



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Paula Cristina Coelho Carvalho de Pina

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO EM  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE CRU E NA INATIVAÇÃO DA  
MICROBIOTA**

Florianópolis - SC

2024

Paula Cristina Coelho Carvalho de Pina

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO EM  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE CRU E NA INATIVAÇÃO DA  
MICROBIOTA**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano José de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz

Coorientadora: Profa. Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro

Florianópolis - SC

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pina, Paula Cristina Coelho Carvalho de

Avaliação da influência do plasma frio atmosférico em parâmetros físico-químicos do leite cru e na inativação da microbiota / Paula Cristina Coelho Carvalho de Pina ; orientador, Cristiano José de Andrade, coorientador, Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz, coorientador, Deise Helena Baggio Ribeiro, 2024.

81 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Tratamento não térmico. 3. Conservação de alimentos. 4. Listeria innocua. I. Andrade, Cristiano José de. II. Fritz, Alcilene Rodrigues Monteiro. III. Ribeiro, Deise Helena Baggio IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. V. Título.

Paula Cristina Coelho Carvalho de Pina

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PLASMA FRIO ATMOSFÉRICO EM  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO LEITE CRU E NA INATIVAÇÃO DA  
MICROBIOTA**

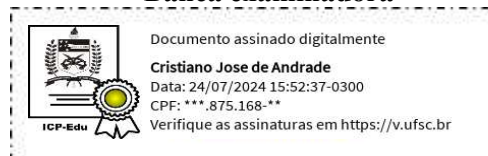
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 08 de julho de 2024.

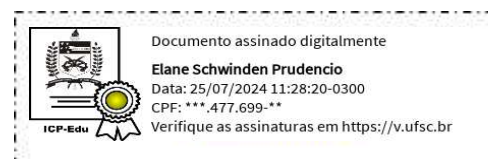


Prof. Dr. Marco Di Luccio  
Coordenação do Curso

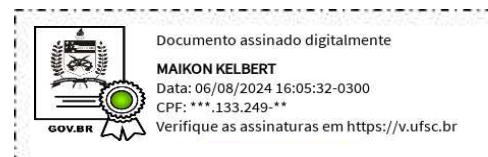
**Banca examinadora**



Prof. Dr. Cristiano José de Andrade  
Orientador



Profa. Dra. Elane Schwinden Prudêncio  
Membro interno - UFSC



Dr. Maikon Kelbert  
Membro interno - UFSC

Florianópolis, 2024

À minha mãe, cujo amor e apoio incondicional foram a minha força durante esta jornada. Sem a senhora, eu não estaria aqui. Esta conquista é nossa.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder saúde e força para superar os desafios e concluir este trabalho.

À minha mãe, cujo amor, dedicação e fé inabalável em mim foram a base da minha jornada educacional.

Aos meus avós, José e Angelina, e à minha madrinha, Júlia, que, embora não estejam mais entre nós, deixaram um legado de amor pelo conhecimento e pela educação.

Aos meus irmãos, Ailton e Elisângela, por estarem sempre ao meu lado e por serem uma fonte de apoio e encorajamento.

À minha amiga Vanessa, por estar comigo desde o início, compartilhando momentos de alegria e frustração. Sua presença constante e seu carinho foram um verdadeiro presente em minha vida.

Ao meu professor orientador, Dr. Cristiano, pela orientação precisa, pelo suporte, disponibilidade e pela confiança investida em meu trabalho.

Às minhas professoras co-orientadoras, Dra. Alcilene e Dra. Deise, pela paciência, assistência em laboratório e conselhos valiosos que foram essenciais para este trabalho.

À Jaqueline, pela experiência compartilhada durante minha iniciação científica.

À Dra. Denise e Me. Sandra pelos conselhos e pelas dicas práticas. À Dra. Raquel, pela ajuda no laboratório, orientando-me na utilização dos equipamentos e fornecendo sugestões úteis.

À Karina, por toda a ajuda no laboratório.

À Isabela, por me auxiliar nas análises estatísticas.

Aos membros da banca, Dr. Maikon e Dra. Elane, pela consideração e disponibilidade.

À equipe e às instalações dos laboratórios PROFI, LiEB e LABCAL, cuja assistência foi crucial para a execução deste trabalho.

À UFSC, por proporcionar um ensino gratuito e de qualidade, reafirmando a importância do ensino público para a sociedade.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

*“...vida e um rio ki ta disliza ti sol. Di li pa dianti, horizonti fundu, altu, largu...so luz. Sigui  
bu sol...siga”*

*Sara Tavares*

## RESUMO

A conservação do leite é um desafio devido à sua alta perecibilidade e complexidade. O plasma frio surge como uma alternativa ecologicamente amigável, por operar com baixas temperaturas, com economia de energia e menor emissão de gases de efeito estufa, por preservar componentes nutricionais e funcionais do leite e por promover o uso de novas tecnologias na indústria. Diante desse contexto, o presente estudo objetivou a avaliação da alteração de parâmetros físico-químicos e do impacto na redução da carga microbiana do leite cru e da redução de *L. innocua* do leite UHT. O sistema utilizado foi o de descarga de barreira dielétrica com voltagem de 17 kV, frequência de 60 Hz e corrente de 30 mA, nos tempos de 0; 1,0 ; 2,5 e 5,0 min. Foram realizadas análise de temperatura, pH, acidez titulável e atividade da redutase conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz, e contagem de microrganismo mesófilos, psicotróficos e *L. innocua* pela técnica de plaqueamento em gota em PCA. A temperatura máxima registrada foi de aproximadamente 23 °C, não ultrapassando temperaturas de pasteurização; os valores de pH permaneceram entre 6,69 e 6,80, com leve aumento conforme o tempo de exposição ao plasma frio; a acidez titulável manteve-se sem muita variação em 18°D, permanecendo dentro da faixa regulatória; não houveram alterações no teste de redutase, excedendo 5 horas para a transição de cor. A contagem de psicotróficos reduziu significativamente ( $6,00 \pm 0,002 \log_{10}$  -  $5,57 \pm 0,09 \log_{10}$  UFC/mL, para  $p < 0,1$ ), mas não foi tão eficaz para os mesófilos ( $5,816 \pm 0,003$  -  $5,701 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/mL, para  $p < 0,1$ ) e para *L. innocua* ( $5,588 \pm 0,05$  -  $5,398 \pm 0,02 \log_{10}$  UFC/mL). Os efeitos observados podem estar relacionados às características metabólicas e à composição celular destes microrganismos; eficácia do plasma frio ser maior em contagens microbianas baixas e com a possibilidade de avaliar o comportamento desses microrganismos ao longo do tempo após o tratamento com plasma frio. Dessa forma, o tratamento com plasma frio é inovador e mostrou potencial para redução microbiana, no entanto, ajustes e estudos adicionais são necessários para viabilizar sua implementação em escala industrial, considerando infraestrutura, custos, padronização, segurança alimentar e requisitos regulatórios.

**Palavras-chave:** tratamento não térmico; conservação de alimentos; *Listeria innocua*.



## ABSTRACT

The preservation of milk is a challenge due to its high perishability and complexity. Cold plasma emerges as an environmentally friendly alternative, operating at low temperatures, with energy savings and lower greenhouse gas emissions, while preserving the nutritional and functional components of milk and promoting the use of new technologies in the industry. In this context, the present study aimed to evaluate the changes in physicochemical parameters and the impact on the reduction of the microbial load in raw milk and the reduction of *Listeria innocua* in UHT milk. The system used was a dielectric barrier discharge with a voltage of 17 kV, frequency of 60 Hz, and current of 30 mA, for 0, 1.0, 2.5, and 5.0 minutes. Analyses of temperature, pH, titratable acidity, and reductase activity were performed as described by the Adolfo Lutz Institute, and the counts of mesophilic, psychrotrophic microorganisms, and *L. innocua* were conducted using the drop plating technique on PCA. The maximum temperature recorded was approximately 23 °C, not exceeding pasteurization temperatures; pH values remained between 6.69 and 6.80, with a slight increase as the exposure time to cold plasma increased; titratable acidity showed little variation, remaining at 18°D, within the regulatory range; there were no changes in the reductase test, exceeding 5 hours for color transition. The psychrotrophic count significantly reduced ( $6.00 \pm 0.002 \log_{10}$  -  $5.57 \pm 0.09 \log_{10}$  CFU/mL, for  $p < 0.1$ ), but it was not as effective for mesophiles ( $5.816 \pm 0.003$  -  $5.701 \pm 0.06 \log_{10}$  CFU/mL, for  $p < 0.1$ ) and for *L. innocua* ( $5.588 \pm 0.05$  -  $5.398 \pm 0.02 \log_{10}$  CFU/mL). The observed effects may be related to the metabolic characteristics and cellular composition of these microorganisms; the effectiveness of cold plasma being greater at low microbial counts and the possibility of evaluating the behavior of these microorganisms over time after cold plasma treatment. Thus, cold plasma treatment is innovative and showed potential for microbial reduction; however, adjustments and further studies are necessary to enable its implementation on an industrial scale, considering infrastructure, costs, standardization, food safety, and regulatory requirements.

**Keywords:** Non-thermal treatment; food preservation; *Listeria innocua*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Presunto cozido inoculado com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
Figura 2 - Modelo de evolução de LIPI-1 entre as espécies de <i>Listeria</i> .....	26
Figura 3 - Fluxograma básico do tratamento térmico da pasteurização rápida.....	28
Figura 4 - Fluxograma do tratamento térmico de esterilização Ultra Alta Temperatura.....	29
Figura 5 - Estados da matéria - sólido, líquido, gás e plasma da matéria.....	31
Figura 6 - Processo de geração de plasma.....	34
Figura 7 - Esquema ilustrativo do tratamento com plasma DBD.....	35
Figura 8 - Pirâmide da sensibilidade dos microrganismos ao plasma.....	37
Figura 9 - Mecanismo de inativação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas usando plasma frio.....	39
Figura 10 - Procedimento para as diluições seriadas e para o plaqueamento.....	46
Figura 11 - Reativação de <i>Listeria innocua</i> .....	47
Figura 12 - Procedimento para determinação da concentração inicial de bactérias.....	47
Figura 13 - Procedimento para a inoculação de <i>Listeria innocua</i> no leite esterilizado.....	48
Figura 14 - Gráfico das contagens de bactérias mesófilas e psicrotóficas (log <sub>10</sub> UFC/mL) ao longo dos tempos de exposição ao plasma frio.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais componentes do leite bovino.....	21
Tabela 2 - Tabela comparativa entre o leite pasteurizado pelo processo de pasteurização rápida e o leite submetido à Ultra Alta Temperatura.....	30
Tabela 3 - Estudos realizados aplicando o plasma frio no tratamento de laticínios.....	41
Tabela 4 - Resultados da caracterização físico-química do leite cru antes e após a aplicação do plasma frio, assim como os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.....	49
Tabela 5 - Variação da temperatura do leite após tratamento com plasma frio em diferentes intervalos de tempo.....	49
Tabela 6 - Classificação da qualidade do leite através do teste de azul de metileno.....	54
Tabela 7 - Resultados da avaliação da redução de bactérias mesófilas e psicotróficas do leite cru antes e após submissão ao tratamento de plasma frio.....	55
Tabela 8 - Resultados da avaliação da redução de <i>Listeria innocua</i> do leite UAT antes e após submissão ao tratamento de plasma frio.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Unidade de medida de temperatura, em grau Celsius
°D	Unidade de medida de acidez do leite, em graus Dornic
ANOVA	Análise de Variância
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CPP	Contagem Padrão de Placas
DBD	Descarga de Barreira Dielétrica
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	<i>Food And Agriculture Organization</i>
GDP	<i>Global Dairy Platform</i>
g/mL	Unidade de medida de densidade ou concentração, gramas por mililitro
HTST	<i>High Temperature, Short Time</i>
K	Unidade de medida de temperatura, em Kelvin
kV	Unidade de medida de tensão elétrica, em quilovolts
LiEB	Laboratório de Engenharia Biológica
log	Operador da função logaritmo
LTLT	<i>Low Temperature, Long Time</i>
μL	Unidade de volume, em microlitros
μm	Unidade de medida de comprimento, em micrômetro
cm	Unidade de medida de comprimento, em centímetro
mA	Corrente elétrica, em miliampères
min	Minuto
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PFA	Plasma Frio Atmosférico

pH	Potencial de íons de hidrogênio em solução
PROFI	Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
s	Segundos
SISBI-POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
Te	Temperatura de Elétrons
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UV	Radiação Ultravioleta
W	Unidade de medida de potência, watt



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
3.1	LEITE.....	19
<b>3.1.1</b>	<b>Conceito e o papel do leite na alimentação humana.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Composição.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Qualidade e características físico-químicas.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Aspectos microbiológicos.....</b>	<b>22</b>
3.2	GÊNERO <i>Listeria</i> .....	24
<b>3.2.1</b>	<b><i>Listeria innocua</i> como um arquétipo biológico de <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>25</b>
3.3	TRATAMENTOS CONVENCIONAIS APLICADOS AO LEITE.....	26
<b>3.3.1</b>	<b>Pasteurização.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Esterilização UAT.....</b>	<b>28</b>
3.4	PLASMA.....	31
3.5	PLASMA FRIO.....	33
<b>3.5.1</b>	<b>Geração de plasma frio.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.1.1</b>	<b><i>Descarga de Barreira Dielétrica</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Mecanismo e parâmetros para a inativação microbiana.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Aplicação na indústria de laticínios.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	43
4.2	MONTAGEM DO EQUIPAMENTO COM REATOR DBD.....	43
4.3	TRATAMENTO COM PLASMA FRIO.....	44
4.4	ANÁLISES DE QUALIDADE DO LEITE CRU.....	44
<b>4.4.1</b>	<b>Temperatura.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.2</b>	<b>pH.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Acidez titulável.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Redutase.....</b>	<b>45</b>
4.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	45
<b>4.5.1</b>	<b>Determinação de mesófilos aeróbios e psicrotróficos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Avaliação de inativação de <i>Listeria innocua</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Análise estatística microbiológica.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1	ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE DO LEITE CRU.....	49

<b>5.1.1</b>	<b>Temperatura.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.2</b>	<b>pH.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Acidez titulável.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Redutase.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2</b>	<b>ANÁLISES DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>ANÁLISES DE REDUÇÃO DE <i>Listeria innocua</i> NO LEITE UAT.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O leite é frequentemente definido como "alimento perfeito," devido sua rica composição nutricional, incluindo proteínas, vitaminas e minerais (Haug *et al.*, 2007; Muehlhoff *et al.*, 2013). O leite é de fundamental importância na pirâmide alimentar da vida humana, sendo um dos alimentos mais consumidos (Murphy *et al.*, 2017; Strassburger *et al.*, 2019). Devido à sua constituição físico-química e microbiológica, o leite é um alimento perecível. Assim, há a necessidade em adotar estratégias que prolonguem sua vida útil. Adicionalmente, a ameaça de contaminação por patógenos, como a *Listeria monocytogenes*, apresenta desafios significativos em relação à segurança alimentar (FAO, 2013; Nascimento; Galvão, 2020).

*L. monocytogenes* contamina o leite, frequentemente, por meio da contaminação cruzada durante a ordenha ou do contato com superfícies e equipamentos inadequadamente higienizados (Borges *et al.*, 2009). A infecção em humanos por *L. monocytogenes* é uma preocupação significativa, uma vez que essa bactéria pode causar uma doença grave chamada listeriose. Os sintomas da listeriose podem variar desde febre e desconforto gastrointestinal até complicações, como septicemia, meningite e abortos em mulheres grávidas (Constable *et al.*, 2016; Schoder *et al.*, 2011; Thomas, 2016). Além disso, a *L. monocytogenes* é conhecida por sua capacidade de formar biofilmes em superfícies. Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se aderem a superfícies e produzem uma matriz extracelular, tornando-se altamente resistentes a processos de limpeza e desinfecção, ou seja, um ambiente contínuo de contaminação potencial, mesmo quando as instalações são aparentemente higienizadas (González-Rivas *et al.*, 2018; Miguel; Almeida, 2022).

No âmbito das técnicas de preservação aplicadas ao leite, sobressaem-se os processos de tratamento térmico. Estas metodologias são amplamente adotadas pela indústria de laticínios para inativar microrganismos patogênicos e enzimas indesejáveis. Entre as práticas mais notáveis, destacam-se a pasteurização e a esterilização UHT (*Ultra High Temperature* ou UAT - *Ultra Alta Temperatura*), os quais se destinam à erradicação de microrganismos com potencial patogênico e/ou agentes de deterioração (Coutinho *et al.*, 2016).

Existem dois tipos principais de pasteurização: a lenta (62 a 63 °C por 30 a 35 minutos) e a rápida (72 a 75 °C por 15 a 20 segundos) (Brasil, 2017). A pasteurização rápida é notavelmente eficaz na eliminação de bactérias patogênicas, mas não é tão eficaz contra os esporos bacterianos. Apesar da pasteurização, o leite ainda precisa ser adequadamente refrigerado para manter sua qualidade e segurança (Costa, 2011).

Além desses, existem os tratamentos UAT, que aplicam temperaturas variando de 130 a 150 °C, por 2 a 4 segundos (Brasil, 2017). Este processo visa a esterilização completa do leite, eliminando patógenos e microrganismos termorresistentes, conhecidos como esporos (Karlsson *et al.*, 2019). O leite é então rapidamente resfriado e acondicionado em embalagens esterilizadas, seladas hermeticamente, seguindo práticas assépticas rigorosas (Brasil, 2017).

Diante desses desafios, tecnologias não térmicas de preservação de alimentos têm sido exploradas como alternativas promissoras. Essas tecnologias buscam proporcionar a segurança e a qualidade dos alimentos, minimizando as perdas de compostos de interesse e mantendo a excelência sensorial dos produtos. Entre elas está a microfiltração (France *et al.*, 2021); a tecnologia de luz pulsada (Abida *et al.*, 2014); a irradiação, (Odueke *et al.*, 2016) e o plasma frio (Coutinho *et al.*, 2018). No entanto, a regulamentação brasileira não contempla o uso isolado dessas tecnologias. Além disso, o processamento térmico está bem estabelecido e tem servido muito bem à indústria. Qualquer nova tecnologia para substituir um processo térmico deve oferecer vantagens claras em termos de custos e qualidade do produto, ou deve ser capaz de realizar funções adicionais que não podem ser realizadas apenas pelo calor (Deeth; Datta, 2011; Coutinho *et al.*, 2018).

O plasma frio é uma tecnologia não térmica relativamente nova, ecologicamente amigável e altamente eficiente que continua a atrair a atenção da indústria de alimentos, uma vez que é capaz de proporcionar reduções significativas de microrganismos com um mínimo de deterioração na qualidade do produto, especialmente em situações em que existe sensibilidade térmica. Contudo, definir precisamente as condições operacionais é uma das principais dificuldades, impedindo a comparação entre estudos e a ampliação da escala do laboratório para a indústria (Coutinho *et al.*, 2018). Além disso, a avaliação econômica do uso de plasma frio na indústria alimentícia é essencial, considerando o investimento em equipamentos, consumo de energia e custos gerais de produção (Barba *et al.*, 2017). Embora inicialmente mais caras, espera-se que as tecnologias não térmicas se tornem mais acessíveis com a comercialização, e as melhorias na qualidade sensorial podem justificar o investimento (Li; Farid, 2016).

O plasma, também conhecido como o “quarto estado da matéria”, é um gás ionizado composto por várias partículas, incluindo fótons, elétrons, íons, átomos, radicais livres e moléculas. Apesar da diversidade de partículas, o plasma é quase neutro em termos de carga elétrica. Isso o torna uma opção promissora para a conservação e processamento de alimentos, com o objetivo de produzir produtos de alta qualidade com perda mínima de nutrientes e preservação das características sensoriais (Coutinho *et al.*, 2016).

