

# **PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO NO LEITE DE DESCARTE: PROVAS DE EFICÁCIA**

**Natália Puzzi Goulart de Souza**

**Larissa Miranda Padilha**

**Professora Doutora Viviani Gomes**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo

natalia.pgs@usp.br

## **Objetivos**

O leite de descarte, que é impróprio para o consumo humano, comumente é destinado à alimentação de bezerras nas produções leiteiras. A pasteurização lenta é um método que permite a redução da carga microbiana do leite de descarte, porém não elimina os resíduos de antimicrobianos. Esse processo consiste no aquecimento do leite a uma temperatura de 62 a 68°C por 30 minutos, a fim de reduzir a carga microbiana.

O objetivo desta pesquisa foi validar um equipamento de pasteurização na redução da carga microbiana do leite de descarte, por meio das provas de Fosfatase Alcalina e Peroxidase.

## **Métodos e Procedimentos**

O leite utilizado neste estudo foi oriundo da Fazenda Agrindus S.A. - Letti - Fazenda Santa Rita, Descalvado, SP; e transportado em vasilhames para leite com tampa de rosca seguindo orientações da Instrução Normativa MAPA - 77/2018, para o Laboratório de Pesquisa em Bezerros Fernando José Benesi, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP, São Paulo, SP.

Foram coletados 200 litros de leite proveniente de vacas em tratamento com antimicrobianos, resíduos do colostro e leite de transição. Na recepção do leite no laboratório foi verificada a temperatura correspondente a 10°C, sendo o leite transferido para o pasteurizador imediatamente após a chegada.

Realizado o processo de pasteurização lenta em equipamento novo e próprio do laboratório, o equipamento possui capacidade de pasteurizar 200 litros de leite por lote, sendo aquecido à temperatura de 63°C e mantido por 30 minutos, após esse período o equipamento passa a resfriar o leite.

Ao finalizar o processo de pasteurização foram realizadas as provas rápidas de eficiência com as tiras de teste de Fosfatase Alcalina e Peroxidase, da marca comercial CAP-LAB.

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. De acordo com o indicado no manual a Fosfatase alcalina foi mantida em refrigeração, após pasteurização do lote seguiu-se de imergir a tira no leite por 10 segundos e aguardar 2-3 minutos para leitura, sendo a coloração amarelo escuro indicativo de teste positivo e pasteurização inefetiva, e coloração amarelo pálido ou incolor indicativo de teste negativo e pasteurização efetiva.

As recomendações para a peroxidase foram, após imersão da tira e absorção da amostra, retirar do leite e aguardar 10 segundos para leitura do resultado. A coloração marrom avermelhado um indicativo de teste positivo e pasteurização eficiente, e sem alteração de cor indicativo de teste negativo e pasteurização inefetiva.

## **Resultados**

Há diversas enzimas fosfatases no leite cru, ou seja o leite que não passou por processo térmico, sendo encontradas principalmente na

membrana dos glóbulos de gorduras, a fosfatase alcalina apesar de não ser lipossolúvel representa 10% das proteínas de membrana, e pode ser encontrada dentro dos glóbulos de gordura e no plasma do leite (MACHADO, 2009).

A fosfatase alcalina, por apresentar alta sensibilidade a temperaturas elevadas e a pH ácido, tem a temperatura de 37°C e pH de 9,6-10,5 como a ideal para atividade, ela hidrolisa os grupos fosfatos das caseínas e dos ésteres solúveis, liberando substratos detectáveis pelos testes colorimétricos (MACHADO et al., 2009; SOUSA, 2022).

Essa enzima pode ser adotada como um marcador de eficiência da pasteurização, pois apesar de ser inativada em altas temperaturas ela apresenta maior resistência a esse fator do que os microrganismos potencialmente patogênicos e não esporulados, sendo responsiva a combinação de temperatura e tempo de pasteurização (LIMA et al., 2021).

A peroxidase é uma enzima oxidorredutase, para testar a atividade enzimática adiciona-se os reagentes peróxido de hidrogênio e guaiacol, ela irá hidrolisar o peróxido de hidrogênio liberando oxigênio, que reage com a molécula de guaiacol transformando sua leucobase para a forma corada (SEIXAS, 2014).

