentes dos valores D para o leite bovino para baixas temperaturas de pasteurização (62 e 65 °C), indicando que a fosfatase alcalina no leite bubalino apresentou maior resistência térmica, possivelmente devido aos maiores teores de lipídeos e tamanho dos glóbulos de gordura. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas (68, 72 e 75 °C) não houve diferença significativa entre os valores D para os dois tipos de leites.

O valor z para o leite bubalino foi inferior ao obtido para leite bovino, o que justifica que a temperaturas mais elevadas (68, 72 e 75 °C) os valores de D calculados para ambas as amostras tenha sido semelhantes.

Foi verificado ainda que, embora os valores de D para fosfatase alcalina em leite bovino e bubalino sejam estatisticamente diferentes, os métodos utilizados no Brasil para quantificação de sua atividade não foram capazes de acusar uma atividade residual da enzima em uma situação limítrofe de subpasteurização (62 °C/30 min). A adoção de métodos mais precisos, sobretudo em baixas concentrações, de quantificação da atividade da fosfatase alcalina, a longo prazo, poderá contribuir para a garantia da segurança dos alimentos ao consumidor.

Realizando-se a avaliação do efeito da pasteurização LTLT na microbiota autóctone do leite bovino, observou-se que o binômio limítrofe de subpasteurização (62 °C/30 min) foi suficiente para garantir um produto apto ao consumo humano. Vale ressaltar que a legislação não estipula valores obrigatórios para as contagens de microrganismos termófilos e psicotróficos em leites.

Já na avaliação utilizando microrganismos indicadores, observou-se que o binômio 62 °C/30 min não foi capaz de reduzir as contagens de bactérias

patogênicas (e. g. *L. monocytogenes*) e deteriorantes (e. g. *P. aeruginosa*) testadas até níveis satisfatórios. Dessa forma, embora o binômio 62 °C/30 min, que é aceito no Brasil para estabelecimentos agroindustriais, seja suficiente para tornar o leite bubalino aceitável sob as exigências da legislação, não garante a inocuidade do produto obtido sob condições higiênico-sanitárias inadequadas, podendo reduzir a vida útil do produto e oferecer risco a populações vulneráveis.

Dessa forma, em vista da maior resistência térmica observada tanto para a enzima fosfatase alcalina quanto para microrganismos no leite de búfala, sugere-se que seja adotado o binômio 63 °C/30 min ou superior sempre que possível, e senão, que sejam redobradas as medidas de segurança sanitária de modo a fornecer uma matéria-prima de excelente qualidade microbiológica e minimizar as fontes de contaminação ao longo do processo.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao trabalho aqui apresentado, sugere-se a investigação dos fenômenos que proporcionam a maior resistência térmica à fosfatase alcalina no leite bubalino em temperaturas de pasteurização LTLT, através de análises da membrana do glóbulo de gordura e das estruturas primárias das proteínas dos diferentes leites. Além disso, sugere-se a realização de mais testes envolvendo binômios próximos ao limite preconizado pela legislação brasileira, de modo a validar se os métodos utilizados atualmente na indústria são capazes de detectar situações limítrofes de subpasteurização; e a modelagem da inativação microbiana no leite de búfala para os demais tratamentos térmicos aqui propostos, a fim de permitir uma comparação direta entre os parâmetros enzimáticos e microbiológicos.

Sugere-se ainda a realização de testes envolvendo a inoculação simultânea de mais de um microrganismo no leite bubalino, a fim de estudar possíveis interações e seu impacto na resistência térmica microbiana, buscando reproduzir o comportamento da microbiota naturalmente encontrada no leite *in natura*.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, O. M. M. ; IBRAHIM, N. N. M. Chemical and microbiological evaluation of Mozzarella cheese during storage. **Austr J Basic Appl Sci**, v. 4, p. 532-536, 2010.

AHMAD, S. et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. **J Anim Plant Sci**, v. 23, p. 62-74, 2013.

AMARAL, Fabricio Rodrigues. Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas. 2005.