Trabalhos demonstraram o potencial do plasma frio na redução da microbiota de laticínios. Gurol *et al.* (2012) avaliaram o potencial do plasma frio de descarga corona (9 kV nos tempos 0 e 20 minutos) na inativação de *Escherichia coli* do leite semidesnatado e do leite desnatado. Os resultados revelaram que houve redução de 54% em células viáveis de *E. coli* após 3 minutos, independentemente do teor de gordura no leite e sem efeitos no pH e na cor do leite. Nenhuma célula viável foi detectada após uma semana de exame em amostras de leite e assim permaneceu durante o período de armazenamento de 6 semanas. Yong e colaboradores (2015) avaliaram a inativação de patógenos e as mudanças de qualidade em queijo cheddar fatiado utilizando plasma DBD. O tratamento foi realizado sob uma voltagem de 15 kV e potência de 2 W, com tempos de tratamento de 75 segundos, 4 minutos e 10 minutos. Com o aumento do tempo de tratamento, observou-se uma diminuição no pH, reduções no sabor e um aumento no odor desagradável. A inativação de *L. monocytogenes* foi alcançada com 10 minutos de tratamento.

Neste contexto, este trabalho propõe avaliar a eficácia do PFA na inativação de *Listeria innocua* no leite e a influência desse tratamento na microbiota do leite cru, assim como algumas análises de qualidade. *L. innocua* foi escolhida como espécie modelo, principalmente pela estreita relação com *L. monocytogenes* (Costa *et al.*, 2018).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do plasma frio atmosférico em parâmetros físico-químicos do leite cru, bem como seu impacto na microbiota e inativação de *L. innocua* no leite.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar alterações na temperatura, pH, acidez e atividade da redutase por redução do azul de metileno no leite cru;
- Avaliar a redução da contagem microbiana em leite cru após 0; 1,0; 2,5 e 5,0 minutos;
- Avaliar a inativação de *L. innocua* no leite esterilizado UAT após 0; 1,0; 2,5 e 5,0 minutos;
- Realizar análises estatísticas para avaliar a eficácia nas reduções microbianas.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 LEITE**

##### **3.1.1 Conceito e o papel do leite na alimentação humana**

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite é definido como o produto resultante da ordenha completa e contínua, realizada sob condições higiênicas, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. Caso provenha de outras espécies, o leite deve ser identificado de acordo com a espécie de origem (Brasil, 2017).

O leite, produzido pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos, é um alimento nutritivo essencial. Sua função principal é fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento dos recém-nascidos. Entre os mamíferos, as vacas se destacam como uma das principais fontes de leite para o consumo humano (FAO, 2013; Hue-Beauvais *et al.*, 2021).

A riqueza nutricional do leite e seus produtos lácteos, como iogurte e queijo tem sido amplamente comprovada (Mozaffarian, 2019; Savaiano; Hutkins, 2020). Eles representam fontes excepcionais de nutrientes, incluindo minerais essenciais e vitaminas importantes (Kok; Hutkins, 2018). O leite de vaca também é uma boa fonte de proteínas caracterizadas por alto valor biológico, desempenhando diversas funções imunológicas, além de contribuir para o transporte e absorção de nutrientes (Pereira, 2014; Qin *et al.*, 2009; Verduci *et al.*, 2019; Zimecki; Kruzel, 2007).

De acordo com as estatísticas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o leite e seus produtos derivados são os mais consumidos entre todos os tipos de leite de mamíferos, representando aproximadamente 81,26% da produção global (FAO, 2021).

O leite é uma das commodities agropecuárias mais importantes no mundo, estando entre os cinco produtos de maior comércio em volume e valor. Aproximadamente 1 bilhão de pessoas dependem do leite para sua subsistência, enquanto cerca de 600 milhões vivem em proximidade a 133 milhões de propriedades rurais dedicadas à produção leiteira globalmente. Consequentemente, cerca de 10% da população mundial está envolvida na atividade leiteira (GDP, 2017).

No Brasil, a produção de leite tem apresentado uma média de crescimento anual de 4%, conforme dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Esse aumento contínuo reforça a posição do país como o quinto maior produtor de leite no mundo (FAO, 2020). Em 2021, essa expansão resultou na produção de 35,5 milhões de toneladas de leite (Carneiro et al., 2022).

### 3.1.2 Composição

Na sua forma líquida, o leite é composto em grande parte por água, que constitui aproximadamente 87% de sua composição total. Enquanto isso, a sua fração sólida abriga uma constante variedade de elementos, contribuindo com cerca de 12 a 13% do conteúdo integral do leite. Esses componentes abrangem lipídios, proteínas, carboidratos, bem como vitaminas e minerais (Brito *et al.*, 2021).

Conforme a Tabela 1, a lactose, o principal carboidrato presente, constitui aproximadamente 5% do leite, com variações entre 4,7 e 5,2%. As proteínas, que representam de 3 a 4% dos sólidos lácteos, têm sua quantidade influenciada por diversos fatores, incluindo a raça do animal e a presença de gordura no leite (Brito *et al.*, 2021).

A gordura, por sua vez, tem uma concentração que geralmente oscila entre 3,5% e 5,3%, dependendo de variáveis como a raça do animal, o estágio da lactação e a dieta do animal. Além disso, o leite é uma fonte significativa de vitaminas como as vitaminas A, D, E e K, que estão associadas à gordura, enquanto outras, como as do complexo B e a vitamina C, estão associadas à fração aquosa do leite. É importante ressaltar que, embora o leite seja uma fonte relevante de vitamina C, esta é rapidamente oxidada na presença de cobre, transformando-se em um produto biologicamente inativo (Brito *et al.*, 2021).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns dos constituintes do leite juntamente com seus respectivos valores de referência.

Tabela 1 - Principais componentes do leite bovino.

<b>Componentes</b>	<b>Percentual no leite (m/v)</b>
<b>Água</b>	87,0
<b>Sólidos Totais</b>	12,0 a 13,0
<b>Gordura</b>	3,5 a 5,3
<b>Proteína</b>	3,0 a 4,0
<b>Lactose</b>	4,7 a 5,2
<b>Minerais</b>	0,7 a 0,8

Fonte: adaptado de Brito *et al.*, (2021) e Ordoñez *et al.*, (2005)

### 3.1.3 Qualidade e características físico-químicas

O leite é uma emulsão diluída combinada com uma dispersão coloidal em que a fase contínua é uma solução. Suas propriedades físicas são semelhantes às da água, mas são modificadas pela concentração de solutos e pelo estado de dispersão dos outros componentes (Bauman *et al.*, 2006; Sherbon, 1988).

Produzido sob condições ideais, o leite fresco apresenta uma cor opaca branco-amarelada, um sabor levemente adocicado e um odor suave e levemente ácido. Adicionalmente, possui uma consistência líquida e homogênea, e quando deixado em repouso, forma uma camada de gordura na superfície (Silva, 1997).

O leite de alta qualidade é caracterizado por sua rica nutrição e ausência de microrganismos patogênicos e contaminantes, como antibióticos e agrotóxicos. Além disso, não deve haver adição de água ou sujidades. Outros fatores importantes para a qualidade do leite incluem uma contagem mínima de células somáticas, a sanidade do rebanho e a limpeza dos equipamentos e utensílios utilizados na produção. A higiene do local de obtenção do leite, do ordenhador e a qualidade da água utilizada na propriedade são aspectos cruciais que podem afetar a qualidade do leite e a saúde tanto dos humanos quanto dos animais. Portanto, é essencial estar atento a essas condições higiênico-sanitárias durante a ordenha e à saúde do animal para garantir a produção de leite de alta qualidade, além de avaliar as características físico-químicas do produto para verificar o seu estado de conservação (Venturini *et al.*, 2007).

A avaliação da qualidade do leite envolve uma série de parâmetros. Isso inclui aspectos físico-químicos como a estabilidade ao alizarol, a acidez titulável, a densidade relativa e o índice crioscópico. Além disso, a composição do leite é avaliada em termos de gordura, proteína e extrato seco desengordurado. Paralelamente, os padrões higiênico-sanitários são verificados por meio da contagem total bacteriana, da contagem de células somáticas e da detecção de resíduos de antibióticos (Dias; Antes, 2014).

De acordo com o RIISPOA, o leite é considerado normal quando apresenta características específicas: um teor mínimo de gordura de 3%; acidez em graus Dornic entre 15 e 20 °D; densidade a 15 °C variando de 1,028 a 1,033 (g/mL); um teor mínimo de lactose de 4,3%; extrato seco desengordurado de no mínimo 8,5%; extrato seco total de no mínimo 11,5%; e índice crioscópico mínimo de -0,55 °C (Brasil, 2017).

O leite, em sua complexidade intrínseca, demanda uma manipulação cuidadosa e análises meticolosas para assegurar sua qualidade e segurança (Brito *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2021). A avaliação do leite vai além de suas características físico-químicas, abrangendo também os aspectos microbiológicos (Langoni *et al.*, 2011). A microbiota presente no leite pode exercer um impacto significativo sobre sua qualidade e segurança, tornando-se um elemento crucial na análise. Patógenos como *Listeria* sp, quando presentes, podem representar um risco à saúde dos consumidores. Ademais, a microbiota do leite pode influenciar as características sensoriais do leite e de seus derivados, reforçando a importância de sua consideração na avaliação da qualidade do leite (Borges *et al.*, 2009; Barancelli *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2021).

#### **3.1.4 Aspectos microbiológicos**

Conforme a Instrução Normativa nº 58, de 6 de novembro de 2019, o leite cru mantido sob refrigeração deve respeitar um limite máximo de Contagem Padrão em Placas de  $9 \times 10^5$  UFC/mL (novecentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro) antes de ser submetido ao processamento industrial (Brasil, 2019).

O leite cru, quando exposto ao ambiente externo, manifesta-se como um ecossistema aberto, suscetível à contaminação por uma variedade de microrganismos. Nesse contexto, as características intrínsecas do leite, associadas à temperatura e ao tempo, emergem como fatores determinantes, delineando quais microrganismos predominarão e se desenvolverão em detrimento dos demais (Vidal; Netto, 2018). Esta dinâmica explica a notável variação na

composição bacteriana do leite, influenciada pela origem e níveis de contaminação. Originado como um fluido estéril nos alvéolos da glândula mamária de uma vaca saudável, o leite, ao passar pelos processos de extração, manipulação e armazenamento, torna-se suscetível à contaminação por microrganismos provenientes não apenas do interior da glândula mamária, mas também da superfície dos tetos, úbere, equipamentos de ordenha, armazenamento e diversas fontes ambientais (Brito *et al.*, 2000). Originando-se de um animal saudável, sua contagem microbiana é de aproximadamente  $10^3$  UFC/mL, podendo atingir contagem superiores a  $10^6$  UFC/mL se as condições de higiene não forem mantidas. A superfície dos tetos é uma fonte significativa de contaminação, podendo chegar a  $10^9$  UFC/mL quando não higienizada corretamente. Contudo, a desinfecção e secagem prévia dos tetos proporcionam uma redução substancial nessa carga microbiana (Vidal; Netto, 2018).

Sob condições ideais de manuseio e conservação, as bactérias predominantes no leite são do tipo Gram-positivas (Vidal; Netto, 2018), como *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp., pode também incluir bactérias Gram-negativas e esporuladas, embora em proporções geralmente não superiores a 10%, assim como, pelo menos, um dos representantes do grupo dos coliformes (Ordoñez, 2005; Vidal; Netto, 2018).

O intervalo de temperatura entre 25 e 30 °C propicia uma proliferação significativa da microbiota láctica e dos coliformes, tornando crucial a refrigeração a 4 °C para inibir a multiplicação dos microrganismos mesófilos. Em contrapartida, as bactérias psicrótróficas, especialmente as aeróbias Gram-negativas como *Pseudomonas* spp., têm a capacidade de proliferar em temperaturas de refrigeração (Jay, 2005). O leite cru, mantido por vários dias sob refrigeração, pode apresentar uma diversidade de bactérias, incluindo *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria* (Jay, 2005).

O controle microbiológico na indústria láctea assume uma relevância ampliada devido ao aumento constante de surtos de toxinfecção alimentar, frequentemente relacionados ao consumo de leite e seus derivados (Camargo *et al.*, 1998). O leite, por ser um produto de origem animal, apresenta a capacidade de veicular diversos agentes potencialmente zoonóticos. Além disso, sua riqueza em composição nutricional cria um ambiente propício para o desenvolvimento microbiano (Nero *et al.*, 2000).

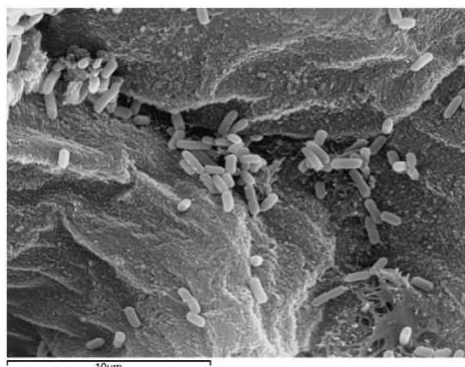


### 3.2 GÊNERO *Listeria*

Até o ano de 2010, o gênero *Listeria* era composto por seis espécies distintas, nomeadamente *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, das quais duas são patogênicas (Guillet *et al.*, 2010): apesar de serem originárias do ambiente, duas espécies de *Listeria* spp (*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*) são conhecidas por causar doenças em humanos e animais. *L. monocytogenes* é a espécie mais frequentemente associada a doenças, no entanto, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* também foram relatadas como causadoras de infecções ocasionais (Franco; Landgraf, 2023). Ao longo dos anos, foram isoladas, descritas e incluídas no gênero *Listeria* novas espécies: *Listeria marthii* (Graves *et al.*, 2010), *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010), *Listeria weihenstephanensis* (Halter *et al.*, 2013), *Listeria fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013), *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis* (Bakker *et al.*, 2014), *Listeria booriae*, *Listeria newyorkensis* (Weller, 2015), *Listeria costaricensis* (Nóñez-Montero, 2018), *Listeria goaensis* (Doijad *et al.*, 2018), *Listeria thailandensis* (Leclercq *et al.*, 2019), *Listeria valentina* (Quereda, 2020), *Listeria portnoyi*, *Listeria rustica*, *Listeria farberi*, *Listeria immobilis*, *Listeria cossartiae* (Carlin, 2021), e *Listeria ilorinensis* (Raufu, 2022) e *Listeria swaminathanii* (Carlin, 2022).

As espécies pertencentes ao gênero *Listeria*, conforme ilustrado na Figura 1, são caracterizadas por células de Gram-positivas com dimensões que variam de 0,4-0,5 µm de diâmetro e comprimento variando entre 0,5 a 2 µm. São anaeróbias facultativas e não são formadoras de esporos (Franco; Landgraf, 2023). Bactérias que pertencem a este gênero são caracterizadas por sua motilidade e a presença de flagelos peritríquios em temperaturas entre 20 °C e 25 °C. Contudo, a 37 °C, elas tendem a ser imóveis ou exibir uma motilidade reduzida. A *L. fleischmannii* é uma exceção notável, pois é imóvel nessas condições (Franco; Landgraf, 2023).

Figura 1 - Presunto cozido inoculado com *Listeria monocytogenes*.



Fonte: Hierro *et al.* (2011).

Bactérias deste tipo exibem um movimento característico chamado tombamento, que é útil para a sua identificação. Quando cultivadas em meio apropriado, elas se apresentam como se fossem um ‘guarda-chuva aberto’, localizado aproximadamente 0,5 cm abaixo da superfície do meio. Isso ocorre devido à sua condição de microaerofilia, uma característica distintiva desse microrganismo (Franco; Landgraf, 2023).

*L. monocytogenes* apresenta ampla faixa de temperatura para multiplicação, de 1 a 2 °C a 45 °C, e sobrevive a repetidos congelamentos e descongelamentos (Franco; Landgraf, 2023).

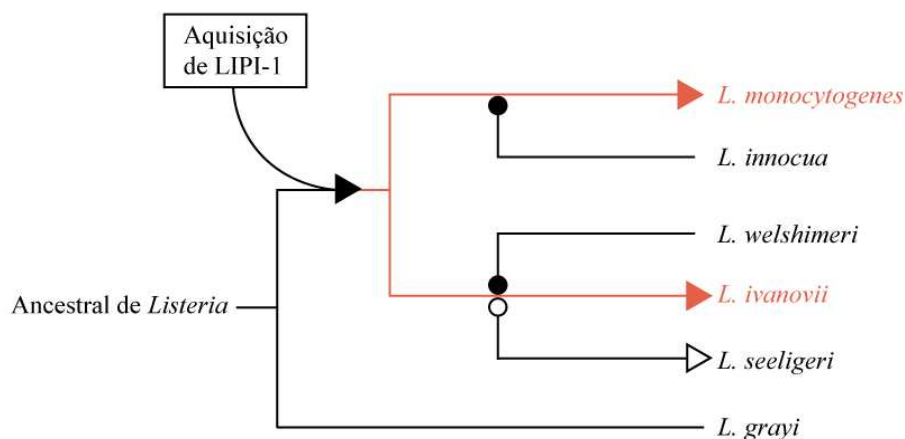
### 3.2.1 *Listeria innocua* como um arquétipo biológico de *Listeria monocytogenes*

*L. innocua*, em termos filogenéticos, mantém uma proximidade notável com *L. monocytogenes* (Hain *et al.*, 2006). Ambas compartilham uma série de características semelhantes, tanto em aspectos bioquímicos e condições de crescimento, quanto na resistência a diversos fatores ambientais, como acidez, dessecação, aquecimento e concentração de sais (Buzrul; Alpas, 2004).

Apesar da *L. innocua* ser amplamente reconhecida como não patogênica (Pereira, 2013; Hu; Gurtler, 2017; Costa *et al.*, 2018; Hasani *et al.* 2021) devido à ausência da Ilha de Patogenicidade 1 de *Listeria* (LIPI-1) em seu genoma, região que contém uma série de determinantes de virulência e que confere o caráter de patógeno intracelular (Figura 2) (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Pereira, 2013), alguns estudos têm desafiado essa visão. Esses estudos relatam casos ocasionais de infecções causadas por *L. innocua*, sugerindo que ela pode, de fato, ter potencial patogênico sob certas circunstâncias. Foram relatados casos de

listeriose causada por *L. innocua*, incluindo bacteremia fatal (Perrin *et al.*, 2003), meningite (Favaro *et al.*, 2014) e sepsse fatal em um recém-nascido (Arumugam *et al.*, 2001) em humanos, bem como listeriose cerebral em bovinos destinados à produção de carne (Rocha *et al.*, 2013).

Figura 2 - Modelo de evolução de LIPI-1 entre as espécies de *Listeria*.



Nota: Os círculos de cor preta denotam a perda deste segmento genômico, enquanto o círculo de cor branca representa uma versão inoperante desta ilha. As proporções entre os ramos não correspondem às distâncias genéticas.

Fonte: adaptado de Vázquez-Boland *et al.* (2001), Pereira (2013).

Embora seja raro encontrar casos de infecção por *L. innocua*, é crucial realizar mais estudos para compreender totalmente a capacidade patogênica desta bactéria (Ravindhiran *et al.*, 2023). Além disso, devido à sua semelhança genética com *L. monocytogenes*, *L. innocua* é frequentemente utilizada como um modelo biológico em várias pesquisas (Costa *et al.*, 2018; Kaszoni-Rückerl *et al.*, 2020; Baldelli *et al.*, 2024).