A enzima peroxidase não é inativada durante o processo de pasteurização, mas é destruída quando submetida a temperatura superior a 75°C por mais de 20 segundos, nesse caso após o teste o leite continua com a coloração branca devido a inatividade da enzima, sendo assim sua presença indica que não houve superaquecimento durante o processo térmico, e portanto sua atividade enzimática determina se a pasteurização foi efetiva (LIMA et al., 2021).

A Instrução Normativa MAPA - 68/2006 descreve o método de eleição para análise da atividade da fosfatase alcalina e da peroxidase, no entanto há outros métodos de avaliação disponíveis.

No presente estudo, o método utilizado foi as tiras de teste rápido de Fosfatase Alcalina e Peroxidase da CAP-LAB, o produto foi portanto utilizado de acordo com as recomendações do fabricante, e se assegurando que não havia avarias dos componentes utilizados, sendo os resultados demonstrados na figura 1.



Figura 1: Prova de Peroxidase em leite positiva (A) e Fosfatase alcalina negativa (B).

## Conclusões

A partir do estudo das atividades enzimáticas no leite cru e a análise dos resultados das tiras de teste de fosfatase alcalina e de peroxidase, constata-se que a pasteurização lenta por meio de equipamento novo adquirido para o Laboratório de Bezerros executa a sua função de reduzir a carga microbiana, assegurada pelas provas da Fosfatase Alcalina e Peroxidase.

## Referências

- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002. Brasília.
- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 68, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2006. Brasília.
- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. Brasília..
- GOMES, V.; MARTIN, C. Leite de descarte: uma boa opção para alimentação de bezerras?. MilkPoint, coluna, Viviani Gomes, agosto, 2018.
- LIMA, J. S.; et al. Avaliação de métodos de detecção da fosfatase alcalina em leite bovino, bubalino e caprino. Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, p. e2020130, 2021.
- MACHADO, G. M.; et al. Fosfatase alcalina em leite e derivados: aspectos teóricos e práticos. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 64, n. 370, p. 22– 28, 2009.
- SEIXAS, F. N.; et al. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. Rev. Inst. de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 1, p. 17-24, 2014
- SOUSA, F. A. Avaliação de métodos colorimétricos quantitativos e qualitativos da enzima fosfatase alcalina no leite. 2022. 67 f. Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2022.

# **PASTEURIZATION PROCESS IN DISCARDED MILK: EFFICACY TESTS**

**Natália Puzzi Goulart de Souza**

**Larissa Miranda Padilha**

**Professor Dr. Viviani Gomes**

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - University of São Paulo

natalia.pgs@usp.br

## **Objectives**

Discarded milk, which is unsuitable for human consumption, is commonly directed towards feeding calves in dairy production. Slow pasteurization is a method that allows for the reduction of microbial load in discarded milk but does not eliminate antimicrobial residues. This process involves heating the milk to a temperature of 62 to 68°C for 30 minutes to reduce the microbial load.

The aim of this research was to validate a pasteurization equipment in reducing the microbial load of discarded milk, using the Alkaline Phosphatase and Peroxidase tests.

## **Methods and Procedures**

The milk used in this study originated from Fazenda Agrindus S.A. - Letti - Fazenda Santa Rita, Descalvado, SP, and was transported in screw-top milk containers following the guidelines of Normative Instruction MAPA - 77/2018 to the Laboratory of Research in Calves, Fernando José Benesi, located at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - University of São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, SP.

A total of 200 liters of milk were collected from cows under antimicrobial treatment, including colostrum residues and transitional milk. Upon arrival at the laboratory, the milk's temperature was verified to be 10°C, and the milk was immediately transferred to the pasteurizer.

The slow pasteurization process was carried out using laboratory-specific new equipment. The equipment has the capacity to pasteurize 200 liters of milk per batch, heating it to a temperature of 63°C and maintaining it at that temperature for 30 minutes. After this period, the equipment starts to cool the milk.