ANDRADE, K. D. et al. Efeito da estação do ano na qualidade do leite de búfala. Efeito da Estação do Ano na Qualidade do Leite de Búfala: **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 3, n. 6, p.33-37, 2011.

ANDRADE, R. B; OLIVEIRA, T. C. DE; KICH, J. Pesquisa de fosfatase alcalina em leite fluido por colorimetria. Método de Ensaio de Produto de Origem Animal (METPOA), Rio Grande do Sul. 2013.

ANDREOTTI, G. et al. Milk identification of different species: ¹³C-NMR spectroscopy of triacylglycerols from cows and buffaloes' milks. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 11, p. 2432-2437, 2000.

ANDRIGHETTO, C. Cadeia produtiva do leite de búfala: visão da universidade. **SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA BUBALINOCULTURA**, v. 2, 2011.

ANJOS, Filomena dos et al. Gamma-glutamyltransferase as a marker for the pasteurization of raw milk. **Journal of food protection**, v. 61, n. 8, p. 1057-1059, 1998.

APONTE, M.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G. Identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 6, p. 2358-2361, 2010.

ARORA, Sumit; KHETRA, Yogesh. Buffalo Milk Cheese. In: Cheese. Academic Press, 2017. p. 1093-1101.

ASCHAFFENBURG, R.; MULLEN, J. E. C. 381. A rapid and simple phosphatase test for milk. **Journal of Dairy Research**, v. 16, n. 1, p. 58-67, 1949.

BARŁOWSKA, J. et al. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 10, n. 6, p. 291-302, 2011.

BATOOL, Syeda Afifa et al. Microbial and physico–chemical quality assessment of the raw and pasteurized milk supplied in the locality of Twin city of Pakistan. **Internet Journal of Food Safety**, v. 14, p. 17-22, 2012.

BIGELOW, W. D. Structural model requirements to describe microbiological inactivation during mild heat treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 29, p. 528-536, 1921.

BONFATTI, V. et al. Protein composition affects variation in coagulation properties of buffalo milk. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 7, p. 4182-4190, 2013.

BRASIL. Instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Brasília, DF: Diário Oficial da União de 14dez. 2006. Seção 1, Página 8.

BRASIL. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017). Diário Oficial [da]

República Federativa do Brasil, 2017a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº5 de 14 de fevereiro de 2017. Diário Oficial da União. Brasília. 2017b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 139, n. 7-E, 2001.

BROCHIER, Bethania. Efeito do campo elétrico na inativação de enzimas do caldo de cana durante aquecimento ôhmico. 2018.

CHILLIARD, Yves; FERLAY, Anne. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 5, p. 467-492, 2004.

CHYE, Fook Yee; ABDULLAH, Aminah; AYOB, Mohd Khan. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food microbiology**, v. 21, n. 5, p. 535-541, 2004.

CLAEYS, W. L. et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188-201, 2014.

ČURDA, L. et al. Assessment of heat-induced denaturation of whey proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 772, n. 1-2, p. 231-234, 1997.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. **Dairy Science Facts**. Department of Food Sciences. Stocking Hall, Ithaca, NY 14853. 1998.

DA COSTA FILHO, Marco Hamilton Barros et al. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 3, p. 201-208, 2014.

DE LIMA, Tábatta Cristine Chaves et al. COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE E DO SORO DO LEITE DE BÚFALAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORT. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 1, p. 25-30, 2014.

DEVLE, Hanne et al. A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 9, p. 1036-1043, 2012.

DEVOLD, Tove G. et al. Extreme frequencies of the α s1-casein “null” variant in milk from Norwegian dairy goats—implications for milk composition, micellar size and renneting properties. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 1, p. 39-51, 2011.

DIXIT, Shikha Jaiprakash; APPU KUTTAN, K. K.; SINGH, Kiran. Study of human allergic milk whey protein from different mammalian species using computational method. **Bioinformatics**, v. 8, n. 21, p. 1035, 2012.

DUANGPAN, Wira et al. Preliminary assessment of microbiological quality of raw buffalo milk commercially produced in Thailand. **Food Ag-Ind**, p. 368-373, 2009.