### 3.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS APLICADOS AO LEITE

#### 3.3.1 Pasteurização

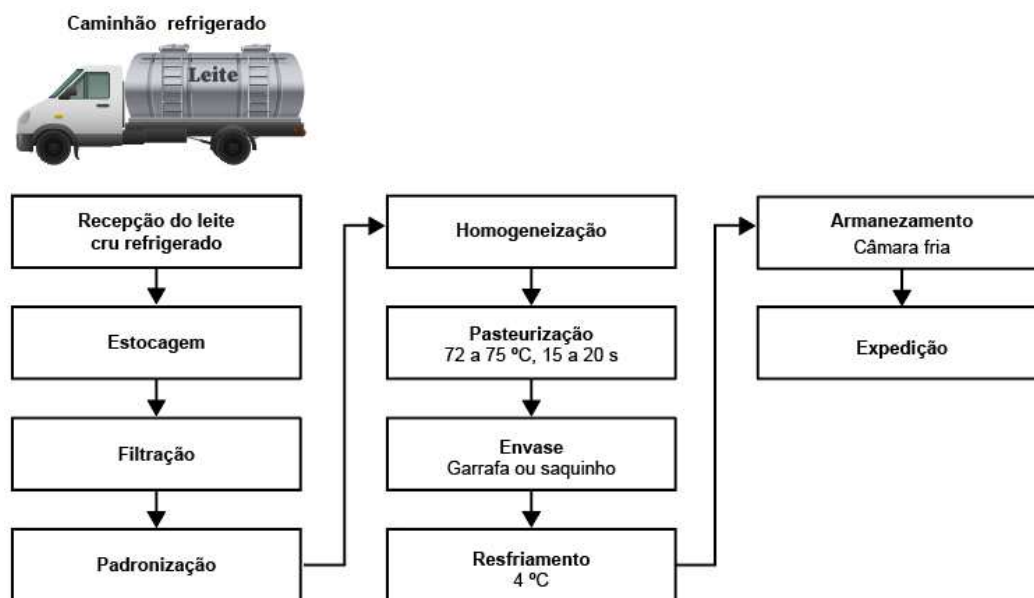
A introdução da pasteurização no processamento do leite foi inicialmente direcionada para a erradicação do *Mycobacterium tuberculosis*, a bactéria responsável pela tuberculose. O método original consistia em aquecer o leite a 61,5 °C por um período de 30 minutos. No entanto, foi observado que o patógeno *Coxiella burnetii* resistia a esse tratamento, o que levou a uma modificação do processo, aumentando a temperatura para 63

°C pelo mesmo período de tempo. Além da eliminação desses patógenos específicos, a pasteurização também é eficaz na destruição de microrganismos sensíveis ao calor, como os coliformes, e na inativação da enzima fosfatase alcalina. Embora a pasteurização seja eficaz na eliminação de muitos microrganismos, esporos e bactérias resistentes ao calor podem persistir após o tratamento. Isso significa que o leite pasteurizado ainda necessita de medidas de conservação rigorosas para manter sua qualidade e segurança (Dergal, 2006). Segundo a Instrução Normativa nº 55/2020, na unidade de beneficiamento de leite e derivados, a temperatura de conservação adequada para o leite cru refrigerado pode atingir até 7 °C, e mantido a no máximo 5 °C durante o armazenamento em tanques de refrigeração. Assim, mesmo após a pasteurização, o controle rigoroso da temperatura desempenha um papel crucial na garantia da vida útil do leite pasteurizado, que é tipicamente limitada a apenas alguns dias (Brasil, 2020; Dergal, 2006).

Segundo a Instrução Normativa nº 76/2018, o Brasil classifica o leite produzido em duas categorias: leite pasteurizado e leite pasteurizado tipo A. O leite pasteurizado é caracterizado como um produto lácteo fluido que passou por um dos processos de pasteurização estabelecidos na legislação vigente. Este leite é envasado automaticamente em um circuito fechado e destinado ao consumo humano direto. Por outro lado, o leite pasteurizado tipo A é um produto lácteo fluido que é produzido, beneficiado e envasado exclusivamente em granjas leiteiras. Assim como o leite pasteurizado, ele é submetido a um dos processos de pasteurização previstos na legislação vigente e envasado automaticamente em um circuito fechado (Brasil, 2018).

Conforme estabelecido pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, existem dois processos de pasteurização aplicáveis ao leite. O primeiro é a pasteurização lenta, que envolve o aquecimento indireto do leite a uma temperatura de 63 a 65 °C por um período de 30 minutos, com agitação mecânica, sendo um método mais antigo e é empregado geralmente em laticínios de pequeno porte, onde o volume de leite a ser tratado é menor. O segundo processo é a pasteurização rápida, também conhecida como HTST, como ilustrado na Figura 3. Este é um processo contínuo que envolve o aquecimento do leite entre 72 e 75 °C por 15 a 20 segundos. A maioria dos processos de pasteurização utilizados atualmente é do tipo HTST, realizados em trocadores de calor a placas. Esses equipamentos são eficientes, em parte devido à seção de regeneração. Esta seção permite que o leite cru entre no processo já aquecido, graças à troca de calor com o leite pasteurizado (Brasil, 2017; Sun, 2012).

Figura 3 - Fluxograma básico do tratamento térmico da pasteurização rápida.



Fonte: adaptado de Vidal; Netto (2018)

### 3.3.2 Esterilização UAT

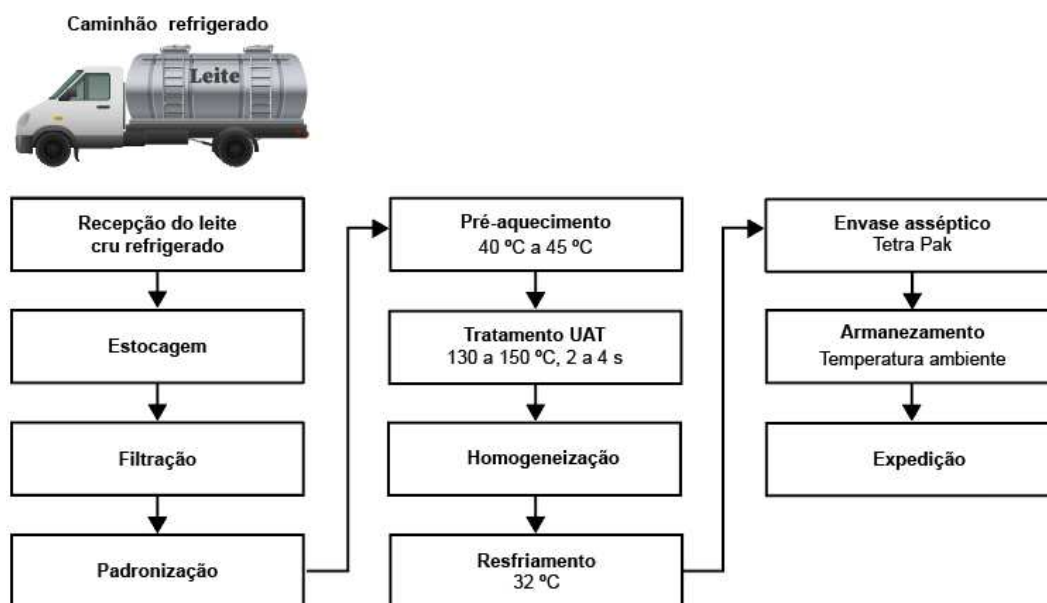
Nesse processo, o leite homogeneizado é submetido a uma temperatura entre 130 e 150 °C por 2 a 4 segundos. Após o aquecimento, o leite é prontamente resfriado e embalado em condições assépticas. As embalagens empregadas são esterilizadas e hermeticamente seladas para assegurar a integridade e a segurança do produto (Brasil, 2017).

Este tratamento é eficaz na eliminação de microrganismos patogênicos e esporos, conferindo ao leite uma estabilidade que impede o crescimento de microrganismos. Isso possibilita o armazenamento do leite à temperatura ambiente por um período prolongado, sem comprometer a sua segurança e qualidade (Sun, 2012).

O processo UAT pode ser categorizado como direto ou indireto. No caso do processo direto, o meio de aquecimento entra em contato direto com o leite, resultando em um aquecimento quase instantâneo através da adição de vapor. Por outro lado, no processo indireto, uma barreira física separa o leite do meio de aquecimento. Neste caso, o aquecimento ocorre por meio de trocadores de calor, garantindo que o leite não entre em contato direto com o meio de aquecimento (Walstra *et al.*, 1999).

Na Figura 4 é mostrado o fluxograma de produção de leite pelo processo de UAT.

Figura 4 - Fluxograma do tratamento térmico de esterilização Ultra Alta Temperatura.



Fonte: adaptado de Vidal; Netto (2018)

Apesar da pasteurização ser um procedimento térmico de natureza relativamente branda, ela pode induzir alterações sutis tanto nas características sensoriais quanto nutricionais do leite. A consistência, a tonalidade e o paladar do leite pasteurizado assemelham-se em grande parte aos do leite in natura, apresentando uma coloração mais intensamente branca em decorrência do processo de homogeneização. Contudo, é importante notar que ocorre uma diminuição de menos de 5% das proteínas presentes (Fellows, 2000; Sun, 2012), 25% da vitamina C, 10% das vitaminas B1, B6, B9 e B12, e 2% da lisina. Por outro lado, o processo UAT, embora seja mais eficaz contra os microrganismos, pode reduzir mais significativamente o valor nutricional e as propriedades sensoriais do leite. As perdas são de aproximadamente 30% de vitaminas C, 20% de B1, B6, B9 e B12, e 6% de lisina (Fellows, 2018; Damodaran; Parkin, 2019) e isso se deve à aplicação de temperaturas mais altas que podem causar a desnaturação parcial das proteínas do soro e mudanças sutis nas micelas de caseína, afetando a coagulação do leite e a estabilidade ao calor. Além disso, o sabor do leite pode ser alterado, adquirindo um sabor de cozido devido à produção de compostos voláteis (Lewis; Hepell, 2000; Sun, 2012; Fellows, 2018).

Diferenças entre os processos térmico de pasteurização e esterilização podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela comparativa entre o leite pasteurizado pelo processo de pasteurização rápida e o leite submetido à Ultra Alta Temperatura.

Parâmetros	Tratamento Térmico	
	Pasteurização	Esterilização UAT
Tempo (s)	15 a 20	2 a 4
Temperatura (°C)	72 a 75	130 a 150
Armazenamento	Refrigerado	Temperatura ambiente
Validade	Dias	Meses
Aditivos	Nenhum	Estabilizantes
Microrganismos eliminados	- Bactérias patogênicas: <i>Brucella abortis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Coxiella burnetti</i> - Microrganismos deteriorantes	- Bactérias patogênicas - Células bacterianas, vegetativas e esporos ( <i>Clostridium botulinum</i> ) - Microrganismos deteriorantes
Principais perdas nutritivas (%)		
Vitamina C	≅ 25	≅ 30
Vitaminas do complexo B	≅ 10	≅ 20
Lisina	2	6
Enzimas presentes		
Fosfatase alcalina	Negativa	Negativa
Peroxidase	Positiva	Negativa

Fonte: Adaptado de Damodaran; Parkin, 2019; Fellows, 2018

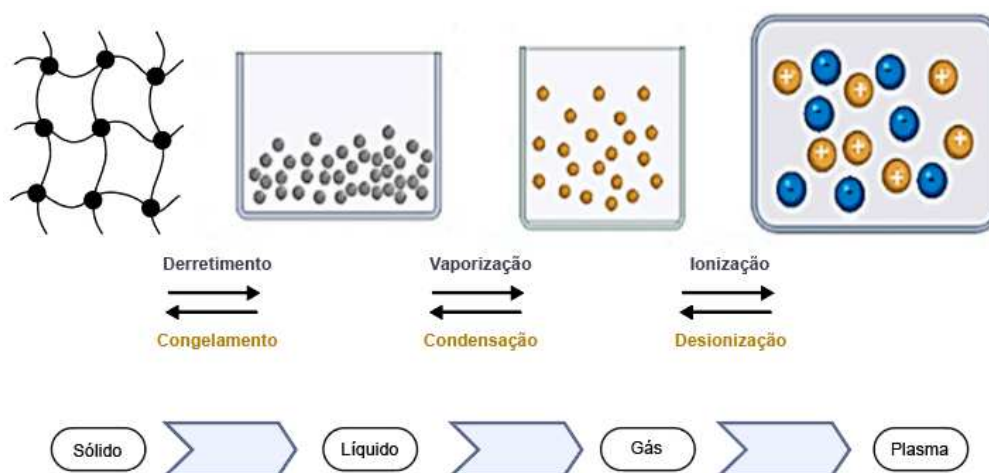
Essas alterações, embora pequenas, destacam a necessidade de explorar alternativas aos tratamentos térmicos na indústria de laticínios. Tecnologias não térmicas, como o plasma frio, podem oferecer uma solução promissora para preservar a qualidade nutricional e sensorial do leite, ao mesmo tempo que garantem sua segurança (Coutinho *et al.*, 2016). No entanto, é necessário investigar sua viabilidade econômica e a adaptação das linhas de produção, porque a implementação dessas tecnologias pode exigir investimentos significativos e ajustes nos processos industriais existentes (Deeth; Datta, 2011; Coutinho *et al.*, 2018).

### 3.4 PLASMA

O plasma, reconhecido como o quarto estado da matéria, é composto por espécies de gás parcialmente ou completamente ionizadas, em estados excitados ou fundamentais, com uma carga líquida neutra. Este estado peculiar da matéria se torna um excelente condutor elétrico devido à presença de cargas elétricas livres, como elétrons e íons, superando às vezes até metais como ouro e cobre (Annapure, 2018; Fridman, 2008; Khani *et al.*, 2017).

O plasma pode ser descrito como um gás ionizado contendo espécies reativas de oxigênio (ERO: O, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e OH), espécies reativas de nitrogênio (ERN: NO, NO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub>), radiação ultravioleta (UV), radicais livres e partículas carregadas (Bourke *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2016a, 2016b). Tipicamente, o plasma é gerado quando a energia elétrica é aplicada a um gás presente ou fluído entre dois eletrodos com uma alta diferença de potencial elétrico que causa a ionização do gás devido à colisão de elétrons livres com essas moléculas de gás (Laroque *et al.*, 2022; Mandal *et al.*, 2018), como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Estados da matéria - sólido, líquido, gás e plasma da matéria.



Fonte: adaptado de Harikrishna *et al.*, (2023)

A classificação do plasma é baseada em vários fatores, incluindo as condições sob as quais é gerado. Estas condições incluem a composição do gás que gera o plasma, que pode ser de um único componente ou de múltiplos componentes, a pressão atmosférica e a temperatura, que podem variar de baixa a alta (Dzimitrowicz *et al.*, 2015; Bourke *et al.*, 2017).



A distinção do plasma com base na temperatura se concentra na temperatura dos elétrons, conhecida como  $T_e$ . O plasma de alta temperatura se destaca com uma  $T_e$  que varia de  $10^6$  a  $10^8$  K. Em contraste, o plasma de baixa temperatura apresenta uma  $T_e$  na ordem de  $10^4$  a  $10^5$  K (Fridman *et al.*, 2005). Adicionalmente, o plasma de baixa temperatura é subdividido em plasma térmico (quente) e não térmico (frio), uma distinção que é determinada pelo estado de equilíbrio termodinâmico entre os elétrons e íons que constituem o plasma, onde a temperatura do elétron e o grau de ionização estão profundamente interligados (Liao *et al.*, 2017; Misra; Jo, 2017).

O plasma térmico, que é uma mistura de íons, elétrons e moléculas de gás, opera sob um estado conhecido como equilíbrio termodinâmico local a temperaturas de cerca de  $2 \times 10^4$  K e sob altas pressões. Neste estado específico, a temperatura dos elétrons e das partículas mais pesadas, os íons, são iguais. Este equilíbrio é alcançado através de colisões entre elétrons e partículas pesadas, que permitem o equilíbrio de suas temperaturas através do efeito Joule. Em cada localização espacial dentro do sistema, o plasma em condições de equilíbrio termodinâmico local apresenta uma temperatura uniforme, aderindo assim às principais leis do equilíbrio termodinâmico (Fridman, 2008; Mishra *et al.*, 2016; Tendero *et al.*, 2006).

O plasma não térmico, ao contrário do plasma térmico, não se encontra em um estado de equilíbrio termodinâmico local. Neste estado, a temperatura global do sistema e dos íons é consideravelmente inferior à temperatura dos elétrons (Fridman, 2008; Lieberman; Lichtenberg, 2005; Misra; Jo, 2017; Tendero *et al.*, 2006). Esta condição de desequilíbrio surge quando o sistema não consegue alcançar um estado de equilíbrio, seja devido à falta de tempo ou à insuficiência de energia (Fridman, 2008).

O plasma não térmico é subdividido em categorias: o plasma quase-equilíbrio, que opera a temperaturas entre 100 e 150 °C, e o plasma não-equilíbrio, que funciona a temperaturas inferiores a 60 °C. No plasma quase-equilíbrio, um equilíbrio termodinâmico local é observado entre espécies como elétrons e moléculas de gás. Por outro lado, no plasma não-equilíbrio, os elétrons possuem temperaturas mais elevadas enquanto as moléculas de gás mantêm temperaturas moderadas, sem a presença de um equilíbrio termodinâmico local. Isso resulta em uma temperatura mais baixa para o sistema como um todo. Este tipo de plasma não-equilíbrio é conhecido por diversos nomes em diferentes grupos de pesquisa, incluindo plasma não-térmico, plasma atmosférico frio ou simplesmente plasma frio (Mishra *et al.*, 2016).

### 3.5 PLASMA FRIO

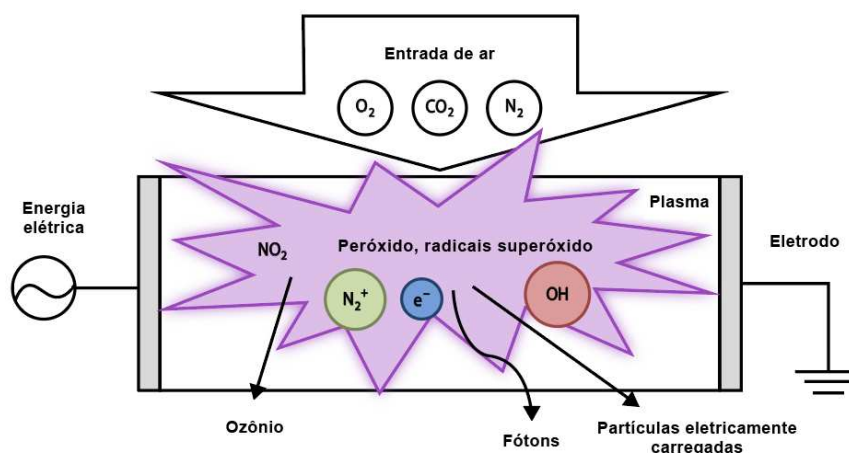
O plasma frio, uma inovação tecnológica com grande potencial na indústria de alimentos, é gerado utilizando a temperatura atmosférica (Thirumdas *et al.*, 2017). Uma variedade de gases, incluindo H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, He, N<sub>2</sub>, Ar, Ne, CF<sub>4</sub>, CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, pode ser convertida em plasma ao ser submetida a campos elétricos, como corrente alternada (de alta frequência), corrente contínua, térmica, micro-ondas, frequência de rádio e campo magnético. Este processo produz partículas de plasma, como íons, radicais livres e elétrons, que colidem com energias cinéticas maiores (Thirumdas *et al.*, 2014).

A singularidade do plasma frio reside na sua capacidade de proporcionar uma ação antimicrobiana eficiente sem a necessidade de recorrer a temperaturas elevadas, o que confirma sua adequação para uso em aplicações de processamento de alimentos, onde altas temperaturas são indesejáveis (Mishra *et al.*, 2016; Stoica *et al.*, 2014). Esta característica tem levado a um crescente interesse na exploração do plasma como uma solução ecológica para a descontaminação microbiana de uma variedade de alimentos, abrangendo desde vegetais e frutas até laticínios e produtos cárneos (Baier *et al.*, 2015; Surowsky *et al.*, 2015). Além disso, os tratamentos com plasma frio têm benefícios ecológicos, como a redução do uso de água, a ausência de resíduos químicos e a utilização do ar ambiental como gás de trabalho (Mishra *et al.*, 2016).

