

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

Review: Effect of high pressure hydrostatic processing on the physical-chemical, microbiology and nutritional features of bovine milk

Autores | Authors

Sérgio Bertelli PFLANZER
Adriano Gomes da CRUZ
Camila Lie HATANAKA
Mirna Lucia GIGANTE

Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)
Faculdade de Engenharia de Alimentos
(FEA)

Departamento de Tecnologia de Alimentos
e-mail: sergio83@fea.unicamp.br
adriano@fea.unicamp.br
hatanaka@fea.unicamp.br
mirna@fea.unicamp.br

Leila Maria SPADOTI

Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)
Centro de Pesquisa e
Desenvolvimento de Laticínios
e-mail: lspadoti@ital.sp.gov.br

✉ **Marcelo CRISTIANINI**

Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)
Faculdade de Engenharia de Alimentos
(FEA)
Departamento de Tecnologia de Alimentos
Caixa Postal: 6121
CEP: 13083-862
Campinas/SP - Brasil
e-mail: olecram@fea.unicamp.br

■ **Resumo**

O uso da alta pressão no processamento do leite bovino mostra-se promissor. Esta revisão aborda os aspectos de processamento da alta pressão assim como de seus efeitos sobre os constituintes do leite. Adicionalmente, relata a influência desta tecnologia sobre a qualidade microbiológica, físico-química e nutricional do leite bovino.

Palavras-chave: *Alta pressão; Qualidade; Leite.*

■ **Summary**

The use of high pressure in bovine milk processing has been shown to be promising. This review covers the aspects involved in high pressure processing as well as its effects on the components of bovine milk. In addition, it reports on the influence of this technology on the microbiological, physical-chemical and nutritional aspects of bovine milk.

Key words: *High pressure processing; Quality; Milk.*

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 11/02/2008
Aprovado | Approved: 13/10/2008

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

1 Introdução

Processos que utilizam o calor como forma de preservação, tais como, esterilização, pasteurização, desidratação e defumação, diminuem o crescimento ou inativam os microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Entretanto, podem produzir alterações indesejáveis que afetam o sabor, o aroma, a textura e a cor dos alimentos processados, além de destruir nutrientes, especialmente as vitaminas (RAMOS et al., 2003).

Dentre as inovações tecnológicas para preservação de alimentos, encontra-se o tratamento por alta pressão (AP), também conhecido por alta pressão hidrostática (APH) ou alta pressão isostática (API). Neste processo, os alimentos líquidos ou sólidos, com ou sem embalagem, são submetidos a pressões entre 100 e 1000 MPa (1000-10000 Atm), sendo que a temperatura do processo durante o tratamento de pressão pode ser controlada, podendo atingir temperaturas abaixo de 0 °C ou acima de 100 °C. O tempo de exposição ao tratamento para produtos comerciais pode variar de pulsos de milissegundos a até mais que 20 min (FDA, 2000).

A idéia de utilizar alta pressão no processamento de alimentos não é nova. A primeira menção de alta pressão utilizada como um método de preservação de alimento foi feita por Hite (1899), na qual o leite conservou-se por um longo período após tratamento a 689 MPa por 1 h em temperatura ambiente, obtendo cerca de 6 reduções decimais na contagem bacteriana total. Em 1990, no Japão, foi lançado o primeiro alimento tratado por alta pressão (geléia de frutas). Recentemente, vários produtos estão sendo lançados, incluindo ostras nos EUA, suco de laranja na França, guacamole no México e leite pasteurizado no mercado inglês (MERTENS e DEPLACE, 1993; CAMPOS et al., 2003).

Leite pasteurizado é um dos alimentos mais consumidos no mundo, devido ao alto valor nutricional e características sensoriais agradáveis. Porém sua baixa vida de prateleira é um obstáculo para a sua comercialização em grandes regiões. A pasteurização do leite para destruição de microrganismos patogênicos e redução da microbiota natural do leite, é tradicionalmente aplicada com uso do calor (72-75 °C/ 15-20 s). Uma das tecnologias atualmente estudadas como alternativa para o tratamento pelo aquecimento é a alta pressão, uma alternativa que pode trazer melhores benefícios microbiológicos e ainda melhores características nutricionais e sensoriais do que a pasteurização tradicional (HERNÁNDEZ, 2005).

2 Princípios do processo por alta pressão

O processo de alta pressão é livre de aditivos e pode trabalhar tanto com temperaturas elevadas como com reduzidas. Esta técnica é baseada em 2 princípios básicos da física: o primeiro, teoria de Le Chatelier, se

traduz pela diminuição do volume, quando se eleva a pressão do meio ou vice-versa. Exemplo disso é a água, que diminui seu volume em 15% quando submetida a uma pressão igual a 600 MPa em uma temperatura constante. No segundo princípio, pressão isostática ou teoria de Pascal, a pressão é transmitida instantânea e uniformemente, independentemente do tamanho e forma do produto, diferente da transferência de calor em que o volume do produto interfere no tempo de aquecimento (HAYASHI et al., 1989; TAUSCHER, 1995). Outro fato importante da API é a variação de temperatura que ocorre durante o período de compressão (aquecimento de até ± 3 °C para cada 100 MPa) e descompressão (resfriamento) do equipamento e do produto que está sendo tratado. Este gradiente é chamado de aquecimento ou resfriamento adiabático (KNORR, 1993).

A efetividade do tratamento pela alta pressão é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento, como o tempo de tratamento, taxa de compressão/ descompressão, temperatura, número de pulsos, composição do alimento e o estado fisiológico dos microrganismos a serem inativados, por isso, um bom conhecimento do processo e do alimento é essencial para a produção de alimentos com alta qualidade (SMELT et al., 2002).

Independentemente do sistema utilizado para o processamento por API, o equipamento básico é composto por 4 componentes: recipiente de pressão, sistema gerador de pressão, dispositivo para controle da temperatura e sistema operacional. A parte mais importante é o recipiente, pois é ele que suporta toda a pressão aplicada no processo. Os recipientes são fabricados a partir de um bloco de liga de aço, com capacidades de suportar diferentes pressões. O sistema gerador de pressão causa um leve aumento da temperatura do alimento, sendo este um dos motivos pelo qual se faz necessário o dispositivo de controle da temperatura. A outra função deste dispositivo é o uso de diferentes faixas de temperatura para o processo (0-100 °C), o qual funciona pelo bombeamento de água fria ou quente ao redor do recipiente de pressão (MERTENS e DEPLACE, 1993).