EC (EUROPEAN COMMISSION). European Commission Regulation (EC) No. 1662/2006 of 6 November 2006 amending Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal of the European Commission**, v. 320, p. 1-10, 2006.

EC (EUROPEAN COMMISSION). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Off. J. Eur. Union**, v. 50, p. 1-26, 2005.

ECKNER, KARL F. Fluorometric analysis of alkaline phosphatase inactivation correlated to Salmonella and Listeria inactivation. **Journal of food protection**, v. 55, n. 12, p. 960-963, 1992.

EL-SALAM, Mohamed H. Abd; EL-SHIBINY, Safinaz. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy science & technology**, v. 91, n. 6, p. 663, 2011.

ERCOLINI, Danilo et al. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 22, p. 8142-8145, 2012.

ERCOLINI, D. et al. PCR–DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 263-270, 2004.

FACCHIN, Susanne et al. Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 701-707, 2013.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. 2019. Disponível em : <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em 03 nov. de 2019.

FDA (US Food and Drug Administration). Standards for grade "A" milk and milk products. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. Standards for Grade "A" Milk and Milk Products. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, DC. 2015.

FELLOWS, Peter J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos-: Princípios e Prática**. Artmed Editora, 2018.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. ArtMed Editora, 2013.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 517-532, 2006.

FUQUAY, John W.; MCSWEENEY, Paul LH; FOX, Patrick F. **Encyclopedia of dairy sciences**. Academic Press, 2011.

GARG, S. R.; MANDOKHOT, U. V. Reliability of rapid and routine quality control tests for grading raw milk under Indian conditions. **Journal of food science and technology**, v. 34, n. 4, p. 357-359, 1997.

GAUCHERON, Frédéric. Diversité des laits et des produits laitiers dans le monde. 2011. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01454303/>. Acesso em 03 nov. 2019.

GAUCHERON, Frédéric. Milk minerals, trace elements, and macroelements. **Milk and dairy products in human nutrition: Production, composition and health**, p. 172-199, 2013.

GODINHO, Fernanda. 2019. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. Não publicado.

GRAPPIN, Rémy; BEUVIER, Eric. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 751-761, 1997.

GUL, O. et al. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015.

GÜRLER; Z. et al. Chemical and microbiological quality of Anatolian Buffalo milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 16, p. 1512-1517, 2013.

HAN, Bei-Zhong et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 742-746, 2007.

HASHMI, Seema; SALEEM, Quazi. An investigation on microbiological and chemical quality of buffalo milk supplies. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 1, p. 78-83, 2015.

HASHMI, Seema; SALEEM, Quazi. Microbiological and chemical analysis of buffalo milk supplies of beed district. **Journal of Advances in Applied Sciences and Technology**, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2014.

HOLSINGER, V. H.; RAJKOWSKI, K. T.; STABEL, J. R. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. **Revue scientifique et technique-Office international des epizooties**, v. 16, n. 2, p. 441-466, 1997.

HUNT, C. D.; NIELSEN, F. H. Nutritional aspects of minerals in bovine and human milks. In: **Advanced dairy chemistry**. Springer, New York, NY, 2009. p. 391-456.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. Sistema IBGE de recuperação automática SIDRA. 2018. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1092&z=t&o=24>>. Acesso em: 5 de dezembro de 2019.

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION). Milk and dried milk, buttermilk and buttermilk powder, whey and whey powder-phosphatase activity (screening method), 1987.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1302-1310, 2006.

JORGE, Andres Mendes et al. **Produção de búfalas de leite**. Fepaf (Fundacao de Estudos e Pesquisas Agricolas e Florestais), 2011.

KAY, H. D.; GRAHAM, W. R. 73. Phosphorus Compounds of Milk. VI. The Effect of Heat on Milk Phosphatase. A Simple Method for Distinguishing Raw from Pasteurised Milk, Raw from Pasteurised Cream, and Butter made from Raw Cream from that made from Pasteurised Cream. **Journal of Dairy Research**, v. 5, n. 1, p. 63-74, 1933.