#### 3.5.1 Geração de plasma frio

A tecnologia de plasma frio faz uso de energia elétrica, que é introduzida por meio de eletrodos em gases condutores, tais como ar, oxigênio, nitrogênio ou hélio. Um sistema para a produção de plasma deve ser composto por um gás condutor, uma fonte de energia apropriada e eletrodos específicos (Mishra *et al.*, 2016). A produção padrão de plasma é representada na Figura 6.

Figura 6 - Processo de geração de plasma.



Fonte: adaptado de Mandal *et al.* (2018)

A aplicação de corrente elétrica entre eletrodos (cátodo e ânodo) separados por 1 cm no ar, a uma tensão de cerca de 30 kV/cm (limite de ruptura do ar), provoca a ruptura elétrica e a ignição do ar atmosférico, resultando na ocorrência de plasma (Mandal *et al.*, 2018; Misra *et al.*, 2016). Normalmente, começa como uma descarga de curta duração visível como uma faísca e, conseqüentemente, se transforma em um arco quente de alta corrente em potências mais altas (Stoica *et al.*, 2014). O ar é mantido à pressão atmosférica ou a vácuo. Este processo requer menos entrada de energia a baixa pressão e maior potência à pressão atmosférica. Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos de desenvolvimento de sistemas tem se concentrado na obtenção de plasma à pressão atmosférica devido ao baixo custo e facilidade de operação (Mandal *et al.*, 2018; Misra *et al.*, 2014).

De uma perspectiva termodinâmica, à medida que as moléculas acumulam energia, a fase da matéria transita de sólida para líquida e, posteriormente, para gasosa. Quando a energia ultrapassa um determinado limiar no estado gasoso, ocorre a ionização das moléculas de gás, culminando no singular estado de plasma (Mishra *et al.*, 2016). Esta energia pode ser de natureza mecânica, térmica, elétrica ou eletromagnética, nuclear, raios-X, frequência de rádio, entre outras (Afshari; Hosseini, 2014; Stoica *et al.*, 2014), levando ao desenvolvimento de diversos tipos de sistemas (Mandal *et al.*, 2018). Tais energias dissociam as moléculas de gás em uma centelha composta por íons, elétrons, radicais livres, moléculas de gás carregadas/neutras e outras espécies que possuem atividade biológica e potencial para eliminar microorganismos. Parâmetros operacionais e de design distintos resultam em diferentes tipos de espécies reativas, associando-se, portanto, a diferentes níveis de descontaminação (Aboubakr *et al.*, 2015).

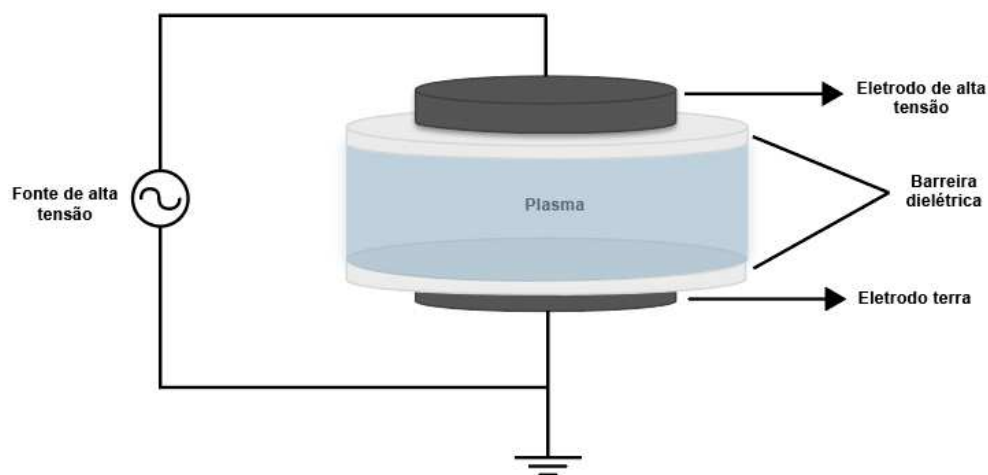
Várias fontes de geração de plasma incluem descarga de corona, descarga de radiofrequência, jato de plasma de pressão atmosférica, descarga de arco deslizante, DBD, entre outras, têm sido usadas para aplicações de processamento de alimentos. A geração de plasmas usando gases nobres é mais benéfica, pois evita a degradação oxidativa dos alimentos na exposição ao oxigênio. No entanto, isso pode aumentar o custo do tratamento (Misra *et al.* 2014).

### 3.5.1.1 Descarga de Barreira Dielétrica

A produção de plasma com a DBD está ganhando destaque devido ao seu custo-benefício em escala industrial. Esta tecnologia se destaca como um dos métodos mais eficazes de geração de plasma, oferecendo uma ampla gama de aplicações graças à sua configuração versátil e à flexibilidade quanto à forma do eletrodo e ao material dielétrico empregado (Misra *et al.*, 2019; Ziuzina *et al.*, 2013).

A DBD opera entre dois eletrodos, separados por camadas dielétricas que impedem o fluxo de corrente, inibindo assim a geração de faíscas, como mostrado na figura 7.

Figura 7 - Esquema ilustrativo do tratamento com plasma DBD.



Fonte: adaptado de Harikrishna *et al.* (2023)

A DBD geralmente opera em frequências entre 0,05 e 500 kHz e em uma ampla gama de pressões de gás que varia de  $10^4$  a  $10^6$  Pascal (Zhang *et al.*, 2017). O espaço entre os dois eletrodos varia de 0,1 mm a vários centímetros (Coutinho *et al.*, 2018). Trata-se de um sistema dinâmico que pode operar com uma ampla variedade de gases (gases nobres, ar ou vapor de água, misturas especiais de precursores e quase todas as combinações de gases), com

baixo fluxo de gás ou a ausência de necessidade de fluxo de gás. Produz uma descarga homogênea em uma grande área e pode ser utilizado para diferentes geometrias possíveis de eletrodos, todas as quais levam a uma boa adaptabilidade (Phan *et al.*, 2017). Uma desvantagem é a alta tensão de ignição de pelo menos 10 kV, dependendo do espaço restrito do eletrodo, o que torna essenciais as precauções ou isolamentos (Ehlbeck *et al.*, 2010; Phan *et al.*, 2017).

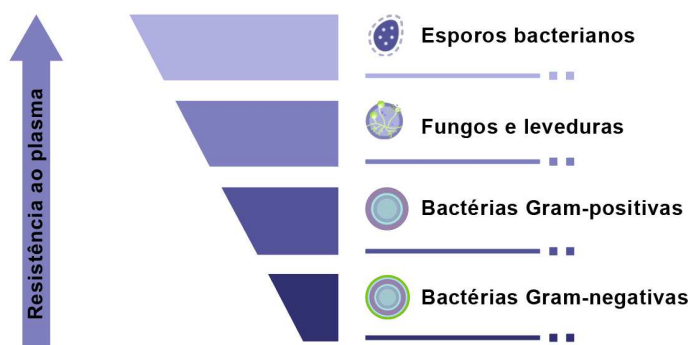
Diversos parâmetros impactam a eficiência da DBD, incluindo a tensão operacional, o gás utilizado e o espaçamento entre os eletrodos. Para grandes superfícies, a DBD é a melhor fonte de plasma (Ehlbeck *et al.*, 2010).

### **3.5.2 Mecanismo e parâmetros para a inativação microbiana**

O plasma frio inativa eficientemente microrganismos, incluindo fungos, leveduras, bactérias e esporos bacterianos (Segat *et al.*, 2016), em que a susceptibilidade ao processo de esterilização pode variar entre os microrganismos, até mesmo dentro de espécies e cepas (Figura 8) (Niedúwiedú *et al.*, 2019).

A eficácia antimicrobiana do plasma frio é influenciada por uma série de parâmetros. Entre eles, destacam-se: (i) fatores ambientais, que incluem a temperatura e a umidade relativa (Coutinho *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2017); (ii) propriedades dos alimentos, que abrangem o conteúdo de umidade, pH, composição do produto, propriedades da superfície e relação área/volume da superfície; (iii) parâmetros de processamento, que envolvem a tensão, frequência, composição do gás, taxa de fluxo, tipo de eletrodo, espaço entre eletrodos, espaço livre e padrão de tempo de exposição; (iv) tempo de exposição da amostra ao plasma (Feizollahi *et al.*, 2020; Liao *et al.*, 2017); (v) tamanho do reator de plasma (Laroque *et al.*, 2022); (vi) características dos microrganismos, que incluem o tipo, cepa, fase de crescimento e contagem inicial (Amini; Ghoranneviss, 2016; Feizollahi *et al.*, 2020) e (vii) uso de tratamento direto ou indireto (Misra *et al.*, 2016).

Figura 8 - Pirâmide da sensibilidade dos microrganismos ao plasma.



Fonte: adaptado de Liao *et al.* (2017) e Niedűwiedű *et al.* (2019).

Embora vários mecanismos para a inativação bacteriana por plasma frio tenham sido sugeridos, devido à complexidade da química do plasma e dos sistemas microbianos, a total elucidação e concordância desses mecanismos ainda não foram alcançadas (Liao *et al.*, 2017). Cinco mecanismos básicos são desencadeados pelo plasma e podem contribuir para a morte celular, incluindo a corrosão das superfícies celulares induzida por espécies reativas formadas durante a geração de plasma, a volatilização de compostos e a fotodegradação intrínseca de fótons ultravioleta (UV) (Laroussi, 2005; Moisan *et al.*, 2002), partículas carregadas, calor e campo elétrico (Deng *et al.*, 2006).

As espécies reativas, formadas pela quebra do ar como ozônio ( $O_3$ ), oxigênio atômico ( $O$ ), superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), peróxidos (como de hidrogênio -  $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ), desempenham um papel principal na desativação microbiana (Deng *et al.*, 2006). Essas espécies reativas interagem de forma prejudicial com biomoléculas celulares essenciais, como DNA, proteínas e enzimas. Esta interação pode potencialmente alterar a função das membranas biológicas. Isso ocorre através da interação com lipídios, que resulta na formação de peróxidos de ácidos graxos insaturados e na oxidação dos aminoácidos das proteínas (Misra *et al.*, 2016). Enquanto o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $\bullet NO_2$ ), têm um papel na inativação de microrganismos ao danificar os constituintes químicos como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Afshari; Hosseini, 2014; Mai-Prochnow *et al.*, 2014; Stoica *et al.*, 2014).

A fotodegradação intrínseca, induzida pela irradiação UV, conduz à quebra de ligações químicas em microrganismos, resultando na formação de subprodutos voláteis como monóxido de carbono (CO) e compostos de carbono e hidrogênio ( $CH_x$ ), a partir dos átomos intrínsecos dos microrganismos (Schlüter; Fröhling, 2014). A contribuição aparente da UV proveniente de fontes de plasma é influenciada por diversos fatores, incluindo a configuração

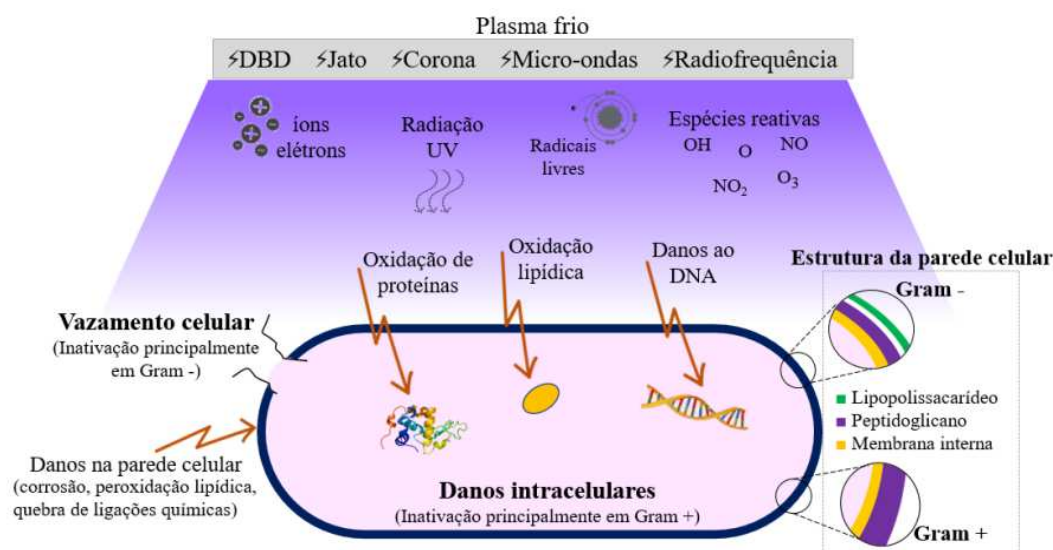
da fonte de plasma, a pressão operacional e a escala da descarga de plasma, entre outros (Misra; Jo, 2017).

As partículas carregadas têm um papel crucial na ruptura da membrana celular bacteriana, com efeitos variando dependendo do contato direto ou indireto com as amostras (Dobrynin *et al.*, 2009). O design de tratamento indireto emprega distância ou malha metálica para evitar o contato direto das partículas carregadas com as amostras. Neste tratamento, as partículas carregadas não participam em grande parte do tratamento, mas se recombina antes de atingir a amostra (Laroussi, 2009). No entanto, no contato direto, as partículas carregadas podem se acumular na superfície e causar estresse eletrostático, levando a mudanças na morfologia ao superar a resistência à tração da membrana celular (Mendis *et al.*, 2000; Laroussi *et al.*, 2003). A perfuração da membrana celular pode aumentar a difusão de espécies reativas secundárias formadas na descarga de plasma dentro da célula. A desestabilização, resultante da reação entre os átomos/moléculas excitadas e radicais e materiais orgânicos, causa a quebra de ligações, particularmente para compostos de hidrocarbonetos. Isso leva à formação de fragmentos moleculares e compostos voláteis emanando das células, causando mudanças morfológicas, variando desde a redução do tamanho da célula até a destruição celular completa (Ermolaeva *et al.*, 2011). O mesmo ocorre quando exposta a campos elétricos intensos, a membrana celular bacteriana pode sofrer ruptura devido à ação eletrostática (Misra *et al.*, 2017)

Esses mecanismos podem atuar de forma independente ou sinérgica para causar a inativação bacteriana. No entanto, a eficácia de cada mecanismo pode variar dependendo de vários fatores, incluindo o tipo de plasma, a duração do tratamento e o tipo de bactéria (Bourke *et al.*, 2017)

Pesquisas anteriores (Lu *et al.*, 2014; Laroussi, *et al.*, 2003) elucidaram diferenças notáveis nos mecanismos de lesão celular entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, conforme retratado na Figura 9. No contexto das células Gram-negativas, o envelope celular é o principal alvo das ERO e da radiação UV, culminando em oxidação e danos irreparáveis à parede celular. Este processo resulta na liberação de compostos intracelulares, tais como proteínas, DNA e lipídios, em decorrência da ruptura celular. Em contraste, as células Gram-positivas sofrem danos intracelulares graves, mas sem ruptura e vazamentos (Han *et al.*, 2016a).

Figura 9 - Mecanismo de inativação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas usando plasma frio.



Fonte: adaptado de Laroque *et al.* (2022)

Embora o plasma frio prove ser bem sucedido na descontaminação microbiana de alimentos, estes são matrizes complexas devido aos seus diferentes compostos (amidos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, água e muitos outros microcomponentes). Portanto, uma atenção cuidadosa ao tipo de alimento, formulação e parâmetros do processo pode minimizar os impactos físico-químicos e sensoriais negativos para o produto (Laroque *et al.*, 2022).

### 3.5.3 Aplicação na indústria de laticínios

As doenças infecciosas causadas pela ingestão de bactérias patogênicas em leite contaminado continuam sendo uma grande preocupação para a saúde, especialmente para as crianças. As doenças infecciosas mais predominantes causadas pelo leite contaminado incluem campilobacteriose, salmonelose, yersiniose, listeriose, tuberculose, brucelose, intoxicação por enterotoxina estafilocócica, infecções estreptocócicas e *Escherichia coli* 0157: H7 (Gurol *et al.*, 2012; Ranadheera *et al.*, 2017).

Embora a tecnologia de plasma tenha sido amplamente estudada para descontaminação, a pesquisa sobre seus efeitos em alimentos, especialmente produtos lácteos, ainda é limitada (Coutinho *et al.*, 2018; Rathod *et al.*, 2021). O plasma frio, uma tecnologia complexa com uma variedade de dispositivos, não foi originalmente desenvolvida para



aplicações biológicas (Moreau *et al.*, 2008). No entanto, estudos confirmam seu potencial para inativar microorganismos prejudiciais em leite e produtos lácteos. Isso é atribuído principalmente às interações entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que causam efeitos oxidativos fortes nas células microbianas (Phan *et al.*, 2017).

A natureza não térmica do plasma frio torna menos provável que ele afete a cor, o pH, o valor nutricional e o sabor do leite e dos produtos lácteos, além de inativar microorganismos e enzimas fosfatase em poucos segundos. Alguns estudos relataram que o tratamento com plasma frio faz com que o leite se torne mais ácido, o que pode ser resultado de várias interações entre a água e substâncias voláteis produzidas pelo plasma, como O, NO<sub>x</sub> e O<sub>3</sub>, no contato gás-água (Harikrishna *et al.*, 2023).

A tabela 3 destaca estudos que aplicaram plasma frio para inativar microorganismos em produtos lácteos, como queijo e leite UAT.

Tabela 3 - Estudos realizados aplicando o plasma frio no tratamento de laticínios.

Aplicação do Plasma	Características	Resultados	Referências
<b>Queijo</b>			
Tratamento, a plasma frio atmosférico de alta voltagem, de <i>L. innocua</i> e <i>E. coli</i> K-12 em queijo fresco.	Exposição direta da amostra em ar seco e misturas de gases MA 65 (65% de O <sub>2</sub> , 30% de CO <sub>2</sub> , 5% de N <sub>2</sub> ) por até 5 minutos a 60 kV, 80 kV e 100 kV.	Após 5 minutos a 100 kV, teve redução de 1,4 log 10 na contagem de <i>L. innocua</i> e 3,5 log 10 na contagem de <i>E. coli</i> K-12 após 24 horas a 4 °C. O aumento de 60 para 100 kV resultou em maior produção de substâncias antimicrobianas reativas, levando a uma redução mais acentuada das bactérias, com impacto mínimo na qualidade do produto. Poucas alterações no pH, umidade, cor e oxidação lipídica, e o perfil de textura do queijo permaneceu inalterado após o tratamento com plasma frio atmosférico de alta voltagem.	Wan <i>et al.</i> (2021)
<b>Leite</b>			
Inativação de <i>E. coli</i> (ATCC 25922) do leite semidesnatado e desnatado.	Descarga corona com uma fonte de alimentação de 9 kV. O plasma frio, a 9 kV, foi aplicado por 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos a uma baixa temperatura de 35 °C.	A redução na viabilidade das células de <i>E. coli</i> (log UFC/mL) no leite desnatado, no leite semi-desnatado e no leite integral foi de 57%, 56% e 54%, respectivamente, após 3 minutos de exposição ao plasma, sem mudanças significativas no teor de gordura, no pH e na cor do leite. Nenhuma célula viável foi detectada após uma semana de exame em amostras de leite integral e assim permaneceu durante o período de armazenamento de 6 semanas.	Gurol <i>et al.</i> (2012)
Esterilização de leite de vaca com plasma líquido	Plasma frio usando gás argônio gerado a 9 kV. As amostras foram expostas por 2 minutos a frequências de 2,5 e 4 kHz.	<i>E. coli</i> foi completamente destruída pelo plasma frio em leite cru e leite pasteurizado após 2 min de exposição a 4kHz.	Ponraj <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Autora (2024)

Tabela 3 - Estudos realizados aplicando o plasma frio no tratamento de laticínios.