Quanto aos modos de operação, a alta pressão pode ser dividida em 3 categorias: batelada, semicontínuo e contínuo. O processo por batelada é o mais simples: uma quantidade de produto é pressurizada por vez. Esta pressurização pode ser direta ou indireta. No processo direto (*bulk processing*), o próprio alimento é o meio pressurizante. Exemplos são os alimentos líquidos, como os sucos e o leite, que são embalados após o processamento por alta pressão em sistema asséptico (FAO, 2001).

A pressurização indireta, também chamada *in-container*, é aquela em que existe um meio pressu-

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

rizante (ex. água ou água/óleo) que é responsável por transferir a pressão gerada pelo gerador de pressão para o alimento; este processo é aplicado para alimentos previamente embalados. As embalagens indicadas para o processo indireto são EVOH (*Ethylene-Vinyl Alcohol Copolymer*) e PVOH (*PolyVinyl Alcohol Copolymer*), pois não sofrem deformação (HAYASHI et al., 1989). Uma vantagem deste processo é a possibilidade de utilizar o sistema para vários alimentos, sem o risco de contaminação cruzada ou a necessidade de limpeza entre um processamento e outro, pois os alimentos já foram previamente embalados.

Quando se deseja aumentar a produção do sistema por batelada, emprega-se o processo semicontínuo, no qual vários recipientes de pressão são colocados em seqüência, enquanto alguns estão em pressão constante, outros estão sendo pressurizados, carregados ou descarregados, reduzindo o tempo entre os processos e permitindo recuperação de energia. No equipamento do processo semicontínuo, o pistão que gera a pressão fica livre, podendo atuar sobre vários recipientes (FDA, 2000). O processo por batelada e o semicontínuo podem ser utilizados tanto para alimentos líquidos quanto para sólidos.

O processo contínuo pode apenas ser utilizado para alimentos líquidos, pois o equipamento é composto por tubos ou recipientes de retenção que promovem um tempo de tratamento específico para o processo. Após o processamento, o alimento é acondicionado em tanques estéreis para posterior embalagem (MERTENS e DEPLACE, 1993).

De forma geral, podemos resumir as seguintes vantagens para o uso do processamento em alta pressão (RASTOGI et al., 2008): a) torna possível o processamento do alimento à temperatura ambiente, ou mesmo à temperatura mais baixa; b) possibilita a uniforme transmissão de pressão sobre o alimento, independentemente da sua forma e tamanho, o que dispensa operações preliminares neste; c) proporciona morte microbiana sem o uso de aditivos químicos; e d) pode ser utilizado para o desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais.

■ 3 Efeito da alta pressão sobre os microrganismos

O efeito da alta pressão na sobrevivência microbiana é influenciado por um grande número de interações, como o nível e a duração do tratamento, a temperatura do processo, a espécie bacteriana e a fase de desenvolvimento microbiano. A resistência dos microrganismos à pressão pode ser relacionada à resistência intrínseca de suas macromoléculas (ácido ribonucléico; ribossomos; ácidos nucleicos, proteínas celulares, membrana celular e, em alguns casos, a parede celular) (SMELT et al., 2002).

Quanto mais complexo é o organismo, maior é a sensibilidade mostrada frente ao tratamento por alta pressão, de modo que as células eucariotas são mais sensíveis que as procariotas. Os bolores e as leveduras são mais sensíveis que as formas vegetativas bacterianas, enquanto que os esporos bacterianos são as formas mais resistentes. Os bolores e as leveduras mostram-se sensíveis a pressões de 200 a 300 MPa, as espécies bacterianas na forma vegetativa, na maioria, são inativadas a pressões de 400 a 600 MPa, enquanto os esporos podem resistir a pressões de até 1000 MPa (FDA, 2000). Microrganismos Gram-positivos precisam de uma aplicação de 500-600 MPa por 10 min para inativação total, enquanto Gram-negativos são inativados com tratamentos de 300-400 MPa também por 10 min (SMELT, 1998). As bactérias na forma de cocos são mais resistentes que os bacilos e as células bacterianas em fase exponencial de crescimento são mais sensíveis que as células em fase estacionária (FDA, 2000; SMELT, 1998).

A inativação bacteriana causada pela alta pressão se deve a modificações (por desnaturação) de enzimas-chaves, assim como modificações na parede e membrana celular. Este processamento também provoca mudanças na morfologia e nos mecanismos genéticos dos microrganismos. A membrana citoplasmática é o principal local afetado pelo tratamento, alterando a permeabilidade celular e, conseqüentemente, a troca iônica. A cristalização de fosfolípidos da membrana produzida pela pressão também contribui para a inativação microbiana (FDA, 2000).

3.1 Efeito da API sobre as formas vegetativas

A presença e o crescimento das bactérias no leite afetam sua qualidade. Componentes químicos do leite podem ser degradados pelo metabolismo microbiano ou por suas enzimas. A lactose presente no leite é rapidamente fermentada por bactérias ácido-láticas, resultando em odor ruim e, se o pH atingir 4,6, pode ocorrer precipitação da caseína. Proteínas também são sujeitas à degradação por bactérias e suas enzimas. A digestão de proteínas por proteases pode levar ao aparecimento de sabor amargo e até mesmo à gelificação do leite. Lecitinasas hidrolisam a lecitina presente na membrana do glóbulo de gordura do leite, causando agregação dos glóbulos com posterior floculação da gordura. Lipases quebram os triglicerídeos, formando ácidos graxos de cadeia curta, resultando no ranço do leite. Crescimento de bolores, leveduras, coliformes, *Pseudomonas* spp., *Actinomyces* spp. e *Lactobacillus lactis* spp., *L. lactis biovar* e *L. maltigenes* podem desenvolver odor mofado, frutado, de vaca, peixe, terra, ou maltado, respectivamente (HYES e BORR, 2001).

O tratamento térmico é o processo mais comumente utilizado para a inativação de bactérias patogênicas ou

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

deteriorantes do leite cru e, embora eficiente, o aquecimento pode, além de destruir os microrganismos, afetar a aparência, gosto e valores nutricionais do leite (SMELT, 1998).

Hite (1899) foi o primeiro pesquisador a estudar o efeito da alta pressão sobre os microrganismos no leite; neste estudo, foram verificadas 6 reduções decimais na carga microbiana do leite, quando submetido a 689 MPa por 10 min, tendo estendido a vida de prateleira em até 4 dias após processo.

Estudos sobre a inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes (naturalmente presentes ou inoculados) por alta pressão, em associação com diferentes temperaturas e/ou agentes antimicrobianos, têm sido realizados em leite nos últimos anos e têm demonstrado que é possível obter um leite ultrapressurizado com qualidade microbiológica comparável ao leite pasteurizado (72 °C, 15 s) (BUFFA et al., 2001).