Upon completing the pasteurization process, quick efficiency tests were conducted using Alkaline Phosphatase and Peroxidase test strips from the commercial brand CAP-LAB. These tests were performed following the manufacturer's recommendations. As indicated in the manual, the Alkaline Phosphatase was kept refrigerated, after pasteurization of the batch, followed by immersing the strip in milk for 10 seconds, and waiting for 2-3 minutes for the reading. A dark yellow color indicated a positive test and ineffective pasteurization, while pale yellow or colorless indicated a negative test and effective pasteurization.

The recommendations for Peroxidase were, after immersion the strip and absorption of the sample, it was removed from the milk, and a 10-second wait preceded the reading of the result. A reddish-brown color indicated a positive test and efficient pasteurization, while no color change indicated a negative test and ineffective pasteurization.

## **Results**

There are several phosphatase enzymes in raw milk, which is milk that has not undergone thermal processing, primarily found in the

membrane of fat globules. Alkaline phosphatase, despite not being liposoluble, represents 10% of membrane proteins and can be found inside fat globules and in milk plasma (MACHADO, 2009).

Alkaline phosphatase, due to its high sensitivity to elevated temperatures and acidic pH, has an ideal temperature for activity at 37°C and a pH range of 9,6-10,5. It hydrolyzes the phosphate groups of caseins and soluble esters, releasing substrates detectable by colorimetric tests (MACHADO et al., 2009; SOUSA, 2022).

This enzyme can be adopted as a marker of pasteurization efficiency because, despite being inactivated at high temperatures, it exhibits greater resistance to this factor than potentially pathogenic and non-sporulated microorganisms. It responds to the combination of pasteurization temperature and time (LIMA et al., 2021).

Peroxidase is an oxidoreductase enzyme. To test its enzymatic activity, hydrogen peroxide and guaiacol reagents are added, leading to the hydrolysis of hydrogen peroxide and the release of oxygen. The oxygen reacts with guaiacol molecules, turning their leucobase into colored form (SEIXAS, 2014).

Peroxidase is not inactivated during the pasteurization process but is destroyed when exposed to temperatures above 75°C for more than 20 seconds. In such cases, after the test, the milk remains white due to the enzyme's inactivity. Therefore, its presence indicates that there was no overheating during the thermal process, and its enzymatic activity determines the effectiveness of pasteurization (LIMA et al., 2021).

Normative Instruction MAPA - 68/2006 describes the preferred method for analyzing the activity of alkaline phosphatase and peroxidase. However, other evaluation methods are available.

In the study, the method used was CAP-LAB's rapid test strips for Alkaline Phosphatase and Peroxidase. The product was used following the manufacturer's recommendations, ensuring that the components used were not damaged. The results are shown in Figure 1.



Figure 1: Positive Peroxidase Test in Milk (A) and Negative Alkaline Phosphatase Test (B).

## Conclusions

The study of enzymatic activities in raw milk and the analysis of the results from the test strips for alkaline phosphatase and peroxidase, it appears that slow pasteurization using newly acquired equipment for the Calves Laboratory performs its function of reducing the load microbial, assured by Alkaline Phosphatase and Peroxidase tests.

## References

- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002. Brasília.
- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 68, DE 12 DE DEZ. DE 2006. Brasília.
- BRASIL. Diário Oficial da União, INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. Brasília.
- GOMES, V.; MARTIN, C. Leite de descarte: uma boa opção para alimentação de bezerras?. MilkPoint, coluna, Viviani Gomes, agosto, 2018.
- LIMA, J. S.; et al. Avaliação de métodos de detecção da fosfatase alcalina em leite bovino, bubalino e caprino. Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, p. e2020130, 2021.
- MACHADO, G. M.; et al. Fosfatase alcalina em leite e derivados: aspectos teóricos e práticos. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 64, n. 370, p. 22– 28, 2009.
- SEIXAS, F. N.; et al. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. Rev. Inst. de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 1, p. 17-24, 2014
- SOUSA, F. A. Avaliação de métodos colorimétricos quantitativos e qualitativos da enzima fosfatase alcalina no leite. 2022. 67 f. Dissertação Mestrado em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2022.