Aplicação do Plasma	Características	Resultados	Referências
<b>Leite</b>			
Atributos microbianos de segurança e qualidade do leite após tratamento com plasma de DBD encapsulado por pressão atmosférica.	Plasma DBD encapsulado operado a 15 kHz no ar ambiente por 5 e 10 minutos.	O tratamento com DBD reduziu a quantidade de <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> nas amostras em 2,46, 2,40 e 2,43 log UFC/mL, respectivamente, após exposição de 10 minutos.	Kim <i>et al.</i> (2015)
Influência do plasma frio de DBD na propriedade físico-química do leite para esterilização.	Descarga DBD com uma frequência de 15 kHz. Categorias de variação de voltagem (0, 40, 50, 60, 70 e 80 V por 120 segundos) e diferença nos grupos de tempo ambos receberam tratamento de plasma frio de 70 V por 0, 15, 30, 60, 90 e 120 segundos.	Os tratamentos com plasma a 70 e 80 V por 120 segundos e a 70 V por 90 e 120 segundos foram equivalentes à pasteurização e à Ultra Alta Temperatura com base no número de colônias. Destruição do DNA bacteriano, atividade reduzida de enzimas metabólicas e membrana celular de bactérias quebradas.	Wu <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Autora (2024)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos utilizando leite cru proveniente de um laticínio, situado em Biguaçu/SC. O leite foi processado/armazenado/manipulado sob rigoroso controle sanitário, conforme as normas do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA). Durante a coleta, foram utilizados recipientes estéreis. Adicionalmente, empregou-se leite integral esterilizado UAT, da marca Aurora, adquirido localmente, para a inoculação de *L. innocua* e avaliação da eficácia do plasma. As análises foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina, no departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA), no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI), no Laboratório de Engenharia Biológica (LiEB) e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos 2 do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

### 4.1 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de leite esterilizado, ao serem recebidas, foram armazenadas em temperatura ambiente até a sua utilização. As amostras de leite cru, ao recebidas, foram imediatamente armazenadas a  $4 \pm 1$  °C, em conformidade com as regulamentações sanitárias e de segurança alimentar. Antes de serem submetidas ao plasma, as amostras passaram pelo processo de mistura manual para garantir a uniformidade das amostras e minimizar possíveis variações.

### 4.2 MONTAGEM DO EQUIPAMENTO COM REATOR DBD

Os experimentos foram conduzidos utilizando um equipamento de DBD, projetado especificamente para gerar PFA. Operando a uma frequência de 60 Hz, uma tensão de 17 kV, corrente elétrica de 30 mA e o eletrodo de alta tensão a uma distância de 1 cm da amostra, o equipamento foi ajustado para garantir condições ideais de funcionamento durante todo o experimento. Além disso, um agitador magnético foi empregado para promover uma dispersão mais homogênea do plasma, garantindo resultados mais consistentes e representativos nos experimentos.

### 4.3 TRATAMENTO COM PLASMA FRIO

Para avaliar a eficácia do PFA na inativação de *Listeria innocua* e sua influência na microbiota do leite, foram realizadas análises em diferentes intervalos de tempo utilizando 150 mL de leite como amostra. Os tratamentos foram realizados em triplicata e os tempos selecionados para avaliação foram os seguintes: 1 minuto, 2 minutos e 30 segundos e 5 minutos, sob agitação de 600 rpm. Esses tempos foram escolhidos com base em estudos prévios e na literatura científica (Gurol *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2021; Wan *et al.*, 2021).

### 4.4 ANÁLISES DE QUALIDADE DO LEITE CRU

Foram realizados testes de qualidade em amostras de leite cru antes e depois da exposição ao plasma frio. O objetivo foi avaliar os parâmetros pH, acidez titulável e redução do azul de metileno, conforme descrito por IAL (2008). Essa análise estabeleceu uma base para compreender as mudanças que ocorreram após o tratamento e verificar a conformidade com os padrões regulatórios de qualidade do leite cru refrigerado.

#### 4.4.1 Temperatura

Para garantir a precisão das medições e a confiabilidade dos resultados, foi utilizado um termômetro de imersão calibrado. Este dispositivo foi inserido diretamente no leite, permitindo-nos obter leituras da temperatura.

#### 4.4.2 pH

Para a determinação do pH das amostras de leite, empregou-se um pHmetro digital da marca Testo, previamente calibrado conforme as orientações do fabricante. Foram utilizados dois padrões de pH, cobrindo as faixas de pH 4 e 7. O eletrodo foi cuidadosamente inserido no béquer contendo a amostra de leite homogeneizada, assegurando sua completa imersão na amostra. Após aguardar alguns segundos para a estabilização do aparelho, registrou-se o valor do pH encontrado, com precisão de até duas casas decimais.

#### **4.4.3 Acidez titulável**

A metodologia para determinar a acidez do leite se baseia na titulação com uma solução de NaOH N/9, pelo método Dornic, utilizando a fenolftaleína como indicador. Em termos práticos, a medição envolve a quantificação do volume de hidróxido de sódio requerido para neutralizar o ácido láctico contido na amostra de leite.

Para a análise, inicialmente, uma quantidade de 10 mL da amostra de leite foi medida com uma pipeta volumétrica e transferida para um erlenmeyer de 50 mL. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína à amostra de leite no erlenmeyer. A titulação foi então realizada com a solução de NaOH N/9 (Dornic), utilizando uma bureta, até obter uma coloração rosa, que indica o fim da titulação e a neutralização da acidez presente na amostra. O volume de NaOH utilizado foi registrado para calcular a acidez do leite, expressa em graus Dornic (°D).

#### **4.4.4 Redutase**

O procedimento se iniciou com a introdução de 1 mL de azul de metileno em tubos de ensaio, seguido pela incorporação de 10 mL de leite e a subsequente vedação do tubo com uma rolha de borracha. Posteriormente, os tubos foram conduzidos a um banho-maria mantido a uma temperatura constante de 37°C. Durante o período de incubação, os tubos foram periodicamente invertidos para assegurar uma mistura homogênea do corante com o leite. A reação foi monitorada a partir do instante inicial do teste, registrando-se alterações a cada intervalo de 30 minutos, até que ¼ do tubo fique descolorado.

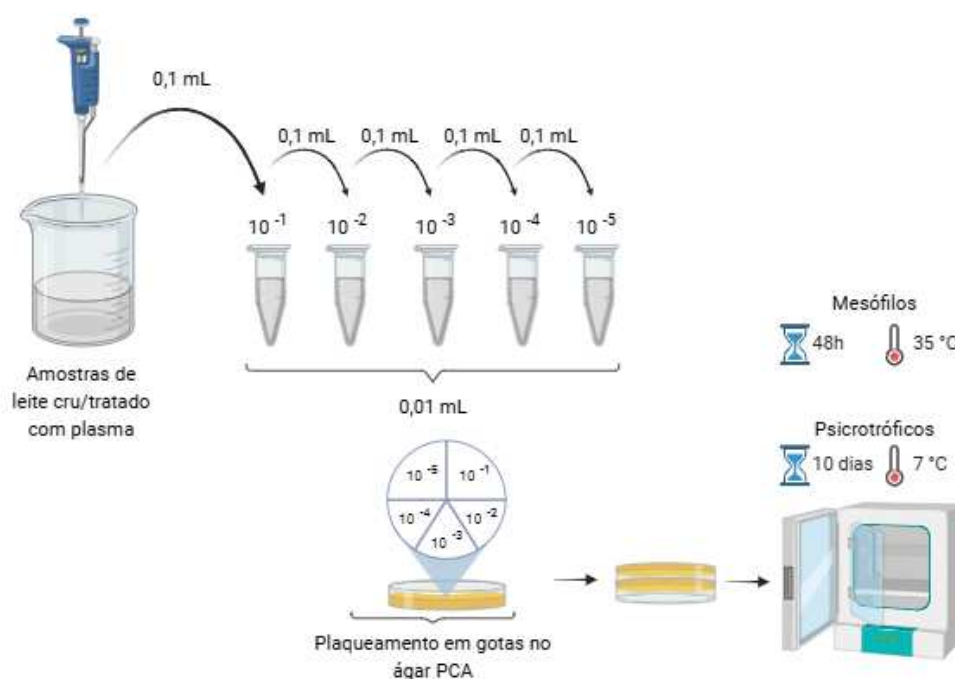
### **4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

#### **4.5.1 Determinação de mesófilos aeróbios e psicrotróficos**

Após a exposição ao plasma, as amostras de leite cru foram submetidas à contagem de mesófilos aeróbios e psicrotróficos. Neste processo, 0,1 mL de cada amostra de leite foi incorporado em microtubos de centrifugação, que continham 0,9 mL de água peptonada a 0,1%. Posteriormente, utilizando uma micropipeta, 0,01 mL de cada diluição foi depositado

pela técnica de em gotas na superfície de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, que já haviam sido preparadas com *Plate count agar* (PCA). Cada diluição foi plaqueada em duplicata. As placas foram então invertidas e incubadas a 35 °C por 48 horas, para análise de mesófilos e a 7 °C por 10 dias para psicotróficos (Figura 10). No final deste período, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) resultantes foram contadas e os resultados foram expressos em log UFC/mL, conforme recomendado por Silva *et al.* (2021). Para controle, amostras não tratadas (controle) foram utilizadas para a contagem inicial da carga microbiana.

Figura 10 - Procedimento para as diluições seriadas e para o plaqueamento.

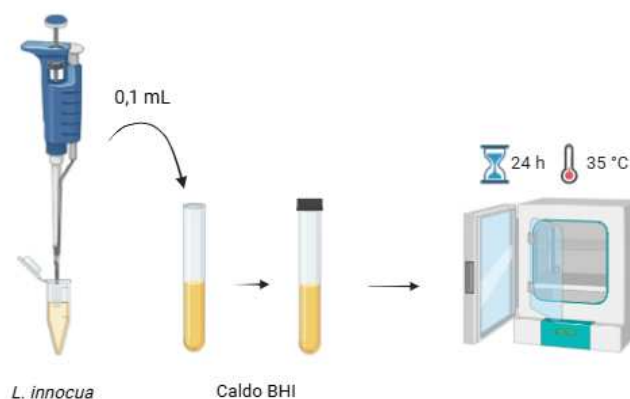


Fonte: Autora (2024)

#### 4.5.2 Avaliação de inativação de *Listeria innocua*

A aplicação de plasma frio em leite UAT foi testada utilizando a *L. innocua* (CCT 7473). As cepas foram mantidas congeladas na coleção do Laboratório de Engenharia Biológica até o início do trabalho. As bactérias descongeladas foram semeadas no ágar BHI e cultivadas a 35 °C por 24 horas, conforme Figura 11.

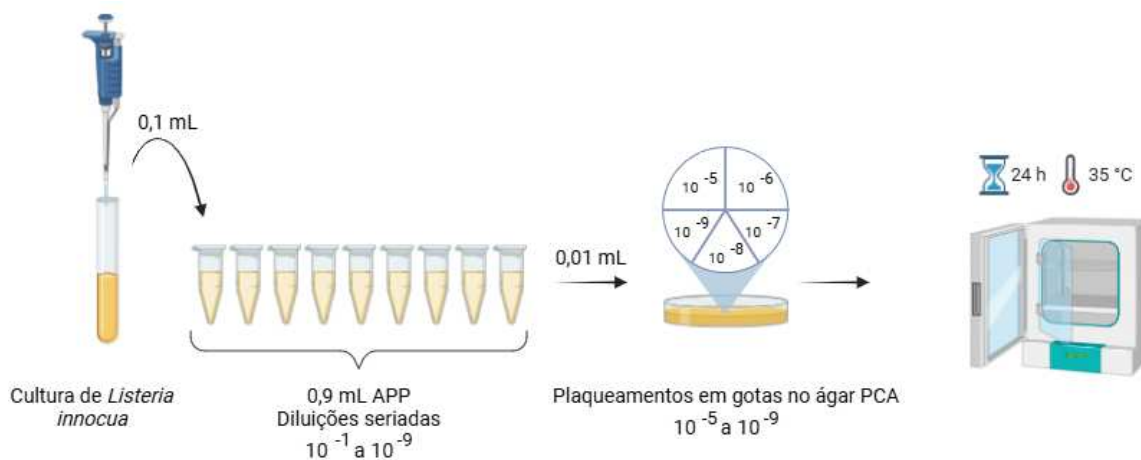
Figura 11 - Reativação de *Listeria innocua*



Fonte: Autora, 2024.

Após o período de incubação, realizou-se diluições seriadas e plaqueamento em gotas no ágar PCA com incubação a 35 °C por 24 h para determinar o número inicial de UFC/mL, conforme Figura 12.

Figura 12 - Procedimento para determinação da concentração inicial de bactérias.

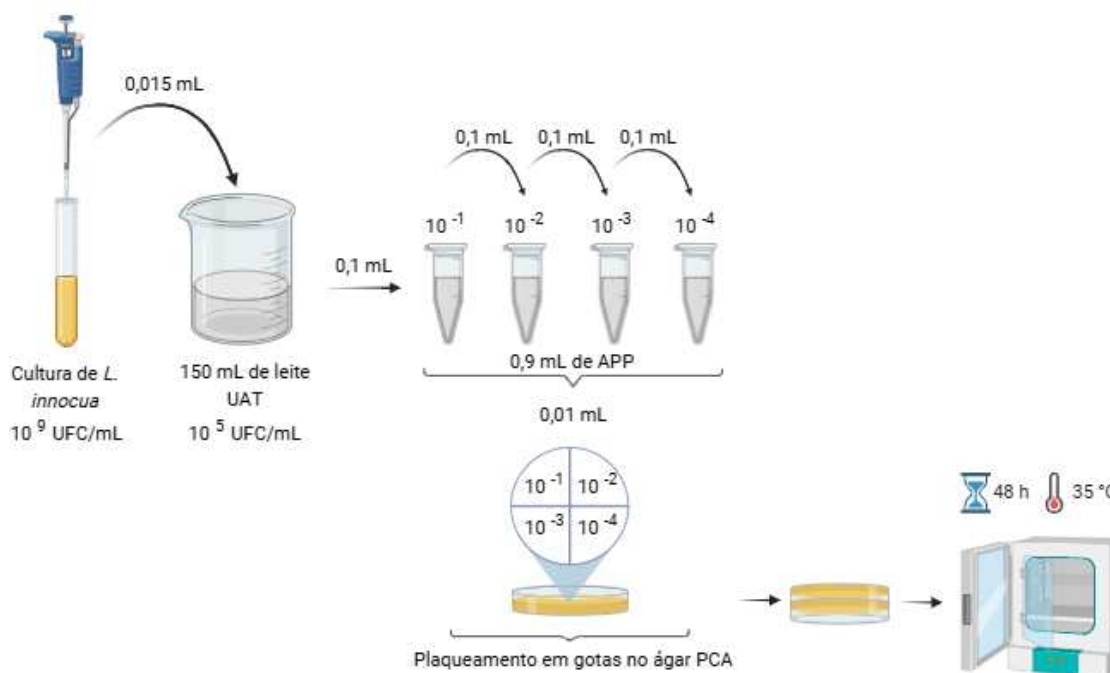


Fonte: Autora (2024)

Com base nessa contagem, calculou-se a quantidade adequada de inóculo a ser adicionada nas amostras de leite, visando alcançar uma população bacteriana de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL para as análises subsequentes (Figura 13). Esse procedimento garantiu que as observações e os resultados obtidos fossem exclusivamente atribuídos à presença de *Listeria innocua*.



Figura 13 - Procedimento para a inoculação de *Listeria innocua* no leite esterilizado.



Fonte: Autora (2024)

#### 4.5.3 Análise estatística microbiológica

Para avaliar a redução significativa de *L. innocua* e mesófilos aeróbios, foram realizados os seguintes testes estatísticos: O teste de Kolmogorov-Smirnov verificou a normalidade dos dados, enquanto o teste de Levene avaliou a homogeneidade das variâncias (Tarinc *et al.*, 2019). Com as premissas atendidas, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparar as medianas dos grupos. Para identificar quais grupos diferem significativamente, utilizou-se o teste de Dunn para comparações múltiplas (Dinno, 2015). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $p < 0,1$ .

Para avaliar a redução significativa de psicrotróficos, foram realizados os seguintes testes estatísticos: O teste de Shapiro-Wilk verificou a normalidade dos dados, enquanto o teste de Levene (Tarinc *et al.*, 2019) avaliou a homogeneidade das variâncias. Com as premissas atendidas, aplicou-se o teste de ANOVA para comparar as médias dos grupos. Para identificar quais grupos diferem significativamente, utilizou-se o teste de Tukey (Lee; Lee, 2018) para comparações múltiplas, considerando diferenças estatisticamente significativas quando  $p < 0,1$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 13.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE QUALIDADE DO LEITE CRU

Segundo a Instrução Normativa nº 76, expedida em 2018 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o leite cru armazenado sob refrigeração deve se adequar a determinados padrões físico-químicos, os quais são elencados na Tabela 4, definindo assim os padrões de qualidade requeridos. Além disso, para proporcionar uma análise mais clara das propriedades físico-químicas do leite antes e após o tratamento com plasma, a Tabela 4 também compila os achados de forma organizada.

Tabela 4 - Resultados da caracterização físico-química do leite cru antes e após a aplicação do plasma frio, assim como os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.

Parâmetros físico-químicos	Padrão definido pela legislação	Tempos de aplicação do plasma frio			
		0 min	1 min	2 min e 30 s	5 min
ph	6,4 a 6,8	6,80 ± 0,03	6,80 ± 0,01	6,78 ± 0,03	6,71 ± 0,03
Acidez titulável (°D), g ácido lático/100 mL	15 a 18	15 ± 0,58	16 ± 0,58	17 ± 0,58	18 ± 0,58
Redutase	2h a 4h	+5h	+5h	+5h	+5h

Fonte: Brasil (2018), Magalhães *et al.*, (2022), Autora (2024)

#### 5.1.1 Temperatura

A exposição do leite ao plasma frio resultou em variações significativas de temperatura, conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Variação da temperatura do leite após tratamento com plasma frio em diferentes intervalos de tempo.

Intervalos de exposição ao plasma			
0 min	1 min	2 min e 30 s	5 min
5,97 ± 0,81	14,53 ± 0,80	18,23 ± 0,40	22,60 ± 0,62

Fonte: Autora (2024)

Os resultados mostraram que, partindo de uma condição inicial de  $6 \pm 1$  °C, o leite submetido ao plasma frio exibiu um incremento médio de temperatura para  $14,53 \pm 0,80$  °C, após um minuto de exposição. Em um intervalo de dois minutos e meio, a temperatura média elevou-se para  $18,23 \pm 0,40$  °C, atingindo  $22,60 \pm 0,62$  °C após cinco minutos de tratamento. As variações de temperatura podem ser atribuídas aos parâmetros experimentais previamente descritos, como a tensão aplicada, a velocidade de agitação e o tempo de exposição ao plasma.

O aumento observado na temperatura das amostras de leite pode ser justificado pela energia dissipada no decorrer da descarga elétrica, resultando na geração de calor. Especificamente, a transição do leite refrigerado para 1 minuto revelou um aquecimento substancial, refletido pelo aumento de temperatura de 6 °C para 14 °C, aproximadamente. Este fenômeno sugere uma rápida transferência de energia térmica no início do processo. No intervalo subsequente, de 1 minuto até 2 minutos e 30 segundos, observou-se um acréscimo térmico até 18 °C, sugerindo uma taxa de aquecimento menos acentuada. Finalmente, a fase de 2 minutos e 30 segundos até os 5 minutos caracterizou-se por uma elevação gradual da temperatura até aproximadamente 23 °C, destacando a influência direta do tempo de exposição na quantidade de energia térmica transferida para a amostra de leite. Essas constatações evidenciam o mecanismo de acúmulo de energia intrínseco ao uso do plasma frio e são cruciais para entender os impactos desse tratamento em amostras lácteas, bem como suas possíveis utilidades. É importante notar que, em nenhum momento, as temperaturas alcançadas se aproximaram dos níveis necessários para a pasteurização, que se situam entre 72 e 75 °C.