KIARELLY, D; ARAUJO, G; GHELLERT, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.77-83. 2005.

KIKUCHI, M. et al. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies and commercial pasteurized milk. **Animal Science and Technology (Japan)**, 1996.

KOSIKOWSKI, Frank V. Enzyme behavior and utilization in dairy technology. **Journal of dairy science**, v. 71, n. 3, p. 557-573, 1988.

LADERO, M., SANTOS, A., & GARCÍA-OCHOA, F. (2006). Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 38, 1–9.

LEVIEUX, Didier; GENEIX, Nathalie; LEVIEUX, Annie. Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. **Journal of dairy research**, v. 74, n. 3, p. 296-301, 2007.

LI, Hui; GÄNZLE, Michael. Some like it hot: heat resistance of *Escherichia coli* in food. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1763, 2016.

LOMBARDI, P. et al. Buffalo-milk enzyme levels, their sensitivity to heat inactivation, and their possible use as markers for pasteurization. **Journal of food protection**, v. 63, n. 7, p. 970-973, 2000.

LOSITO, Francesca et al. Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 1, p. 46-55, 2014.

LOVEDAY, Simon M. β -Lactoglobulin heat denaturation: A critical assessment of kinetic modelling. **International dairy journal**, v. 52, p. 92-100, 2016.

LUDI KHUYZE, L.; CLAEYS, Wendie; HENDRICKX, Marc. 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.

MAHON, Connie R.; LEHMAN, Donald C.; MANUSELIS, George. **Textbook of diagnostic microbiology-e-book**. Elsevier Health Sciences, 2018.

MARCHAND, Sophie et al. Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk. **International dairy journal**, v. 19, n. 12, p. 763-767, 2009.

MARTINI, Mina; ALTOMONTE, Iolanda; SALARI, Federica. Amiata donkeys: fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 1, p. 3118, 2014.

Martins, F. de O. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM QUEIJO MINAS PADRÃO DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS INTERNACIONAIS. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

MEDHAMMAR, Elinor et al. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 445-474, 2012.

MEGHWAL, Karuna; PATRA, Falguni; RAO, Priyanka Singh. A consensus and controversies over the index organism for milk pasteurization: A brief review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 5, p. 873-876, 2018.

MICCICHE, Ken. Regulation & pasteurisation. **Dairy industries international**, v. 70, n. 11, p. 44-45, 2005.

MIELKE, Laís Fernanda; SUÑÉ, R. W.; MÜLLER, Mylene. Composição do leite de vacas da raça Jersey recebendo diferentes níveis de suplementação. In: **Embrapa Pecuária Sul-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 10.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 10.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 11., 2011, Maceió. Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011., 2011.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, Karel. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 5, p. 299–309, 1982.

MULINARI, Eduardo Luis; ROSOLEN, Michele Dutra; ADAMI, Fernanda Scherer. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITE PASTEURIZADO PRODUZIDO NO RIO GRANDE DO SUL. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 14, n. 1, 2017.

NECIDOVA, Lenka et al. Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. **Acta Veterinaria Brno**, v. 81, n. 4, p. 391-396, 2013.

NECIDOVA, Lenka et al. Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 11, p. 8638-8643, 2016.

PAYNE, Clare; WILBEY, R. Andrew. Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures. **International journal of dairy technology**, v. 62, n. 3, p. 308-314, 2009.

PIGNATA, Mirelle Costa et al. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 226-233, 2014.

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; MARTINS, Maurílio Lopes; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Microbial quality of raw refrigerated milk and isolation of psychrotrophic proteolytic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PISANO, Maria Barbara et al. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. **Food chemistry**, v. 192, p. 618-624, 2016.

POTTER, Norman N.; HOTCHKISS, Joseph H. **Food science**. Springer Science & Business Media, 2012.

RAHIMI, Ebrahim et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, caprine, and camel herds in Iran as determined by polymerase chain reaction. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 2, p. 307-310, 2011.

RANKIN, S. A. et al. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5538-5551, 2010.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small ruminant research**, v. 79, n. 1, p. 57-72, 2008.