Mussa e Ramaswamy (1997), em um estudo sobre a cinética de destruição microbiana e de enzimas em leite cru integral, encontraram uma inativação de 3 ciclos logarítmicos nas amostras tratadas a 350 MPa/20 min/4 °C e conseguiram uma vida de prateleira de 18 dias quando armazenadas a 5 °C. Quando analisaram a fosfatase alcalina, que é o indicador de pasteurização do leite, foi verificado que nas mesmas condições a enzima mantinha uma alta atividade, não sendo possível utilizá-la como parâmetro para pasteurização por alta pressão.

Dentre os microrganismos deteriorantes do leite e derivados, as *Pseudomonas* spp. são consideradas as mais importantes. São bactérias psicotróficas, ou seja, mantêm sua atividade metabólica mesmo em condições de refrigeração, sendo que a *Pseudomonas fluorescens*

é a espécie mais comumente encontrada (DEETH, 2002). Trujillo et al. (2002) relataram cinéticas de destruição de várias bactérias, entre elas, a *P. fluorescens* possuía valor de D igual a 4,58 min para pressão de 250 MPa/25 °C, sendo maior que para *E. coli*, *L. innocua*, *L. helveticus* e *S. aureus*. Resultados semelhantes foram encontrados por McClements (2001), sendo 5,5 log CFU.mL⁻¹ a pressão de 250 MPa/8 °C/18 min.

De acordo com Deeth (2002), as principais bactérias patogênicas encontradas em leite fluido são: *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria* spp., fato que levou a inúmeras pesquisas para avaliar a eficiência do processo de alta pressão. Na Tabela 1, estão citados alguns trabalhos referentes à inativação microbiana induzida por alta pressão em leite.

Bozoglu et al. (2004) estudaram a injúria causada aos microrganismos patogênicos comumente encontrados no leite, entre eles o *Staphylococcus aureus*. Foi verificada uma inativação maior que 7 ciclos logarítmicos quando o leite foi tratado a 350 MPa/45 °C/10 min, tendo sido encontradas células viáveis apenas após 15 dias de estocagem a 4 °C.

Yersinia enterocolitica tem sido associada a doenças gastrointestinais humanas, chamadas Yersiniosis e diferentes cepas destas bactérias têm sido incriminadas por estas doenças. Sua natureza psicotrófica tem uma importância significativa em leite e produtos lácteos, que são normalmente estocados em temperaturas de refrigeração (LARKIN et al., 1999). Com o objetivo de conhecer a injúria causada pela alta pressão nesta bactéria, Castellví et al. (2005) realizaram uma pesquisa e concluíram que diferentes cepas de *Yersinia enterocolitica*

Tabela 1. Inativação bacteriana induzida por alta pressão isostática em leite.

Microrganismo	Condições de tratamento ^a	Inativação (log UFC.mL ⁻¹)	Tipo de leite	Referência
<i>B. cereus</i> INRAAV Z4222	500 MPa/15 min/60 °C	5,6	Cru	OPSTAL et al. (2004)
<i>B. cereus</i> INRAAV Z4222	200 MPa/15 min/45 °C e 200 MPa/10 min/60 °C	6,1	Cru	OPSTAL et al. (2004)
<i>B. cereus</i> NCFB 1031	400 MPa/18 min/8 °C	5,5	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>E. coli</i> MC1061	500 MPa/5 min/20 °C	6,5	Reconstituído	BLACK et al. (2005)
<i>E. coli</i> 0157:H7 NCTC 12079	700 MPa/15 min/40 °C	8,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>E. coli</i> 0157:H7 NCTC 12079	200 MPa/15 min/60 °C	8,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	600 MPa/10 min/20 °C	7,5	UAT integral	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	400 MPa/24 min/8 °C	6,0	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>L. innocua</i> 4202	500 MPa/5 min/20 °C	3,8	Reconstituído	BLACK et al. (2005)
<i>S. aureus</i> NCTC 10652	600 MPa/30 min/20 °C	5,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>S. aureus</i> As 1.2465	330 MPa/15 min/34 °C	6,0	UAT integral	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>P. fluorescens</i> ANA11	250 MPa/18 min/8 °C	5,5	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>P. fluorescens</i> NCDO 1524	250 MPa/18 min/8 °C	6,0	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>P. fluorescens</i> M114	300 MPa/5 min/20 °C	8,2	10% RSM-A	BLACK et al. (2005)

^a Dados correspondentes a condições mínimas de processamento para máxima inativação.

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

são inativadas por completo (8 reduções logarítmicas) quando amostras de leite desnatado foram tratadas a 400 MPa/20 °C/10 min.

Guan et al. (2005) demonstraram a inativação de apenas 5 ciclos logarítmicos de *Salmonella typhimurium* DT 104 em leite UAT integral, utilizando 450 MPa/21 °C/30 min. Este sorotipo é documentado como multirresistente a antibióticos e o segundo maior responsável por salmoneloses nos EUA.

Escherichia coli é o maior indicador sanitário em produção de alimentos, sendo que vários sorotipos são causadores de toxinfecções alimentares, entre eles a *E. coli* O157:H7, responsável por vários surtos alimentares, sendo mais patogênicos para crianças (LAW, 2000). Usajewicz e Nalepa (2006) realizaram um trabalho para verificar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em leite e em caldo nutriente. Eles verificaram que pressões de 550-600 MPa/20 °C/20 min não foram suficientes para inativar 5 ciclos logarítmicos em leite, mas sim em caldo nutriente, mostrando um efeito protetor do leite.

3.2 Efeito da API sobre os esporos bacterianos

Uma das operações mais difíceis na preservação de alimentos é a inativação de esporos bacterianos, uma vez que estes, em contraste com as células vegetativas, são muito mais resistentes ao calor, à radiação, à homogeneização e à pressão. Enquanto o processamento com pressão de 100 MPa pode inativar muitas bactérias vegetativas, esporos bacterianos podem sobreviver a pressões acima de 1200 MPa (FONTES et al., 2003).

A alta resistência dos esporos à pressão é creditada à estrutura e espessura da capa protetora, uma vez que suas proteínas estão protegidas por ácido dipicolínico, que impede sua solvatação, excessiva ionização e conseqüente precipitação. Por esta razão, a aplicação somente de alta pressão pode, às vezes, não ser suficiente para inativar os esporos. Desta forma, o uso combinado de temperaturas mais elevadas com a API tem sido empregado para se obter uma redução efetiva da contagem de esporos viáveis (FONTES et al., 2003).