Estudos anteriores corroboram esses achados, indicando que a aplicação do plasma frio em produtos lácteos não eleva a temperatura a níveis comparáveis aos processos térmicos tradicionais, como a pasteurização. Nos estudos Segat *et al.*, (2016), o plasma, obtido por descarga de barreira dielétrica, foi aplicado a três diferentes tensões, 40, 50 e 60 kV, com tempos de exposição variando entre 15 segundos e 5 minutos. Durante todo o processo, a temperatura mais alta registrada foi de 30 °C.

Apesar do aumento relativamente baixo na temperatura, é importante considerar que mesmo pequenas variações podem contribuir para condições mais favoráveis ao crescimento microbiano. Portanto, estudos adicionais são necessários para investigar como essas mudanças térmicas influenciam a microbiota do leite submetido ao tratamento com plasma frio.

### 5.1.2 pH

Os valores de pH para as amostras de leite cru e as tratadas com plasma frio variaram entre 6,69 e 6,80, permanecendo dentro das faixas recomendadas. A faixa de pH ideal para leite cru se situa entre 6,4 e 6,8, sendo essencial para a qualidade e segurança do leite (Brasil, 2018). A manutenção do pH dentro dessas faixas após o tratamento com plasma frio sugere que esse método não altera significativamente a acidez do leite, mantendo suas características sensoriais e nutricionais. Mesmo com a contagem de psicotróficos sendo alta, o pH se manteve dentro dos parâmetros recomendados pela legislação, uma vez que esses microrganismos não causam acidificação do leite (Marioto, 2020).

Os resultados obtidos indicaram que o pH médio das amostras de leite cru era de 6,8 no tempo inicial. Após um minuto de exposição ao plasma frio, o pH manteve-se em 6,8. Com dois minutos e trinta segundos de exposição, houve uma ligeira redução para 6,77, e após cinco minutos, observou-se uma diminuição adicional para 6,71. Embora tenha sido observada uma tendência de queda no pH com o aumento do tempo de exposição ao plasma, os valores permaneceram dentro dos limites recomendados pela legislação vigente. Este comportamento pode ser atribuído à interação do plasma com os componentes do leite, causando alterações químicas que influenciam o pH. A diminuição do pH com o aumento do tempo de exposição ao plasma frio atmosférico pode ser associada à formação de várias espécies moleculares e radicais resultantes da interação do plasma com a água. Espécies à base de nitrogênio e oxigênio no plasma, ao interagirem com a água, geram peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidrogênio molecular ( $H_2$ ), oxigênio molecular ( $O_2$ ), radicais hidroxila ( $OH\bullet$ ) e  $NO_x$ . Essas reações podem aumentar a concentração de íons hidrogênio ( $H^+$ ), que diminuem o pH do leite. Com maior tempo de exposição, mais dessas espécies são formadas, acentuando a redução do pH (Alves Junior, 2020). Outra possível explicação reside na oxidação dos componentes do leite, como proteínas e lipídios, causada pelos radicais livres gerados durante a exposição ao plasma frio. Esse processo de oxidação pode resultar na formação de produtos de degradação ácidos, que, por sua vez, contribuem para a diminuição do pH. Sarangapani *et al.* (2017) demonstraram que em produtos lácteos com alto teor de gordura, as moléculas de oxigênio geradas pelo plasma frio de barreira dielétrica reagem com os produtos, resultando em oxidação. A geração de plasma frio pode impactar as concentrações de diversos íons no leite, incluindo os íons de hidrogênio ( $H^+$ ), que desempenham um papel crucial na determinação do pH. Durante os estudos de Wu *et al.*

(2020), quando a voltagem aumentou para 80 V, o pH da amostra mostrou uma diminuição. Isso demonstrou que a intensidade do plasma DBD elevada a um valor alto pode excitar mais íons  $H^+$  da água presente no leite. Durante o tratamento com plasma DBD, as moléculas de água e o vapor de água do leite foram parcialmente ionizados, levando ao enriquecimento de íons de hidrogênio no leite, resultando em uma diminuição do valor do pH (Ji *et al.*, 2018).

Gurol e colaboradores (2012) avaliaram a aplicação de plasma em pressão atmosférica com 9 kV e fonte de alimentação AC e verificaram que os valores de pH das amostras de leite cru inoculadas com *E. coli* permaneceram aproximadamente  $6,7 \pm 0,05$  durante os intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 20 minutos de aplicação de descarga de plasma, indicando que não houve mudanças significativas no pH, sugerindo que a lise microbiana não é afetada pela acidez ou alcalinidade do leite. Outro estudo de Kim *et al.* (2015) objetivou avaliar as características físico-químicas do leite tratado com plasma de descarga de barreira dielétrica (DBD) encapsulado. O plasma foi aplicado às amostras de leite por períodos de 5 e 10 minutos, e após os 10 minutos, o pH do leite diminuiu de 6,90 a 6,60. Wu *et al.* (2020), investigaram as influências do plasma frio de DBD na estrutura e no desempenho físico-químico do leite. Comparando os valores de pH do controle (pH 6,74), as amostras de leite submetidas ao plasma (UAT e pasteurizado), apresentaram valores menores, variando conforme a voltagem e o tempo de tratamento. Ponraj *et al.* (2017) observaram uma ligeira diminuição no pH de leite submetido a 4 kHz por intervalos de 30, 60, 90 e 120 segundos. Essa pequena variação foi atribuída à presença dos sistemas fosfato e proteínas de caseína, que oferecem resistência às mudanças de pH, diferentemente da água. Portanto, a diminuição do pH é um fenômeno complexo e multifatorial, e sua compreensão requer análises químicas detalhadas para identificar as causas específicas e suas interações.

### 5.1.3 Acidez titulável

A acidez é um fator crucial na avaliação da qualidade do leite, afetando diretamente seu sabor, capacidade de conservação e propriedades físicas no produto final (Alfonso *et al.*, 2017). Após ser extraído do úbere, o leite apresenta uma leve acidez, atribuída a componentes como caseína, fosfatos, citratos e  $CO_2$ , além de uma reação interna durante a titulação com solução alcalina (Pacheco *et al.*, 2022). Conforme estabelecido pela IN 76/2018, essa acidez natural do leite cru geralmente varia entre 14 e 18 graus Dornic ( $^{\circ}D$ ).

O pH e a acidez titulável são conceitos interligados que abordam a acidez do leite, predominantemente influenciada pelo ácido láctico. Este permanece amplamente dissociado até que o pH desça abaixo de aproximadamente 5,5. Embora o pH seja um dos principais fatores que influenciam a integridade inicial das micelas de caseína no leite, a acidez titulável é um indicador mais preciso do impacto do ácido láctico no sabor (Tyl; Sadler, 2017; Sharma; Singh, 2022).

Para quantificar a acidez, utiliza-se a solução Dornic, onde cada 0,1 mL consumido na titulação corresponde a 1 grau Dornic (°D). Cada incremento de 1°D equivale a 0,01% de acidez, expressa como ácido láctico, conforme descrito por Alfonso *et al.* (2017).

Ao longo de todos os períodos investigados, a acidez titulável manteve-se sem muita variação em 18°D, permanecendo dentro da faixa regulatória de 14°D a 18°D. Isso indica uma estabilidade notável nas amostras de leite tratadas com plasma frio. No entanto, é importante destacar que a acidez titulável apresentou um leve aumento à medida que o tempo de exposição ao plasma foi prolongado. Esse aumento da acidez provavelmente se deve à formação de componentes ácidos, como ácido nítrico, ácido nitroso e peróxido de hidrogênio, a partir da reação das espécies reativas geradas pelo plasma com a água. Além disso, pode ocorrer a produção de grupos carboxílicos pela degradação de aminoácidos e oxidação de aldeídos por O<sub>3</sub> e OH<sup>-</sup> gerados pelo plasma (Coutinho *et al.*, 2019; Muhammad *et al.*, 2018; Muhammad *et al.*, 2019; Ozen; Singh, 2020). As ERO podem levar à quebra das proteínas e difusão de aminoácidos no meio, causando aumento da acidez (Bußler *et al.*, 2015).

Sharma e Singh (2022) avaliaram o efeito do plasma frio gerado usando Nitrogênio-Oxigênio e Nitrogênio como gases de alimentação nas propriedades do leite desnatado tratado por 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. O tratamento com plasma N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> aumentou significativamente a acidez titulável do leite, com valores médios finais de 0,22%. O tempo de tratamento demonstrou ter um efeito significativo neste caso. Por outro lado, o tratamento com plasma N<sub>2</sub> aumentou a acidez titulável de 0,14% para 0,20% de forma significativa.

#### **5.1.4 Redutase**

O teste de redutase é um método rápido e eficaz para indicar o nível aproximado de contaminação microbiana no leite. Esse método baseia-se no consumo de oxigênio pelas bactérias presentes no leite, resultando na redução do potencial de oxirredução e na consequente descoloração de uma solução de azul de metileno (Magalhães *et al.*, 2022). O

azul de metileno, quando oxidado (na presença de oxigênio), é azul, mas na sua forma reduzida (ausência de oxigênio), torna-se incolor. Portanto, uma maior quantidade de bactérias no leite consome mais oxigênio, acelerando o desaparecimento da cor azul (Brito *et al.*, 2021). Tabela 6 apresenta a classificação da qualidade do leite pelo método de redução de azul de metileno.

Tabela 6 - Classificação da qualidade do leite através do teste de azul de metileno.

Tempo de descoloração	Classificação do leite	Estimativa da CPP (Contagem Padrão de Placas)
> 5,5 h	Bom	< 500 mil UFC/mL
2 h - 2,5 h	Regular	500 mil - 400 milhões UFC/mL
20 min - 2 h	Ruim	4 - 20 milhões UFC/mL
< 20 min	Muito ruim	> 20 milhões UFC/mL

Fonte: adaptado de Magalhães *et al.*, (2022)

Apesar da revogação da Instrução Normativa nº 52/2002 pela subsequente IN 76/2018, é essencial destacar, que para propósitos acadêmicos, a normativa anterior continha informações detalhadas acerca da avaliação da qualidade microbiológica do leite, as quais não são explicitamente abordadas na legislação atual. A título de ilustração, segundo a Tabela 6 da IN 52/2002, um leite considerado de qualidade microbiológica superior demonstraria um tempo de redutase excedendo 5,5 horas. Adicionalmente, a mencionada instrução normativa prescrevia um tempo redutase mínimo de 90 minutos para que o leite fosse aceito pelas indústrias processadoras (Brasil, 2002).

Neste estudo, os resultados do teste de redutase indicaram que não foram observadas diferenças significativas entre as amostras tratadas com plasma frio e as não tratadas. Em todos os tempos de exposição analisados, o tempo necessário para a transição da cor de azul para branco excedeu 5 horas. No entanto, é importante destacar que coliformes, *Bacillus cereus* e *Lactococcus lactis* têm uma maior capacidade de reduzir o corante (Magalhães *et al.*, 2022). Isso pode justificar por que o azul de metileno não foi reduzido mais rapidamente, mesmo com a presença significativa de psicotróficos, conforme apresentado na seção 5.2.

Embora não tenha sido possível encontrar referências específicas sobre o uso de plasma frio em conjunto com o teste de redutase, Kakati *et al.* (2021) investigaram a

qualidade do leite cru vendido em Guwahati e arredores (Índia) utilizando o método de redução do azul de metileno. Os resultados mostraram que, das 200 amostras analisadas, 14,5% reduziram o corante entre 5 e 8 horas, sendo classificadas como de boa qualidade. De Aquino e colaboradores (2021) também examinaram a aplicação do teste de redutase em amostras de leite cru coletadas de três diferentes laticínios. Todas as amostras levaram mais de 5 horas para perder a coloração azul, indicando uma boa qualidade microbiológica do leite.

## 5.2 ANÁLISES DE REDUÇÃO MICROBIOLÓGICAS DO LEITE CRU

O leite cru analisado apresentou uma contagem inicial de microrganismos mesófilos de  $6,6 \times 10^5$  UFC/mL, valor abaixo do limite máximo estabelecido pela IN nº 58/2019. Além disso, a contagem inicial de microrganismos psicrotróficos foi de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

A Tabela 7 apresenta os resultados da contagem inicial e o impacto do PFA na redução microbiana.

Tabela 7 - Resultados da avaliação da redução de bactérias mesófilas e psicrotróficas do leite cru antes e após submissão ao tratamento de plasma frio.

Tempo de tratamento (min)	Mesófilos aeróbios		Psicrotróficos	
	Sem tratamento ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Concentração obtida ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Sem tratamento ( $\log_{10}$ UFC/mL)	Concentração obtida ( $\log_{10}$ UFC/mL)
1		$5,70 \pm 0,09^a$		$5,68 \pm 0,03^b$
2,5	$5,82 \pm 0,003^a$	$5,71 \pm 0,11^a$	$6,00 \pm 0,002^a$	$5,62 \pm 0,05^b$
5		$5,70 \pm 0,06^a$		$5,57 \pm 0,09^b$

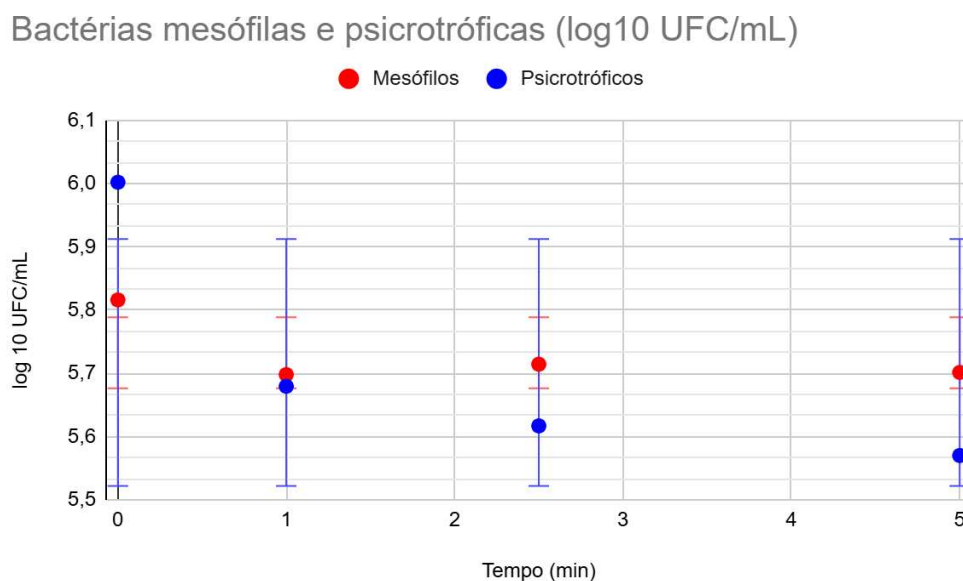
Nota: médias seguidas por letras diferentes no mesmo grupo de bactérias analisadas representam diferenças significativas ( $p < 0,1$ ) entre as amostras antes e após o tratamento, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, para o mesófilos aeróbios e conforme o teste de Tukey para psicrotróficos.

Fonte: Autora (2024)

A Figura 14 apresenta a comparação das contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas ao longo dos diferentes tempos de exposição ao plasma frio.



Figura 14 - Gráfico das contagens de bactérias mesófilas e psicotróficas ( $\log_{10}$  UFC/mL) ao longo dos tempos de exposição ao plasma frio.



Fonte: Autora (2024)

Neste estudo, a contagem inicial de mesófilos aeróbios foi de  $5,816 \pm 0,003$  log UFC/mL. Após os tratamentos com plasma frio, as contagens foram de  $5,698 \pm 0,09$  log UFC/mL (1 minuto),  $5,714 \pm 0,11$  log UFC/mL (2,5 minutos) e  $5,701 \pm 0,06$  log UFC/mL (5 minutos). Os resultados do teste de Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste de Dunn, revelaram que as reduções observadas na amostra controle em comparação aos tempos 1 minuto, 2,5 minutos e 5 minutos não foram significativas ( $p < 0,1$ ). Esses resultados sugerem que o plasma frio não foi eficaz na redução da carga microbiana inicial, sugerindo a necessidade de otimizar os parâmetros de tratamento.

Quanto aos microrganismos psicotróficos, a legislação brasileira não estabelece um padrão de identidade e qualidade para a enumeração destas bactérias (Brasil, 2018), entretanto, a importância de manter a carga bacteriana de psicotróficos no leite pós-ordenha abaixo de 10% da microbiota de mesófilos aeróbios é fundamental, pois, com o tempo de estocagem sob refrigeração, esses microrganismos tendem a predominar no leite cru (Pinto *et al.*, 2016). Neste estudo, observou-se que as bactérias psicotróficas atingiram  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, enquanto a contagem total de bactérias foi de  $6,6 \times 10^5$  UFC/mL. Isso indica que a proporção de psicotróficos superou o limite de 10% recomendado.

Esses resultados podem ser justificados pela presença de condições que favorecem o crescimento de psicrotróficos durante a estocagem e a necessidade de melhorias nos processos de controle microbiológico pós-ordenha para garantir a qualidade do leite. No entanto, Cousin (1982) e Furtado (1999), afirmam que alterações somente são perceptíveis sensorialmente quando há contagens de psicrotróficos superiores a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Os resultados do estudo mostraram uma redução significativa na contagem de psicrotróficos após a aplicação do plasma frio atmosférico no leite. Isso é importante porque esses microrganismos crescem em temperaturas de refrigeração, representando um desafio contínuo para a qualidade e segurança do leite na indústria de laticínios (Montanhini, 2016), uma vez que se tornam predominantes durante o armazenamento refrigerado, produzindo enzimas, cuja ação podem prejudicar as qualidades nutricional, sensorial e de textura dos produtos lácteos elaborados com esse leite (Chen *et al.*, 2003). A eficácia do plasma frio sobre os psicrotróficos, em relação aos mesófilos, pode ser atribuída a uma combinação de fatores relacionados às características intrínsecas desses microrganismos e às condições físico-químicas impostas pelas baixas temperaturas. Em ambientes de baixa temperatura, a solubilidade do oxigênio e das ERO aumenta, conforme descrito por Collins e Margesin (2019), ou seja, mais oxigênio e outras ERO podem estar presentes na solução. O plasma frio é conhecido por gerar diversas ERO e em baixas temperaturas, a maior solubilidade dessas ERO facilita sua interação com as células bacterianas, potencializando assim o efeito antimicrobiano.

Além disso, Russell (2008) e Jin *et al.* (2022) descrevem que a capacidade dos psicrotróficos de crescer em baixas temperaturas está diretamente relacionada com uma maior proporção de ácidos graxos insaturados na membrana celular. As adaptações dos psicrotróficos ao frio incluem aumentos no número de grupos insaturados e grupos metila nas cadeias lipídicas, modificações que são cruciais para manter a fluidez da membrana em baixas temperaturas. Essas alterações, embora necessárias para a sobrevivência em ambientes frios, resultam em uma maior vulnerabilidade às oxidações lipídicas causadas pelas ERO geradas pelo plasma frio. Esses danos oxidativos levam à desestabilização da membrana celular, resultando em ruptura e morte celular. Esta diferença na composição lipídica torna as membranas dos mesófilos menos suscetíveis à oxidação induzida pelas ERO. Conseqüentemente, a eficácia do plasma frio é menor contra os mesófilos, resultando em uma redução não significativa desses microrganismos em comparação com os psicrotróficos.