ROCCO, R. M. Alkaline phosphatase methods. **Standard methods for the examination of dairy products**, p. 341-362, 2004.

SANNINO, M. et al. Effects of an automatic milking system on milk yield and quality of Mediterranean buffaloes. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 9, p. 8308-8312, 2018.

SANT'ANNA, Voltaire; CLADERA-OLIVERA, Florencia; BRANDELLI, Adriano. Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. **Food chemistry**, v. 130, n. 1, p. 84-89, 2012.

SÃO PAULO. Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Resolução SAA n.º 24, de 01 de agosto de 1994. Normas técnicas sobre as condições higiênico sanitárias mínimas necessárias para a aprovação, funcionamento e reaparelhamento dos estabelecimentos de produtos de origem animal. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=33>. Acesso em 3 nov. 2019.

SARKAR, S. et al. Microbiological considerations: pasteurized milk. **International Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 5, p. 206-218, 2015.

SCATAMBURLO, T. M. et al. Spoilage potential of Pseudomonas species isolated from goat milk. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 2, p. 759-764, 2015.

SCHLIMME, E. et al. Chemical process parameters for thermal inactivation of alkaline phosphatase in milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 49, n. 3, p. 207-219, 1997.

SHAMSI, Kambiz et al. Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 9, n. 2, p. 217-223, 2008.

SHAHZAD, M. Aasif et al. Nutrient utilization and milk yield response of early lactating Nili-Ravi buffaloes fed on urea–molasses treated wheat straw fermented with cattle manure. **Livestock Science**, v. 139, n. 3, p. 271-276, 2011.

SHOJI, Adriana Sati et al. Viability of L. acidophilus microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 2, p. 83-88, 2013.

SILVA, M. S. T.; et al. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores** - PRONAF. Pará, agosto de 2003. Disponível em: <www.cpatu.br/bufalo>. Acesso em: 03 de nov. de 2019.

SILVA, L. F. et al. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 2, p. M411-M417, 2015.

SKEIE, S. B. et al. The influence of the deletion in exon 12 of the gene encoding α 1-casein (CSN1S1) in the milk of the Norwegian dairy goat breed on milk coagulation properties and cheese quality. **Small ruminant research**, v. 122, n. 1-3, p. 50-58, 2014.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

STĂNCIUC, Nicoleta et al. Kinetic and thermodynamic parameters of alkaline phosphatase and γ -glutamyl transferase inactivation in bovine milk. **Dairy science & technology**, v. 91, n. 6, p. 701, 2011.

SUN, Da-Wen. **Thermal food processing: new technologies and quality issues**. Crc Press, 2012.

TONDO, E. C., BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**, Editora Porto Alegre: Meridional, 2011, 33-34.

TSAKALIDOU, Effie; PAPADIMITRIOU, Konstantinos (Ed.). **Non-bovine milk and milk products**. Academic Press, 2016.

VAMVAKAKI, A.-N. et al. Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. **Small Ruminant Research**, v. 65, n. 3, p. 237-241, 2006.

VEGA-WARNER, A. V. et al. Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. **Journal of food science**, v. 64, n. 4, p. 601-605, 1999.

VERGARA, Diana María Bolívar et al. Parámetros genéticos para características reproductivas en una población de búfalos (*Bubalus bubalis* Artiodactyla, Bovidae) en el Magdalena Medio Colombiano. **Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín**, v. 63, n. 2, p. 5587-5594, 2010.

XIONG, Ya-Hong et al. Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*. **Journal of biotechnology**, v. 119, n. 4, p. 348-356, 2005.

WALSTRA, Pieter et al. **Dairy science and technology**. CRC press, 2005.

WERNERY, U. et al. Evaluation of alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transferase (GGT) and lactoperoxidase (LPO) activities for their suitability as markers of camel milk heat inactivation. **Milchwissenschaft**, v. 63, n. 3, p. 265-267, 2008.

WIJESINHA-BETTONI, R. et al. Milk and dairy product composition. **Milk and dairy products in human nutrition**, p. 41-102, 2013.