Knorr (1993) relatou que baixas pressões (200 MPa) podiam causar a germinação dos esporos. Isto sugeriu que esporos poderiam ser mortos pela aplicação de pressão em dois estágios. O primeiro tratamento por API causaria a germinação dos esporos, enquanto o segundo tratamento, com maior pressão, poderia inativar os esporos germinados.

Wultack et al. (1998), em estudo com indução da germinação de esporos bacterianos por API, demonstraram que a inativação de esporos a 600 MPa foi maior quando havia pré-tratamentos em pressões até 200 MPa do que em pré-tratamentos com 500 MPa, sugerindo que baixas pressões ativam um sistema enzimático

responsável pela germinação, o que não ocorre em altas pressões.

De acordo com Opstal et al. (2004), o *Bacillus cereus* é uma bactéria esporogênica e patogênica, causadora de inúmeros casos de intoxicações alimentares em todo o mundo. Nesta pesquisa, foi avaliado o comportamento de esporos de *Bacillus cereus* (germinação e inativação) em diferentes níveis de pressão, associados a diferentes temperaturas, em leite e em tampão. Como conclusão, foi verificado que a germinação após os tratamentos foi sempre maior no leite do que no tampão, certamente devido à presença de aminoácidos que induzem a germinação e crescimento do *B. cereus*. Os autores concluíram ainda que o melhor tratamento encontrado foi capaz de reduzir mais que 6 ciclos logarítmicos de 4 cepas de *B. cereus*, utilizando 2 fases: a primeira a 200 MPa/45 °C/10 min e a segunda a 200 MPa/60 °C, também por 10 min. Os resultados deste tratamento foram melhores que tratamentos com 500 MPa/45 °C/10 min.

4 Efeito da alta pressão sobre os constituintes do leite

O processamento utilizando alta pressão afeta de forma desigual os constituintes do leite, que podem ter influência direta na produção de produtos lácteos, como queijos, iogurtes e manteiga.

4.1 Água

As transformações sofridas pela água, principal constituinte do leite, no processamento por API, podem, de forma geral, ser explicadas pela inércia do processo, que obedece ao Princípio de Le Chatelier, no qual pressão e volume se comportam de maneira inversa. Nesse contexto, estudos relatam um maior aumento da formação de gelo quando altas pressões são aplicadas, bem como um decréscimo do ponto de congelamento (BALCI e WIBEY, 1999; HINRICHS et al., 1996 citado por HUPPERTZ et al., 2002). Isto ressalta a necessidade de estabelecimento de critérios para esse parâmetro em leite bovino tratado por API para prevenir práticas fraudulentas, como adição de água.

4.2 Lactose

Modificações no teor de lactose do leite causadas pela API são de grande interesse, pois esta é matéria-prima primordial na produção de produtos fermentados, como o iogurte. No entanto, poucos trabalhos relacionam a influência da API sobre este componente. López-Fandiño et al. (1996) relatam ausência de alterações no conteúdo quantitativo e qualitativo de lactose após tratamento do leite a 100-400 MPa em 10-60 min. Esse dado é relevante, pois mostra a aptidão do leite API para produção de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas.

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. *et al.*

4.3 Proteínas

O tratamento do leite por alta pressão e as mudanças provocadas em suas proteínas têm se tornado de maior interesse apenas nos últimos 15 anos (HUPPERTZ *et al.*, 2006c).

A aplicação de alta pressão induz a mudanças na estrutura de proteína que podem levar à desnaturação (HUPPERTZ *et al.*, 2004a; MOZHAEV *et al.*, 1996; LOPEZ-FANDIÑO *et al.*, 1996). O efeito da alta pressão hidrostática nas estruturas das proteínas depende de fatores extrínsecos, como o pH, a temperatura e o meio iônico, mas também depende das propriedades intrínsecas da proteína, como por exemplo, as pontes de dissulfeto que são responsáveis pela flexibilidade e estabilidade molecular (BOUAOUINA *et al.*, 2006).

A desnaturação que ocorre nas proteínas, quando são submetidas à alta pressão, é devido ao desdobramento de sua estrutura conformacional que resulta em uma redução do volume molar. Estas reações e mudanças que são responsáveis por diminuir volume são favorecidas pelo tratamento por pressão (NEEDS *et al.*, 2000; MOZHAEV *et al.*, 1996).

O desdobramento da proteína sob alta pressão ocorre principalmente devido ao rompimento de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, sendo que as ligações covalentes e as pontes de hidrogênio, geralmente, não são afetadas pela alta pressão (NEEDS *et al.*, 2000; BOUAOUINA *et al.*, 2006). Isto significa que a pressão é capaz de romper as ligações que mantêm as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas globulares, porém possui pouca influência na estrutura primária e secundária (BOUAOUINA *et al.*, 2006).

O tratamento por alta pressão também provoca a desestabilização na micela de caseína. A duração e o tratamento à alta pressão, assim como a temperatura, o pH e o tempo de armazenamento, após o tratamento, são fatores que possuem uma considerável influência sobre o tamanho da micela de caseína e, conseqüentemente, sobre sua desnaturação (HUPPERTZ *et al.*, 2004a).

O rompimento das micelas de caseína é maior e mais rápido sob altas pressões. Pressões menores que 200 MPa possuem pouco efeito no tamanho da micela de caseína em leite cru desnatado. Em pressões entre 300-800 MPa ocorre uma redução de aproximadamente 50% no tamanho das micelas, sendo estas mudanças de tamanho irreversíveis durante a estocagem por 24 e 48 h a 5 e 20 °C. (HUPPERTZ *et al.*, 2004a).

O diâmetro da micela de caseína estimado para o leite desnatado que não sofreu tratamento de alta pressão é de aproximadamente 150-200 nm, enquanto que as partículas de uma amostra tratada a uma pressão de 600 MPa, eram de aproximadamente 40 nm (NEEDS *et al.*, 2000). Já o tamanho das micelas de caseína

tratadas com pressões de 100-200 MPa é semelhante ao da caseína que não sofreu pressurização (HUPPERTZ *et al.*, 2004b).

Huppertz *et al.* (2006a) submeteram o leite isento de proteína do soro a um tratamento de 400 MPa. Os autores observaram o rompimento total das micelas de caseína, enquanto que em pressões mais baixas (200-350 MPa) houve um rompimento menos extenso. Um resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado por Needs *et al.* (2000) com leite cru desnatado: o tratamento com pressão de 200 MPa por 15 min resultou em uma desintegração parcial das micelas de caseína e um aumento na densidade das micelas remanescentes. Já o tratamento a 400 e 600 MPa resultou na desintegração completa da grande maioria das micelas.