Além do impacto imediato do tratamento, o armazenamento pós-tratamento é um fator crítico para avaliar a continuidade da ação antimicrobiana das espécies reativas formadas pelo plasma frio. Trabalhos como os de Han *et al.* (2016c) e Yadav *et al.* (2020) investigaram o efeito do armazenamento em diferentes alimentos, temperaturas e tempos, observando que as espécies reativas geradas pelo plasma podem continuar a inativar microrganismos durante o armazenamento. Esses estudos indicam que a eficácia do tratamento com plasma frio pode ser aumentada ao considerar o armazenamento adequado dos produtos tratados, no entanto esta condição não foi avaliada neste trabalho.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o uso de plasma frio pode ser uma alternativa viável para a redução de microrganismos mesófilos e psicrotróficos no leite cru. No entanto, a ausência de reduções adicionais significativas com tempos de exposição mais longos sugere que ajustes nos parâmetros do plasma frio, como a voltagem e o tempo de aplicação, assim como testes de armazenamento podem ser necessários para melhorar a eficiência do processo.

Adicionalmente, no momento da coleta, foi informado que o leite possuía uma concentração elevada de gordura. Após 5 minutos de aplicação do plasma, observado odor de queimado e formação de grumos escuros na superfície do leite. Esses efeitos podem ser atribuídos à interação das espécies reativas geradas pelo plasma com os lipídios presentes, resultando em alterações físicas e sensoriais no leite tratado.

Além disso, a concentração inicial de microrganismos é um parâmetro importante para determinar a eficiência do processamento com plasma frio. Uma concentração inicial mais alta diminui o efeito de inativação do plasma frio, provavelmente porque contagens mais altas de microrganismos agrupam mais células juntas, reduzindo a capacidade dos ingredientes ativos do plasma de alcançar as células (Liao *et al.*, 2017). No experimento, a baixa redução das bactérias pode também ser atribuída à ação protetora das moléculas de gordura, impedindo a penetração efetiva do plasma no leite. Portanto, é necessário realizar mais análises para compreender melhor como o plasma frio interage com a composição lipídica do leite.

Estudo conduzido por Wang *et al.* (2022) avaliou os impactos do tempo de processamento do plasma frio DBD (poder de entrada de  $40 \pm 0,25$  W por 30 s, 180 s e 300 s), na inativação microbiana do leite cru de ovelha, utilizando leite de ovelha pasteurizado como controle positivo. Após 300 s, a amostra apresentou uma taxa de inativação microbiana

similar à do leite pasteurizado, além de ter micelas de caseína significativamente menores e um índice de polidispersidade reduzido.

Outro estudo realizado por Lee e colaboradores (2024) avaliaram o potencial do plasma frio de descarga corona na redução da microbiota do leite integral. O valor inicial da contagem padrão em placas foi de 5,30 logs UFC/mL, que diminuiu para 2,57 logs UFC/mL após 5 minutos de tratamento com plasma frio. Por outro lado, resultados semelhantes aos deste estudo foram encontrados por Silva (2021), em que avaliou-se a influência do nível das células somáticas e microrganismos psicrotóxicos em lotes de leite cru, sobre a qualidade do leite antes e após processamento UAT, com contagem de mesófilos de  $6,7 \times 10^5$  e de psicrotóxicos entre  $1,4 \times 10^5$  e  $6,7 \times 10^5$  UFC/mL UFC/mL, abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação para leite cru refrigerado para contagens de microrganismos.

### 5.3 ANÁLISES DE REDUÇÃO DE *Listeria innocua* NO LEITE UAT

Para assegurar que apenas *L. innocua* estivesse presente nas amostras, utilizou-se leite UHT, que não apresentou crescimento microbiano em nenhuma das diluições analisadas, confirmando sua esterilidade inicial.

A Tabela 8 apresenta os resultados da contagem média e desvio padrão de amostras de leite UAT, adicionadas de *L. innocua* e tratadas com plasma frio por diferentes tempos de exposição.

Tabela 8 - Resultados da avaliação da redução de *Listeria innocua* do leite UAT antes e após submissão ao tratamento de plasma frio.

Tempo de tratamento (min)	Sem tratamento (log <sub>10</sub> UFC/mL)	Contagem média (log <sub>10</sub> UFC/mL)
1		5,43 ± 0,05 <sup>a</sup>
2,5	5,59 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,37 ± 0,01 <sup>a</sup>
5		5,40 ± 0,02 <sup>a</sup>

Nota: médias seguidas por letras iguais não representam diferenças significativas ( $p < 0,1$ ) entre as amostras antes e após o tratamento, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Fonte: Autora (2024)

Neste estudo, a contagem inicial média de *L. innocua* foi de  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL. Após os tratamentos com plasma frio, as contagens foram de  $2,71 \times 10^5$  UFC/mL (1 minuto),  $2,33 \times 10^5$  UFC/mL (2,5 minutos) e  $2,50 \times 10^5$  UFC/mL (5 minutos). Os resultados do teste de Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste de Dunn, revelaram que as reduções observadas na amostra controle em comparação aos tempos 1 minuto, 2,5 minutos e 5 minutos não foram significativas. Esses resultados indicam que a aplicação do plasma frio, nas condições empregadas, não resultou em uma inativação substancial de *L. innocua*, sugerindo a necessidade de otimizar os parâmetros de tratamento, como o tempo de exposição e a voltagem, para aumentar a eficácia.

A configuração específica dos parâmetros do plasma e a resistência intrínseca dessa bactéria podem ter contribuído para a eficácia limitada observada, uma vez que, estudos demonstraram que o plasma frio é mais eficiente na inativação de bactérias gram-negativas em comparação com bactérias gram-positivas (Liao *et al.*, 2017; Schlüter; Fröhling, 2014), como a *L. innocua*.

Parâmetros como as condições de processamento, os parâmetros do produto e do equipamento devem ser considerados para a eficiência do tratamento com plasma frio na inativação microbiana (Misra; Jo, 2017). Liao *et al.* (2017) e Nishime *et al.* (2017) afirmam que as condições elétricas (voltagem, frequência, potência) influenciam na inativação microbiana pelo plasma frio e que quanto maiores as condições elétricas, maior a eficiência do tratamento. Moreau *et al.* (2008) afirmam que a seleção do material do eletrodo desempenha um papel em termos de eficácia da descontaminação. Uma camada de óxido pode rapidamente cobrir a superfície do eletrodo, levando à formação de uma barreira dielétrica que pode modificar o potencial do eletrodo e, conseqüentemente, as propriedades da descarga. Eletrodos de prata e latão podem ser mais eficazes do que aço inoxidável ou vidro/latão.

No trabalho realizado por Wu *et al.* (2020), foi investigada a influência do plasma frio atmosférico de descarga de barreira dielétrica na propriedade físico-química do leite e na inativação de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Aplicando 15kHz, diferentes voltagens (0, 40, 50, 60, 70 e 80 V) e tempos (0, 15, 30, 60, 90 e 120 segundos). Os resultados revelaram que tratamentos com plasma a 70 e 80 V por 120 segundos, bem como a 70 V por 90 e 120 segundos, foram equivalentes à pasteurização e à Ultra Alta Temperatura, com base na contagem de colônias. Além disso, observou-se destruição do DNA bacteriano, atividade reduzida de enzimas metabólicas e ruptura da

membrana celular das bactérias. As taxas de letalidade de *S. aureus* e *E. coli* apresentaram 100%, enquanto que para *L. monocytogenes* foi de 98,75%. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de *L. monocytogenes* pertencer ao filo Firmicutes, cujas bactérias possuem paredes celulares mais resistentes em comparação a *S. aureus* e *E. coli*.

Em um estudo conduzido por Kim *et al.* (2015) avaliou-se os atributos microbianos de segurança e qualidade do leite após tratamento com plasma de DBD encapsulado por pressão atmosférica, operado a 15 kHz no ar ambiente por 5 e 10 minutos. Após uma exposição de 10 minutos ao tratamento com DBD, observou-se uma redução de 2,46 log UFC/mL para *E. coli*, 2,40 log UFC/mL para *L. monocytogenes* e 2,43 log UFC/mL para *Salmonella typhimurium* nas amostras.

## 6 CONCLUSÃO

Durante as análises de qualidade, a temperatura máxima registrada foi de 23 °C, abaixo das temperaturas de pasteurização. O pH permaneceu dentro das faixas recomendadas pela legislação, indicando que o plasma frio não alterou significativamente a acidez do leite, preservando suas características sensoriais e nutricionais. A acidez titulável das amostras aumentou com o tempo de exposição ao plasma frio, mas dentro dos limites regulatórios. Os resultados do teste de redutase não apresentaram diferenças significativas entre as amostras tratadas com plasma frio e as não tratadas. O plasma frio reduziu significativamente os microrganismos psicrotróficos, mas foi menos eficaz contra os microrganismos mesófilos. Essa diferença pode ser atribuída às características metabólicas e à composição celular distintas desses grupos, além dos parâmetros experimentais como tempo de exposição e voltagem. Os resultados da análise estatística indicaram que não houve reduções significativas na contagem de *L. innocua* usando plasma frio. Esta limitação de eficácia pode ser atribuída à configuração específica dos parâmetros do plasma ou à resistência intrínseca dessa bactéria. Em suma, o tratamento com plasma frio pode ser um método inovador e promissor para a redução microbiana, mas ajustes nos parâmetros, considerações sobre a composição do leite e do efeito durante o armazenamento são necessários para viabilizar sua aplicação em escala industrial, garantindo a eficácia antimicrobiana e atendendo aos requisitos regulatórios. Portanto, para otimizar e aprimorar a eficácia do plasma frio na inativação de microrganismos em leite, futuras pesquisas podem focar em: (i) a coleta de amostras provenientes de diferentes laticínios, proporcionando uma maior representatividade dos resultados; (ii) a repetição do experimento, garantindo a robustez e a confiabilidade dos dados obtidos; (iii) a investigação de diferentes tempos de tratamento, permitindo a identificação das condições ideais para a inativação microbiana; (iv) a variação de parâmetros como frequência, potência e voltagem; (v) testes com distintos gases formadores de plasma frio para revelar alternativas mais eficazes; (vi) a realização de testes de armazenamento para observar a continuidade das reações das espécies reativas e sua eficácia prolongada na inativação de microrganismos; e (vii) a execução de mais testes de qualidade, incluindo peroxidase e fosfatase alcalina, para uma avaliação abrangente do impacto do tratamento no leite cru.

## REFERÊNCIAS

ABIDA, JRBMFA *et al.* A. Pulsed light technology: a novel method for food preservation. **International Food Research Journal**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 839, 2014.

ABOUBAKR, H. *et al.* Virucidal Effect of Cold Atmospheric Gaseous Plasma on Feline Calicivirus, a Surrogate for Human Norovirus. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 81, n. 11, p. 3612-3622, jun. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00054-15>.

AFSHARI, R.; HOSSEINI, H. Non-thermal plasma as a new food preservation method, its present and future prospect. **Archives of Advances in Biosciences**, [S.L.], v. 5, n. 1, 2014.

ALFONSO, G. *et al.* Avaliação da densidade e acidez do leite adquirido no comércio informal no município de Alegrete/RS. In: **Anais do Congresso de Mic**, ISBN 978-65-86471-05-2, p. 22-23, 2017.

ALVES JUNIOR, Clodomiro. Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 1-7, 11 dez. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620200004.1212>.

AMINI, M.; GHORANNEVISS, M. Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. **Lwt**, [S.L.], v. 73, p. 178-184, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.014>.

ANNAPURE, U. Application of cold plasma in food processing. Food Engineering and Technology Department, Institute of Chemical Technology, **Technologies in Food Processing**, p. 45-66, Matunga, Mumbai-400019, India, 2018.

ARUMUGAM, S. K. *et al.* Neonatal *Listeria innocua* sepsis. **International Journal of Contemporary Pediatrics**, v. 8, n. 5, p. 938-940, 2001.

BAIER, Matthias *et al.* Impact of plasma processed air (PPA) on quality parameters of fresh produce. **Postharvest Biology And Technology**, [S.L.], v. 100, p. 120-126, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.015>.

BAKKER, Henk C. Den *et al.* *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 1882-1889, 1 jun. 2014. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.052720-0>.

BALDELLI, Giulia *et al.* The potential role of *Listeria monocytogenes* in promoting colorectal adenocarcinoma tumorigenic process. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 24, n. 1, p.



1-10, 15 mar. 2024. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-024-03240-5>.

BARANCELLI, G.V. *et al.* LISTERIA MONOCYTOGENES: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 155-168, mar. 2011. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p1552011>.

BARBA, Francisco J. *et al.* Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: a review. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 66, p. 20-35, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.011>.

BAUMAN, D. *et al.* Major Advances Associated With Biosynthesis Of Milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, Apr. 2006.

BERTSCH, David *et al.* *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 526-532, 1 fev. 2013. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.036947-0>.

BORGES, M. *et al.* Listeria monocytogenes em Leite e Produtos Lácteos. Informação Tecnológica, Documento 119, Fortaleza, 30 páginas. **Embrapa**, 2009.

BOURKE, P. *et al.* Microbiological interactions with cold plasma. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 123, n. 2, p. 308-324, 22 jun. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13429>.

BOURKE, P. *et al.* The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. **Trends Biotechnol.** 36, 615–626, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2014/2015 a 2024/2025**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2015. 133 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, Art. 235, 248, 255 e 256 Título V – Da Inspeção Industrial e Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Estabelece os requisitos mínimos para a obtenção do Leite de Qualidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 58, de 6 de novembro de 2019**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 55, de 30 de setembro de 2020**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 set. 2020.

BRITO, M. *et al.* Testando a qualidade do leite. In: Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. 2000, Juiz de Fora: **Embrapa**, Gado de Leite, p. 83-94, 2000.

BRITO, M. *et al.* Agronegócio do Leite. Brasília, DF. **Embrapa**, 2021. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/reduzase](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/reduzase)>. Acesso em: 16 jun, 2024.

BUßLER, Sara *et al.* Impact of thermal treatment versus cold atmospheric plasma processing on the techno-functional protein properties from *Pisum sativum* ‘Salamanca’. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 167, p. 166-174, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.036>.

BUZRUL, Sencer; ALPAS, Hami. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. **Fems Microbiology Letters**, [S.L.], v. 238, n. 1, p. 29-36, set. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09733.x>.

CAMARGO, M.J. *et al.*, Avaliação dos surtos e doenças veiculadas por alimentos no Estado da Paraná entre 1978/1998. Curitiba; Instituto de Saúde do Paraná. 1998.

CARLIN, Catharine R. *et al.* *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 1-16, 2 jun. 2021. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004795>.

CARLIN, Catharine R. *et al.* Soil Collected in the Great Smoky Mountains National Park Yielded a Novel *Listeria sensu stricto* Species, *L. swaminathanii*. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-16, 29 jun. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00442-22>.

CARNEIRO, A. *et al.* Anuário Leite 2022: pecuária leiteira de precisão. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2022. 114 p. Disponível em: <ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão. - Portal Embrapa>. Acesso em: 27 jun. 2024

CHEN, L. *et al.* Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p:255-275, 2003.

COLLINS, Tony; MARGESIN, Rosa. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 103, n. 7, p. 2857-2871, 7 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>.

CONSTABLE, P. *et al.* (2016). Veterinary Medicine 11th A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats (p. 2278). Saunders LTD. **Elsevier**. Hardcover ISBN:9780702052460.

COSTA, E. **Influência do Tratamento Térmico sobre os Ácidos Graxos do Leite Bovino**. Itapetinga-BA: UESB, 2011. 46p. Dissertação (Mestrado). Curso em Engenharia de Alimentos - Engenharia de Processos de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.

COSTA, Annalisa *et al.* Listeria innocua and Listeria monocytogenes strains from dairy plants behave similarly in biofilm sanitizer testing. **Lwt**, [S.L.], v. 92, p. 477-483, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.073>.

COUSIN, M.A.. Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: a review. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 172-207, fev. 1982. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-45.2.172>.

COUTINHO, N. *et al.* Indústria de laticínios. Plasma a Frio na Qualidade e Segurança de Leite e Derivados. **Milkpoint**, 2016. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/plasma-a-frio-na-qualidade-e-e-guranca-de-leite-e-derivados-103334n.aspx>>. Acesso em: 22 out. 2023.

COUTINHO, Nathalia M. *et al.* Cold plasma processing of milk and dairy products. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 74, p. 56-68, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.008>.

COUTINHO, Nathalia M. *et al.* Processing chocolate milk drink by low-pressure cold plasma technology. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 278, p. 276-283, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.061>.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos Fennema**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Cap. 14. p. 905-952.

DE AQUINO, Aureluci Alves *et al.* eficiência da prova de redutase em leite cru refrigerado. **Estudos, Pesquisa e Extensão em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 2022.

DEETH, H.C.; DATTA, N.. Heat Treatment of Milk | Non-Thermal Technologies: introduction. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, [S.L.], p. 725-731, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00221-1>.

DENG, X. *et al.* Physical Mechanisms of Inactivation of Bacillus subtilis Spores Using Cold Atmospheric Plasmas. **Ieee Transactions On Plasma Science**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 1310-1316, ago. 2006. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/tps.2006.877739>.

DERGAL, S. B. Química de los alimentos. 4. ed. México: **Pearson educación**, 2006.

DIAS, J.; ANTES, F. Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional

do leite cru: Indicadores e aplicações práticas da Instrução Normativa 62. 1ª ed. Porto Velho, RO: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** - Embrapa. Rondônia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN 0103-9865 Outubro, 2014.

DINNO, Alexis. Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups using Dunn's Test. *The Stata Journal: Promoting communications on statistics and Stata*, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 292-300, abr. 2015. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1536867x1501500117>.

DOBRYNIN, D. *et al.* Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal Of Physics*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 115020, 26 nov. 2009. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115020>.

DOIJAD, Swapnil P. *et al.* *Listeria goaensis* sp. nov. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, [S.L.], v. 68, n. 10, p. 3285-3291, 1 out. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002980>.

DZIMITROWICZ, A. *et al.* Sterylizacja za pomocą niskotemperaturowej plazmy, generowanej w warunkach ciśnienia atmosferycznego. *Postępy Mikrobiologii*, v. 54, n. 2, 2015.

EHLBECK, J. *et al.* Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal Of Physics D: Applied Physics*, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 013002, 8 dez. 2010. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/44/1/013002>.

ERMOLAEVA, S. *et al.* Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *Journal Of Medical Microbiology*, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 75-83, 1 jan. 2011. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.020263-0>.

FAVARO, Marco *et al.* First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etecept. *Jmm Case Reports*, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 1-5, 1 jun. 2014. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.003103>.

FELZOLLAHI, E. *et al.* Factors influencing the antimicrobial efficacy of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Atmospheric Cold Plasma (ACP) in food processing applications. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 666-689, 25 mar. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1743967>.

FELLOWS, P. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. Woodhead Publishing in **Food Science and Technology**, 2000.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018, p. 922.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATIONS – FAO. (2013). **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. 2013. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATIONS – FAO. (2020). **Dairy production and products: milk production**. Rome: FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATIONS – FAO. **Statistics database, crop statistics**. (2021). Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2023. ISBN 978-65-5586-650-6

FRANCE, Thomas C. *et al.* The influence of temperature on filtration performance and fouling during cold microfiltration of skim milk. **Separation And Purification Technology**, [S.L.], v. 262, p. 118256, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118256>.

FRIDMAN, A. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure discharges. **Journal Of Physics D: Applied Physics**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 1-24, 7 jan. 2005. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/38/2/r01>.

FRIDMAN, A. Plasma chemistry. **Cambridge university press**, 2008.

Furtado M. M. Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção. São Paulo: **Fonte Comunicações e Editora**; 1999. 200 p

GHEDINI, T. *et al.* Qualidade microbiológica do kefir. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 4336-4349, 2020. **Brazilian Journal of Development**. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n1-309>.

GLOBAL DAIRY PLATFORM – GDP. (2016). **Annual Review**. Rosemont, IL, [2017]. Disponível em: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

GONZÁLEZ-RIVAS, F. *et al.* Biofilms in the Spotlight: detection, quantification, and removal methods. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 1261-1276, 30 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12378>.

GRAVES, Lewis M. *et al.* *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 1280-1288, 1 jun. 2010. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.014118-0>.

GUILLET, Christelle *et al.* Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 136-138, jan. 2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1601.091155>.

GUROL, C. *et al.* Low Temperature Plasma for decontamination of *E. coli* in milk. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 157, n. 1, p. 1-5, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.016>.

HAIN, Torsten *et al.* Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 37-51, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.047>.

HALTER, Evi Lang *et al.* *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 641-647, 1 fev. 2013. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.036830-0>.

HAMPAPURA, Jayanth Sunderraj *et al.* Behavior of Native Food Isolates of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* under the Influence of Selected Cultural Attributes and Heat and Cold Treatments. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 2209-2228, 3 nov. 2021. Journal of Pure and Applied Microbiology. <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.15.4.44>.

HAN, L. *et al.* Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 450-458, 15 jan. 2016a. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02660-15>.

HAN, S. *et al.* Oral toxicity of cold plasma treated edible films for food coating. **Journal of Food Science**, [S.L.], v.81, n.12, T3052–T3057, 8 nov. 2016b. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13551>.

HAN, L. *et al.* Atmospheric cold plasma interactions with modified atmosphere packaging inducer gases for safe food preservation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [S.L.], v. 38, p. 384-392, dez. 2016c. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.026>.

HARIKRISHNA, S. *et al.* Cold plasma as an emerging nonthermal technology for food processing: a comprehensive review. **Journal Of Agriculture And Food Research**, [S.L.], v. 14, p. 100747, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100747>.

HASANI, Endrit *et al.* Comparison of biofilm formation between non-pathogenic *Listeria* strains under different stress conditions. **Progress In Agricultural Engineering Sciences**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 73-80, 20 fev. 2021. Akademiai Kiado Zrt.. <http://dx.doi.org/10.1556/446.2020.20009>.

HAUG, Anna *et al.* Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 25, 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-6-25>.

HIERRO, Eva *et al.* Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. **Innovative Food Science &**

**Emerging Technologies**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 275-281, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.04.006>.

HU, Mengyi; GURTLER, Joshua B. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: a review. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 80, n. 9, p. 1506-1536, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-16-536>.

HUE-BEAUVAIS, Cathy *et al.* Nutritional Regulation of Mammary Gland Development and Milk Synthesis in Animal Models and Dairy Species. **Genes**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 523, apr. 2021. MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes12040523>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz (IAL), 2008, p. 1020

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre: **Artmed**, 2005, 6 ed., 712p.

Jl, Hui *et al.* Effects of Dielectric Barrier Discharge (DBD) Cold Plasma Treatment on Physicochemical and Functional Properties of Peanut Protein. **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 344-354, 3 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-017-2015-z>.

JIN, Shanshan *et al.* Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 169, p. 105652, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105652>.

KAKATI, Smita *et al.* Bacteriological quality of raw milk marketed in and around Guwahati city, Assam, India. **March-2021**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 656-660, 18 mar. 2021. Veterinary World. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2021.656-660>.

KARLSSON, M. *et al.* Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures. **Heliyon**, [S.L.], v. 5, n. 9, p. 1-9, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02431>.

KASZONI-RÜCKERL, Irene *et al.* Predominance of Distinct *Listeria Innocua* and *Listeria Monocytogenes* in Recurrent Contamination Events at Dairy Processing Facilities. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 234, 10 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020234>.

KHANI, Mohammad Reza *et al.* Studying the performance of dielectric barrier discharge and gliding arc plasma reactors in tomato peroxidase inactivation. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 197, p. 107-112, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.012>.

KIM, H. *et al.* Microbial safety and quality attributes of milk following treatment with atmospheric pressure encapsulated dielectric barrier discharge plasma. **Food Control**, [S.L.], v. 47, p. 451-456, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.053>.

KNAPP, Katherine M. *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, and Other Bacteria. **Congenital And Perinatal Infections**, [S.L.], p. 225-232, 2006. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-965-6:225>.

KOK, C.; HUTKINS, R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. **Nutrition Reviews**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 4-15, 16 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuy056>.

LANGONI, Hélio *et al.* Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 1059-1065, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2011001200004>.

LAROQUE, D. *et al.* Cold plasma in food processing: design, mechanisms, and application. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 312, p. 110748, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110748>.

LAROUSSE, M; A MENDIS, D; ROSENBERG, M. Plasma interaction with microbes. **New Journal Of Physics**, [S.L.], v. 5, p. 41-41, 30 abr. 2003. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/5/1/341>.

LAROUSSE, Mounir. Low Temperature Plasma-Based Sterilization: overview and state of the art. **Plasma Processes And Polymers**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 391-400, 27 maio 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ppap.200400078>.

LAROUSSE, M. Low-Temperature Plasmas for Medicine? **Ieee Transactions On Plasma Science**, [S.L.], v. 37, n. 6, p. 714-725, jun. 2009. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/tps.2009.2017267>.

LECLERCQ, Alexandre *et al.* *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 60, n. 9, p. 2210-2214, 1 set. 2010. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.017376-0>.

LECLERCQ, Alexandre *et al.* *Listeria thailandensis* sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 74-81, 1 jan. 2019. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>.

LEE, Sangseok; LEE, Dong Kyu. What is the proper way to apply the multiple comparison test? **Korean Journal Of Anesthesiology**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 353-360, 1 out. 2018. The Korean Society of Anesthesiologists. <http://dx.doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>.

LEE, Tan-Ang *et al.* The effects of corona discharge from a cold plasma source on the physicochemical properties and shelf-life of milk. **Food Bioscience**, [S.L.], p. 103980, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103980>.

LEWIS, M.; HEPELL, N. Continuous Thermal Processing of Foods: Pasteurization and UHT Sterilization. **Food Engineering Series Malden, MA, USA: Blackwell Publishing, 2000.**



LI, Xiang; FARID, Mohammed. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 182, p. 33-45, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.026>.

LIAO, X. *et al.* Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review. **Food Control**, [S.L.], v. 75, p. 83-91, mai. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>.

LIEBERMAN, M.; LICHTENBERG, A. **Principles of plasma discharges and materials processing**. 2. ed. New Jersey: Wiley, 2005. 794 p. Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 5:41.41-41.10. <http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/5/1/341>.

LU, H. *et al.* Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and dna. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 116, n. 4, p. 784-794, 21 jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12426>.

MAGALHÃES, I. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica do leite: métodos semiquantitativos. **Milkpoint**, 2022. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/qualidade-microbiologica-do-leite-metodos-semiquantitativos-231940/>>. Acesso em: 17 jun. 2024.

MAI-PROCHNOW, A. *et al.* Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 508-517, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025>.

MANDAL, R. *et al.* Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 80, p. 93-103, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.014>.

MARIOTO, L. *et al.* Deteriorating potential of the mesophilic microbiota, psychrotrophic, thermotolerant and spore raw milk. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 21, p. 1-12, 5 fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v21e-44034>.

MENDIS, D. *et al.* A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. **Ieee Transactions On Plasma Science**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 1304-1306, 2000. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/27.893321>.

MIGUEL, E.; ALMEIDA, F. *Listeria monocytogenes* em laticínios: perigos e prevenção. **Milkpoint**, 2022. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/ilctepamig/listeria-monocytogenes-em-laticinios-perigos-e-prevencao-230101/>>. Acesso em: 23 out. 2023.

MISHRA, R. *et al.* Friction Stir Welding—Overview. **Friction Stir Welding Of High Strength 7Xxx Aluminum Alloys**, [S.L.], p. 15-20, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809465-5.00003-9>.

MISRA, Nrusimha Nath *et al.* In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 118, n. 2, p. 177-182, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.02.005>.

MISRA, N. *et al.* Cold plasma in food and Agriculture: Fundamentals and applications. **Academic Press**, 1st ed. 2016. San Diego: Academic press, Elsevier Ltd.

MISRA, N.; JO, C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 64, p. 74-86, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.005>.

MISRA, N. *et al.* In-package cold plasma technologies. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 244, p. 21-31, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.019>.

MOISAN, Michel *et al.* Plasma sterilization. Methods and mechanisms. **Pure And Applied Chemistry**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 349-358, 1 jan. 2002. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274030349>.

MONTANHINI. Bactérias psicrotróficas em leite refrigerado. **Milkpoint**, 2016. Disponível em: <Bactérias psicrotróficas em leite refrigerado | MilkPoint>. Acesso em: 29 jun. 2024.

MOREAU, M. *et al.* Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 610-617, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001>.

MOZAFFARIAN, D. Dairy foods, obesity, and metabolic health: The role of the food matrix compared with single nutrients. **Advances in Nutrition**, 10, 917Se923S. 2019.

MUEHLHOFF, E. *et al.* Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO). **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Rome (Italy): Food and Agriculture Organisation of the United Nations; 2013. Doi <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12124>.

MUHAMMAD, Aliyu Idris *et al.* Understanding the Impact of Nonthermal Plasma on Food Constituents and Microstructure—A Review. **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 463-486, 18 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-017-2042-9>.

MUHAMMAD, Aliyu Idris *et al.* Effects of Plasma-Activated Water and Blanching on Microbial and Physicochemical Properties of Tiger Nuts. **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1721-1732, 28 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-019-02323-w>.

MURPHY, K. *et al.* The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: a pilot study. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, 17 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep40597>.

NASCIMENTO, I.; GALVÃO, E. Análises dos parâmetros físico químicos do leite bovino cru refrigerado dos pequenos agropecuaristas do sertão de angicos segundo a IN76/2018. UNIVERSA. 2020.

NERO, Luís Augusto *et al.* Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite-utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 115-126, 2000.

NIEDŰWIEDŰ, I. *et al.* The State of Research on Antimicrobial Activity of Cold Plasma. **Polish Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 2, p. 153-164, 1 jan. 2019. Polish Society of Microbiologists. <http://dx.doi.org/10.33073/pjm-2019-028>.

NIEMIRA, Brendan A.; SITES, Joseph. Cold Plasma Inactivates Salmonella Stanley and Escherichia coli O157: h7 inoculated on golden delicious apples. **Journal Of Food Protection**, [S.L.], v. 71, n. 7, p. 1357-1365, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-71.7.1357>.

NISHIME, T.M.C. *et al.* Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. **Surface And Coatings Technology**, [S.L.], v. 312, p. 19-24, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.07.076>.

NŰÑEZ-MONTERO, Kattia *et al.* Listeria costaricensis sp. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 844-850, 1 mar. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>.

ODUEKE, O. *et al.* Irradiation Applications in Dairy Products: a review. **Food And Bioprocess Technology**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 751-767, 7 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-016-1709-y>.

ORDŰÑEZ, J. Tecnologia de alimentos e processos: componentes dos alimentos e processos (Vol. 1). Porto Alegre: **Artmed**, p. 121, 2005.

OZEN, E.; SINGH, R.K.. Atmospheric cold plasma treatment of fruit juices: a review. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 103, p. 144-151, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.020>.

PACHECO *et al.* Acidez do leite: definição, fatores de alteração e análises. **Milkpoint**, 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/acidez-do-leite-definicao-fatores-de-alteracao-e-analises-228850/>. Acesso em: 17 jun. 2024.

PEREIRA, Murilo Anderson *et al.* Ação antilisterial do extrato bruto de Bacillus Amyloliquefaciens em diferentes concentrações de proteína, pH e sal. Alimentos e **Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 239-244, 2008. Disponível em: [<C:\TRABALHO\Alimentos\\_pdf\alime \(researchgate.net\)>](C:\TRABALHO\Alimentos_pdf\alime (researchgate.net)). Acesso em: 10 maio, 2024.

PEREIRA, S. **Efeito da temperatura e PH na inativação de listeria por alta pressão** (Order No. 30645510). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (2890425698). 2013. Disponível em:

<<https://www.proquest.com/dissertations-theses/efeito-da-temperatura-e-ph-na-inativação-de/docview/2890425698/se-2>>. Acesso em: 31 mar. 2024.

PEREIRA, P. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 619-627, jun. 2014. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>.

PERRIN, Monique *et al.* Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 11, p. 5308-5309, nov. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.11.5308-5309.2003>.

PHAN, K. *et al.* Nonthermal plasma for pesticide and microbial elimination on fruits and vegetables: an overview. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 52, n. 10, p. 2127-2137, 18 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.13509>.

PINTO, Cláudia L. O. *et al.* SEDIMENTAÇÃO, ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÓLISE DE LEITE UHT INTEGRAL DURANTE O ARMAZENAMENTO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 12-59, 12 set. 2016. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v71i4.484>.

PONRAJ, S. *et al.* Sterilization of cow's milk using liquid plasma. In: Proceedings of the 22nd international symposium on plasma chemistry, Antwerp, Belgium. 2015. p. 5-10.

PONRAJ, S. *et al.* Argon gas plasma to decontaminate and extend shelf life of milk. **Plasma Processes And Polymers**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 1-8, 20 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ppap.201600242>.

QIN, L. *et al.* Milk consumption and circulating insulin-like growth factor-I level: a systematic literature review. **International Journal Of Food Sciences And Nutrition**, [S.L.], v. 60, n. 7, p. 330-340, jan. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480903150114>.

QUEREDA, Juan J. *et al.* *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 11, p. 5868-5879, 1 nov. 2020. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004494>.

RANADHEERA, C. *et al.* Nanotechnology in Microbial Food Safety. **Nanotechnology Applications In Food**, [S.L.], p. 245-265, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811942-6.00012-1>.

RATHOD, Nikheel Bhojraj *et al.* Cold plasma an emerging nonthermal technology for milk and milk products: a review. **International Journal Of Dairy Technology**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 615-626, 23 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12771>.

RAUFU, I. *et al.* *Listeria ilorinensis* sp. nov., isolated from cow milk cheese in Nigeria. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 72, n.6, jun. 2022. Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005437>.

RAVINDHIRAN, Ramya *et al.* *Listeria monocytogenes* an Emerging Pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 86, n. 4, p. 2231-2251, 21 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-023-02269-9>.

ROCHA, Paulo Ricardo Dell'armelina *et al.* Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. **Research In Veterinary Science**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 111-114, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.017>.

RUSSELL, Nicholas J. **Membrane components and cold sensing**. In: Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 177-190.

SARANGAPANI, Chaitanya *et al.* Characterisation of cold plasma treated beef and dairy lipids using spectroscopic and chromatographic methods. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 235, p. 324-333, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.016>.

SAVAIANO, D.; HUTKINS, R. Yogurt, cultured fermented milk, and health: a systematic review. **Nutrition Reviews**, [S.L.], v. 79, n. 5, p. 599-614, 23 maio 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuaa013>.

SANTOS, M. V.; FONSECA, LFL. Composição e propriedades físico-químicas do leite. **Curso on-line sobre monitoramento da qualidade do leite**, módulo, v. 1, 2000.

SCHLÜTER, O.; FRÖHLING, A. Cold plasma for bioefficient food processing. In C. A. Batt, & M.-L. Tortorello (Eds.). **Encyclopedia of food microbiology** (pp. 948–953), London, 2014: Academic Press.

SCHODER, D. *et al.* Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. **Journal of Food Protection**, 74(6), 919–924. 2011. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-534>.

SEGAT, A. *et al.* Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 98, p. 181-188, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.010>.

SHARMA, Shruti; SINGH, Rakesh K. Effect of atmospheric pressure cold plasma treatment time and composition of feed gas on properties of skim milk. **Lwt**, [S.L.], v. 154, p. 112747, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112747>.

SHERBON, J. Physical Properties of Milk. In: Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E.H. (eds) **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Springer, Boston, MA. 1988. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7050-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7050-9_8).

SILVA, P. H. F. *et al.* **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997. 190p

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6. ed. São Paulo: Blucher, 2021.

SOUZA, G. *et al.* Agronegócio do leite. Brasília, DF. **Embrapa**, 2021.

STOICA, M. *et al.* Atmospheric cold plasma as new strategy for foods processing - an overview. **Innovative Romanian Food Biotechnology** 15 (2014): 1-8.

STRASSBURGER, A. *et al.* Análise da variação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado: uma revisão sistemática de literatura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 60-72, 1 nov. 2019. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v74i1.669>.

STRATAKOS, Alexandros Ch *et al.* In vitro and in vivo characterisation of *Listeria monocytogenes* outbreak isolates. **Food Control**, [S.L.], v. 107, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106784>.

SUN, Da-Wen. Thermal food processing: new technologies and quality issues. **CRC Press**, 2012. Pg. 281-283 e 289.

SUROWSKY, B. *et al.* Interactions of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma with Solid and Liquid Food Systems: a review. **Food Engineering Reviews**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 82-108, 27 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-014-9088-5>.

TARINC, Orhan Kemal *et al.* Comparison of physical-mechanical properties of Clova and Lyca marbles in Akcay (Antalya) region by using independent-samples T-test statistics. In: **The 2nd Mediterranean international conference of pure applied mathematics and related areas**, Paris, France. 2019. p. 28-31.

TENDERO, C. *et al.* Atmospheric pressure plasmas: a review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 2-30, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2005.10.003>.

THIRUMDAS, R. *et al.* Cold Plasma: a novel non-thermal technology for food processing. **Food Biophysics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, 27 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-014-9382-z>.

THIRUMDAS, R. *et al.* Functional and rheological properties of cold plasma treated rice starch. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 157, p. 1723-1731, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.050>.

THOMAS, A. **Listeria monocytogenes in fresh fruits and vegetables**. 2016. Master's degree in Agriculture and Life Science. Virginia Tech, 2016.

TYL, Catrin; SADLER, George D. PH and Titratable Acidity. **Food Science Text Series**, [S.L.], p. 389-406, 2017. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_22](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_22).

VÁZQUEZ-BOLAND, José A. *et al.* Pathogenicity islands and virulence evolution in. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 3, n. 7, p. 571-584, jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01413-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01413-7).

VENTURINI, K. *et al.* **Processamento do leite**. Espírito Santo: Pró-reitoria de Extensão–Programa Institucional de Extensão, 2007.

VERDUCI, E. *et al.* Cow's Milk Substitutes for Children: nutritional aspects of milk from different mammalian species, special formula and plant-based beverages. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1739, 27 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11081739>.

VIDAL, A.; NETTO, A. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2018. 220p.

WALSTRA, P. *et al.* Dairy technology: principles of milk properties and processes. **CRC Press**, 1999. Pg. 227-231

WAN, Z. *et al.* High voltage atmospheric cold plasma treatment of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* K-12 on Queso Fresco (fresh cheese). **Lwt**, [S.L.], v. 146, p. 111406, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111406>.

WANG, Shuangshuang *et al.* Processing sheep milk by cold plasma technology: impacts on the microbial inactivation, physicochemical characteristics, and protein structure. **Lwt**, [S.L.], v. 153, p. 112573, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112573>.

WELLER, Daniel *et al.* *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 286-292, 1 jan. 2015. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.070839-0>.

WON, Soyoon *et al.* Comparative Whole Cell Proteomics of *Listeria monocytogenes* at Different Growth Temperatures. **Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 259-270, 28 fev. 2020. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1911.11027>.

WU, X. *et al.* Influence of dielectric barrier discharge cold plasma on physicochemical property of milk for sterilization. **Plasma Processes And Polymers**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-14, 3 jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ppap.201900219>.

YADAV, Barun *et al.* Effect of in-package atmospheric cold plasma discharge on microbial safety and quality of ready-to-eat ham in modified atmospheric packaging during storage. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 85, n. 4, p. 1203-1212, 2 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.15072>.

YONG, H. *et al.* Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 46, p. 46-50, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.010>.

ZHANG, H. *et al.* Non-thermal plasma technology for organic contaminated soil remediation: a review. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 313, p. 157-170, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.067>.

ZIMECKI, M., Kruzel, M. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, 6, 89e106. 2007.

ZIUZINA, D. *et al.* Atmospheric cold plasma inactivation of Escherichia coli in liquid media inside a sealed package. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 778-787, 7 jan. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12087>.