Huppertz *et al.* (2004a) observaram que existem dois mecanismos contrapostos que influenciam o comportamento da micela de caseína sob alta pressão: o rápido rompimento das micelas de caseína e, comparativamente, a formação lenta de agregados de caseína micelar, que ocorre primeiramente em pressões de 250 e 300 MPa.

Em leite isento de proteína de soro submetido a uma pressão de 250 e 300 MPa, foi constatado o aumento no tamanho das partículas de caseína durante o tratamento prolongado, provavelmente devido à agregação das partículas de caseína, que pode ser resultado de um aumento nas interações intermoleculares hidrofóbicas (HUPPERTZ *et al.*, 2006a).

Huppertz *et al.* (2006b) também afirmam que a associação das proteínas do soro às micelas de caseína possuem pouca influência no aumento do tamanho das micelas durante o processo de alta pressão, sendo mais provável que grandes agregados de caseína sejam responsáveis por tal aumento.

Huppertz *et al.* (2004a) verificaram que o tratamento a 250 MPa aumentou o tamanho das micelas de caseína em aproximadamente 20%, porém, o mesmo resultado não foi encontrado por Gaucheron *et al.* (1997). De acordo com Huppertz *et al.* (2004a), este fato pode ser resultado da estocagem das amostras no trabalho de Gaucheron *et al.* (1997) antes de realizar as análises, uma vez que as micelas da amostra tratadas a 250 MPa por Huppertz *et al.* (2004a) também tiveram seu tamanho ligeiramente reduzido durante a estocagem. A diminuição do tamanho da micela de caseína, depois do tratamento a 250 MPa e subsequente armazenamento, pode ser resultado da formação de um grande número de partículas com um tamanho menor do que esses agregados, através de ligações hidrofóbicas.

O rompimento das micelas de caseína, no estágio inicial do tratamento por alta pressão, é provavelmente resultado da solubilização do fosfato de cálcio coloidal, que é favorecido pela alta pressão e rompimento das

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

interações eletroestáticas intermoleculares (HUPPERTZ et al., 2006c).

O fosfato de cálcio coloidal possui um papel importante na estabilidade da micela de caseína. Existe uma correlação direta entre o pH e o fosfato de cálcio coloidal, que pode estar relacionada ao efeito do pH sobre o tamanho das micelas no tratamento sob alta pressão. A redução do pH e, conseqüentemente, do teor de fosfato de cálcio coloidal, pode tornar as micelas mais susceptíveis ao rompimento pelo tratamento de alta pressão, enquanto que o aumento no pH pode estabilizar as micelas (HUPPERTZ et al., 2004a). Altuner et al. (2006) registraram um pequeno aumento no pH em tratamentos com pressões de 110 a 440 MPa, porém esta mudança não foi considerada estatisticamente ($p < 0,01$) significativa.

Um aumento na temperatura reduz a solubilidade do fosfato de cálcio, o que reduziria, então, a solubilização do fosfato de cálcio coloidal induzida pela alta pressão, proporcionando maior estabilidade das micelas de caseína contra o rompimento pela alta pressão. Da mesma forma, as ligações hidrofóbicas que são consideradas responsáveis pela reestruturação das micelas são promovidas em altas temperaturas (HUPPERTZ et al., 2006a).

Huppertz et al. (2006a) verificaram que logo após a descompressão, ao término do tratamento, há a formação de um agregado de micelas de caseína. Entretanto a reassociação das micelas de caseína não ocorre em grande extensão em pressões de 300 e 400 MPa, o que indica que, provavelmente, um núcleo seja requerido para a formação dos agregados de caseína submetidos à alta pressão; tais núcleos podem ser fragmentos micelares remanescentes. Uma solubilização completa dos agrupamentos de fosfato de cálcio leva a um rompimento completo da estrutura micelar, o que previne a agregação das caseínas a 350 e 400 MPa.

Em leites submetidos a pressões de 300 a 800 MPa, a formação das micelas pode ser impedida pela associação das caseínas com as β -lactoglobulinas desnaturadas. Porém, este possível papel assumido pela proteína do soro desnaturada, de inibir a formação das micelas, talvez seja apenas uma parte de um mecanismo complexo do rompimento da micela de caseína pela alta pressão, incluindo rompimentos irreversíveis de outros elementos estruturais (HUPPERTZ et al., 2004b).

Needs et al. (2000) também sugeriram a associação da β -lactoglobulina às micelas de caseína, em leite desnatado tratado com pressões de 300-600 MPa. Muitos outros estudos também demonstraram que a maioria da β -lactoglobulina desnaturada em leite desnatado submetido à alta pressão está associada à micela de caseína, e apenas uma pequena porção está na forma não sedimentável (HUPPERTZ et al., 2004b). Já em leite

integral tratado com alta pressão, a α -lactoalbumina e β -lactoglobulina também podem estar associadas à membrana do glóbulo de gordura (YE et al., 2004). A distribuição das proteínas do soro no leite desnatado é afetada pelo tratamento de alta pressão, principalmente a β -lactoglobulina, incorporando-se à rede de gel formada na coagulação pela renina. Isso resulta numa redução na concentração de proteína solúvel no drenado de soro (NEEDS et al., 2000).

No tratamento por alta pressão, há uma desnaturação considerável de β -lactoglobulina, sendo a maior parte capaz de sedimentar. Para que ocorra a sedimentação da β -lactoglobulina desnaturada, ela deve ou estar associada a micelas de caseína ou formar grandes agregados homogêneos. Já a β -lactoglobulina não sedimentável pode ocorrer na forma monomérica, em pequenos agregados de β -lactoglobulina, ou estar associada a moléculas individuais de caseína ou a fragmentos não sedimentáveis (HUPPERTZ et al., 2004b).

O efeito da alta pressão sobre as proteínas está relacionado à ruptura das interações não covalentes das moléculas, e a subsequente reformação de ligações intra ou intermoleculares com outras proteínas e nelas mesmas (BOUAOUINA et al., 2006). Um possível mecanismo de desnaturação da α -lactoalbumina e da β -lactoglobulina por alta pressão foi sugerido por Huppertz et al. (2004b): sob alta pressão, a β -lactoglobulina se desdobra e expõe o grupo sulfidril que então pode interagir com a κ -caseína, α -lactoalbumina ou β -lactoglobulina, e, possivelmente, com α_{s2} -caseína, através da interação sulfidril-dissulfeto. Na descompressão, as moléculas de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina que não interagiram com outra proteína, podem adquirir novamente sua conformação original. O cálcio pode facilitar a aproximação das proteínas do soro desnaturadas a outras proteínas. Logo, a extensão da desnaturação da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina depende dos grupos sulfidril não modificados, assim como do teor de cálcio disponível no meio.

A sensibilidade da α -lactoalbumina à alta pressão é menor do que a da β -lactoglobulina que se desnatura rapidamente a baixas pressões (>100 MPa), enquanto que a α -lactoalbumina sofre alteração a pressões superiores a 400 MPa (LOPEZ-FANDIÑO et al., 1996). Esta estabilidade está relacionada a uma estrutura molecular mais rígida da α -lactoalbumina que possui quatro grupos dissulfeto, contra duas ligações dissulfeto e ao grupo sulfidril livre que a β -lactoglobulina apresenta, tornando-a mais susceptível (HUPPERTZ et al., 2002; LOPEZ-FANDIÑO et al., 1996). A resistência à alta pressão da α -lactoalbumina também é maior na presença de íons de cálcio, que reforçam sua estrutura terciária (BOUAOUINA et al., 2006). A extensão com que ocorre a desnaturação das proteínas do soro pelo tratamento de

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

alta pressão, também é reduzida pela remoção de fosfato de cálcio coloidal (LOPEZ-FANDIÑO et al., 1996).

Temperaturas mais altas conferem um aumento na desnaturação pela alta pressão da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, indicando um efeito de sinergia entre temperatura e pressão (HUPPERTZ et al., 2004a). Recente trabalho indica que o uso de pressões até 400 MPa, embora tenha proporcionado mudanças na estrutura e aumentado a digestibilidade *in vitro* da β -lactoglobulina, não afetou seu potencial alergênico (CHICÓN et al., 2008), o que sugere que devem ser realizados experimentos buscando otimizar os parâmetros operacionais que podem contribuir para elucidar a contribuição da HPP na questão da alergenicidade das proteínas do leite.

4.4 Enzimas

Inativação de enzimas endógenas no leite processado por API é de grande interesse devido a sua influência na qualidade de produtos lácteos (maturação de queijos) e devido a seu uso como indicador de severidade do processo (TRUJILLO et al., 2002). De forma geral, estudos indicam que a grande maioria das enzimas endógenas no leite são baroestáveis, como fosfohexoseimerase, lipase e δ -glutamilttransferase, exceto fosfatase ácida que teve sua atividade reduzida de forma significativa em pressões maiores que 200 MPa (RADEMACHER et al., 1998; PANDEY et al., 2004; BALCI et al., 2002 citados por HUPPERTZ et al., 2006a; RADEMACHER e HINRICHS, 2006).

Ludikhuge et al. (2001) reportam a resistência da enzima lactoperoxidase em leite bovino tratado a pressões de até 700 MPa a 20-65 °C, mesmo após 140 min de tratamento.

Olsen et al. (2004) investigaram a inativação de xantino-oxidase por tratamento do leite em alta pressão. Aplicação de pressão abaixo de 400 MPa abaixo de 120 min não afetou Xantino-oxidase no leite, enquanto em períodos maiores, perda de 17% de sua atividade foi relatada. Entretanto, a 500 MPa/60 min e 600 MPa/12 min estes valores alcançaram 46 e 83%, respectivamente. Em contrapartida, a enzima purificada permaneceu ativa mesmo a 700 MPa/ 6 min, com redução de 84% de sua atividade, o que a torna um candidato promissor para verificar a eficiência do processo. Verificou-se ainda que a gordura presente no leite não teve influência no processo, sendo irrelevante para a atividade da enzima, e os dados gerados no experimento seguem uma reação de primeira ordem.

Scollard et al. (2001) efetuaram o processamento de leite entre 50 e 800 MPa em intervalos de tempo de 1, 10 e 20 min e mediram a inativação de plasmina bem como a proteólise do leite. Pressões menores que 600 MPa resultaram em apenas 50% de inativação desta

enzima imediatamente após o processamento por API, enquanto que para plasminogênio, observou-se uma inativação de 20% a pressões menores que 500 MPa, indicando a baroestabilidade dessas substâncias que só foram significativamente inativadas em pressões acima deste valor. Após o processamento, não foi relatado aumento da atividade da plasmina durante o período de estocagem, demonstrando que a API não resulta em ativação de plasminogênio. Contudo, a 300 MPa foi observado aumento de proteólise, provavelmente devido à alta desintegração das micelas que resultaram em um aumento de área superficial para proteólise combinado com uma alta atividade residual da plasmina. Esses dados são importantes, pois mostram que produtos tratados por API, podem estar sujeitos a um aumento de proteólise durante sua estocagem, dependendo das condições operacionais utilizadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Borda et al. (2004) que processaram leite na faixa de 300-800 MPa, com temperaturas de 25-65 °C, e notaram uma potencial baroestabilidade da plasmina.

Mussa e Ramaswamy (1997) encontraram valores superiores de tempo de redução decimal para fosfatase alcalina em relação aos microorganismos com aplicação de pressões na faixa de 200-400 MPa durante 120 min, ou seja, ainda havia enzimas íntegras quando os microorganismos alvos já haviam sido destruídos. Os autores sugerem que, ao contrário do estabelecido na legislação brasileira para leite pasteurizado, fosfatase-negativo, uma proporção de inativação desta enzima seja proposta como critério indicador do processo por API.

4.5 Gordura

De forma geral, poucos estudos estão relacionados a mudanças sofridas pela fração lipídica de produtos lácteos durante o processamento por alta pressão (HUPPERTZ et al., 2006a), sendo as principais variações observadas a manutenção do tamanho do glóbulo de gordura, a alteração da temperatura de transição do processo de fases e a extensão de ocorrência do cremeamento.

Ye et al. (2004) não constataram uma mudança significativa do tamanho de glóbulo de gordura durante o leite tratado por API, embora fosse constatado aumento da quantidade de proteínas séricas sobre este durante o processo.

Kanno et al. (1998), entretanto, relatam que pressões entre 400-800 MPa podem ter efeito contrário sobre esses parâmetros, já que a aplicação dessa faixa de valores proporcionaram um aumento do diâmetro médio do glóbulo de gordura, além de um aumento de sua membrana.

Hupertz et al. (2003) investigaram a influência da API sobre a formação de cremeamento (floculação)

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

no leite. Em valores de 100-250 MPa, observou-se um aumento da taxa do cremeamento, devido à formação de agregados de imunoglobulinas e/ou lipoproteínas ou formação de clusters dos glóbulos de gordura, enquanto na faixa de 400-600 MPa, houve uma variação inversamente proporcional, devido a uma provável desnaturação destas altas pressões. Os autores relatam também que não houve influência significativa no tamanho do glóbulo de gordura durante o processo.

Frede e Buccheim (2000) observaram a influência de várias pressões (50-500 MPa) no comportamento térmico e na distribuição de fases na fase lipídica do leite, observando um aumento da velocidade de cristalização proporcional ao aumento da pressão aplicada. Buccheim et al. (1996), citados por Huppertz et al. (2002), relatam que o aumento da proporção da fração sólida na fase lipídica do leite tratado por API ocorre devido a aumento da temperatura de transição de fases induzido pelo processo.

5 Alterações nutricionais

Como o processo por alta pressão tem influência direta nas ligações covalentes, normalmente não há alteração no valor nutricional de produtos lácteos tratados por este processo, havendo, desta forma, poucos trabalhos relacionados a esse assunto (MESSENS et al., 2003).

Lópes-Fandiño et al. (1996) relatam ausência de furosina e lactulose e perda insignificante no teor de lisina após tratamento do leite em alta pressão, sugerindo que não houve ocorrência da Reação de Maillard e, ainda, que a provável ocorrência desta acontece após o tratamento sob API.

O teor de vitaminas em alimentos não é afetado por tratamento de API, havendo igualmente poucos trabalhos relacionados no que diz respeito a produtos lácteos. Sierra et al. (2000) relatam 100% de retenção do conteúdo de vitamina B₁ e B₆ em leite cru após tratamento a 400 MPa em temperatura ambiente, constatando a potencialidade deste processo para retenção de micronutrientes, ao contrário dos tratamentos térmicos convencionais.

6 Alta pressão e embalagens

A embalagem representa parte inerente do processamento de alimentos, na medida em que deve exercer uma função protetora contra as alterações de ordem microbiológica, físico-química e mecânica que o alimento pode sofrer ao longo do seu período de estocagem, que podem ter impacto na sua segurança e no seu valor nutricional.

Em geral, alimentos tratados sobre alta pressão são previamente embalados, para depois serem submetidos a diversas condições do processo. Os materiais utilizados na constituição das embalagens devem ser capazes de operar as altas pressões utilizadas no processamento e ter boa propriedade de selagem e, no mínimo, possuir

flexibilidade em um dos lados para transmissão de pressão; desta forma, materiais rígidos, como metais e vidros não podem ser utilizados (RASTOGI et al., 2008). Adicionalmente, devem minimizar a perda de qualidade do alimento durante a aplicação do processo.

Canner et al. (2000), citados por Ozen e Floros (2001), testaram diversos tipos de embalagens laminadas feitos com diversos materiais (PET/EVA, PP; PET/ SiO_x/ PU, PE, Nylon/ EvOH/ PE; entre outros) após processamento a 600-8000 MPa, constatando mudanças na permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio apenas em polietileno metalizado (PET), sendo todos os outros materiais usados adequados às condições operacionais.

Lambert et al. (2000) constataram perda de 25% e 16% de alteração na permeabilidade ao oxigênio após processamento a 500 MPa/30 min em alimentos embalados em polyamida/ polietileno (PA/PE) e filmes de PA/surllyn, além de ausência de mudança de estrutura nos materiais e insignificante absorção de compostos de aroma a partir da embalagem e valor global de migração de compostos de embalagem para o alimento. Isso ressalta que as embalagens foram adequadas para o processo.

7 Perspectivas

O uso da alta pressão hidrostática é uma técnica de processamento não térmico eficiente para a conservação do leite, com um aumento da vida de prateleira devido à boa inativação microbiana na forma vegetativa, como também de esporos microbianos quando utilizados processos de pressurização em duas fases. Os constituintes do leite mostram-se resistentes à alta pressão, com exceção das proteínas que sofrem alterações conformacionais importantes. A implantação do processamento por alta pressão na indústria láctea é de grande interesse, mas ainda possui um alto custo inicial de investimento.

Referências

- ALALTUNER, E. M.; ALPAS, H.; ERDEM, Y. K.; BOZOGLU, F. Effect of hydrostatic pressure on physicochemical and biochemical properties of milk. **European Food Research Technology**, Munchen, v. 222, n. 3-4, p. 392-396, 2006.
- BALCI, A. T.; WILBEY, R. A. High pressure processing of milk. – the first 100 Years in the development of a new technology. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 561-572, 2002.
- BLACK, E. P.; KELLY, A. L.; FITZGERALD, G. F. The combined effect of high pressure and nisi on inactivation of microorganisms in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 286-292, 2005.
- BORDA, D.; INDRAWATI, C.; SMOUT, C.; LOEY, A. V.; HENDRICKS, M. High pressure thermal inactivation Kinetics of a Plasmin System. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 11, p. 2351-2358, 2004.

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. *et al.*

- BOUAQUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high pressure treatment. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 275-284, 2006.
- BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNÇ, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic treated milk during storage. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Delft, v. 40, n. 3, p. 243-247, 2004.
- BUFFA, M.; GUAMIS, B.; ROYO, C.; TRUJILLO, A. J. Microbial changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. **Food Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2001.
- CAMPOS, F. P.; DOSUALDO, G. L.; CRISTIANINI, M. Utilização de tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 351-357, 2003.
- CASTELLVÍ, S. L.; SAGUÉS, A. X. R.; CAPELLAS, M.; HERRERO, M. H.; GUAMIS, B. Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 337-342, 2005.
- CHICÓN, R.; BELLOQUE, J.; ALLONSO, E.; LÓPEZ-FANDINO, R. Immunoreactivity and digestibility of high-pressure treated whey proteins. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 367-376, 2008.
- DEETH, H.; KHUSNIATI, T.; DATTA, N.; WALLACE, R. B. Spoilage patterns of skim and whole milks. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 227-241, 2002.
- FAO, 2001. **Technical Elements of New and Emerging Non-Thermal Food Technologies**. Disponível em: http://www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal_1.htm#_Toc523623854. Acesso em: 2 June 2006.
- FONTES, P. R.; RAMOS, E. M.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 2 - Efeitos sobre microrganismos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, p. 73-77, 2003. (Suplemento).
- FDA, 2000. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center For Food Safety And Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. **High Pressure Processing**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-hpp.html>. Acesso em: 2 June 2006.
- FREDE, E.; BUCHEIM, W. The influence of high pressure upon the phase behaviour of milk-fat and milk-fat fractions. **Milchwissenschaft**, Kiel, v. 55, n. 12, p. 683-685, 2000.
- GAUCHERON, F.; FAMELART, M. H.; MARIETTE, F.; RAULOT, K.; MICHEL, F.; LEGRAET, Y. Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skin milk. **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 439-447, 1997.
- GUAN, D.; CHEN, H.; HOOVER, D. G. Inactivation of *Salmonella typhimurium* DT 104 in UHT whole milk by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 2, p. 145-152, 2005.
- HAYASHI, R. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development, Engineering and Food. (W. E. L. Spiess and H. Schubert, eds.). London: Elsevier Applied Science, 1989. v. 2, p. 815.
- HERNÁNDEZ, G. T.; PEÑA, H. R.; VELAZQUEZ, G.; RAMIREZ, J. A.; TORRES, J. A. Effect of combined thermal and high pressure processing on the microbial stability of milk during refrigerated storage. **IFT Annual Meeting + Food Expo, 65, 15-20/07/2005**. New Orleans, Louisiana. Book of Abstracts... Chicago: IFT, 2005.
- HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. **Bulletin of West Virginia University Agricultural Experimental Station**, Virginia, v. 58, p. 15-35, 1899.
- HUPPERTZ, T. H.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Effects of high pressure on constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 561-572, 2002.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressures – induced changes in the creaming properties of bovine milk. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 349-359, 2003.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure treatment in bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, n. 1, p. 97-106, 2004a.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure-induced denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, n. 4, p. 489-495, 2004b.
- HUPPERTZ, T. H.; SMIDDY, M. A.; UPADHYAY, V. K.; KELLY, A. L. High-pressure changes induced changes in bovine milk: a review. **International Journal of Dairy Technology**, Cambridge, v. 59, n. 2, p. 59-65, 2006a.
- HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G.; KELLY, A. L. High pressure induced changes in bovine milk proteins: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**, Oxford, v. 1764, n. 3, p. 593-598, 2006b.
- HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L.; KRUIF, C. G. Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 73, n. 3, p. 294-298, 2006c.
- HYES, M. C.; BORR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied dairy microbiology**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap. 2, p. 59-76.
- KANNO, C.; UCHIMIRA, T.; HAGIWARA, T.; AMETANI, M.; AZUMA, N. Effect of high pressure on the physical-chemical properties of bovine milk fat globules and the milk fat globule membrane. In: ISAACS, N. I. (Eds). **High Pressure food science, bioscience and biochemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998.
- KNORR, D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 158-161, 1993.

Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite

PFLANZER, S. B. et al.

- LAMBERT, Y.; DEMAZEAU, G.; LARGETEAU, A.; BOUVIER, J. M.; LABORDE-CROUBIT, S.; CABANNES, M. Packaging for the High-Pressure Treatments for the Food Industry. **Packaging Technology Science**, Surey, v. 13, n. 1, p. 63-71, 2000.
- LARKIN, L. L.; VASAVADA, P. C.; MARTH, E. H. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk as related to its quality. **Milchwissenschaft Chapt**, Kiel, v. 46, n. 8, p. 500-508, 1991.
- LAW, D. Virulence factor of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal Applied Microbiology**, Bedford, v. 88, n. 5, p. 729-745, 2000.
- LOPEZ-FANDIÑO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese making properties of raw milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, n. 6, p. 929-1126, 1996.
- LUDIKHUYZE, L. R.; CLAYES, W. L.; HENDRICKX, M. E. Effect of temperature and/or pressure on lactoperoxidase activity in bovine milk and acid whey. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 5, p. 625-637, 2001.
- MCCLEMENTS, J. M. J.; PATTERSON, M. F. A.; LINTON, M. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 514-522, 2001.
- MERTENS, B.; DEPLACE, G. Engineering aspects of high pressure technology in the food industry. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 164-169, 1993.
- MESSENS, W.; CAMP, J. V.; DEWETTINCK, K. High-pressure processing to improve dairy product quality. In: **Dairy Processing Improving Quality**. Cambridge, England: CRC Press, 2003. 531 p.
- MOZHAEV, V. V.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, New Jersey, v. 24, n. 1, p. 81-91, 1996.
- MUSSA, D. M.; RAMASWAMY, H. S. Ultra high pressure pasteurization of milk: kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 551-557, 1997.
- NEEDS, E. C.; STENNING, R. A.; GILL, A. L.; FERRAGUT, V.; RICH, G. T. High- pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 31-42, 2000.
- OLSEN, K.; KRISTENSEN, D.; RASMUSSEN, J. T.; SKIBSTED, L. H. Comparison of the effect of high pressure and heat on the activity of bovine xanthine oxidase. **Milchwissenschaft**, Kiel, v. 59, n. 7-8, p. 411-413, 2004.
- OPSTAL, I. V.; BAGAMBOULA, C. F.; VANMUYSEN, S. C. M.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 227-234, 2004.
- OZEN, B. F.; FLOROS, J. D. Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 12, n. 1, p. 60-67, 2001.
- RADEMACHER, B.; HINRICHS, J. Effects of High Pressure on indigenous enzymes in bovine milk; Reaction kinetics, inactivation and potential application. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 655-661, 2006.
- RAMOS, E. M.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; FONTES, E. A. F.; GOMIDE, L. A. M. Tratamento de alimentos por alta pressão hidrostática: 1- Equipamentos e processos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 37, p. 46-53, 2003. (Suplemento)
- RASTOGI, N. K.; RAGHAVARO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRAJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 47, n. 1, p. 69-112, 2007.
- SCOLLARD, P. G.; BERESFORD, T. P.; NEEDS, E. C.; MURPHY, P. M.; KELLY, A. L. Plasmin activity, β - lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 835-841, 2001.
- SIEERA, I.; VIDAL-VALVERDE, C.; LÓPEZ, FANDINO, R. Effect of high-pressure on the vitamin B1 and B6 content of milk. **Milchwissenschaft**, Kiel, v. 55, n. 7, p. 365-367, 2000.
- SMELT, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 152-158, 1998.
- SMELT, J. P.; HELLEMONS, J. C.; PATTERSON, M. Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: HENDRICKX, M. and KNORR, D. (Eds). **Ultra high pressure treatments of foods**. New York, United States: Kluwer Academic/plenum Publishers, 2002. p. 55-76.
- TAUSCHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, Heidelberg, v. 200, n. 1, p. 3-13, 1995.
- TRUJILLO, A. J.; CAPELLAS, M.; SALDO, J.; GERVILLA, R.; GUAMIS, B. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Munchen, v. 3, n. 4, p. 295-307, 2002.
- USAJEWICZ, I.; NALEPA, B. Survival of *E. coli* O157:H7 in milk exposed to high Temperatures and high pressure. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 1, p. 33-39, 2006.
- WUYTACK, E. Y.; BOVEN, S.; MICHIELS, C. W. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. **Applied and Environmental Microbiology**, Bedford, v. 64, n. 9, p. 3220-3224, 1998.
- YE, A.; ANEMA, S. G.; SING, H. High-pressure induced interactions between milk fat globule membrane proteins and skim milk proteins in whole milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 6, p. 4013- 4022, 2004.