

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
LEITE E DERIVADOS**

Larissa da Costa Teodoro

**Investigação do espessamento em leite condensado integral:
caracterização física, química e microbiológica**

Juiz de Fora
2023

Larissa da Costa Teodoro

Investigação do espessamento em leite condensado integral: caracterização física, química e microbiológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Teodoro, Larissa da Costa .

Investigação do espessamento em leite condensado integral : caracterização física, química e microbiológica / Larissa da Costa Teodoro. -- 2023.

97 p. : il.

Orientadora: Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Humberto Moreira Húngaro

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2023.

1. Leite condensado. 2. Staphylococcus coagulase negativa. 3. Viscosidade. I. Rodarte, Mirian Pereira , orient. II. Húngaro, Humberto Moreira, coorient. III. Título.

Larissa da Costa Teodoro

Investigação do espessamento em leite condensado integral: caracterização física, química e microbiológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

Aprovada em 24 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro (Coorientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Evandro Martins
Universidade Federal de Viçosa

Juiz de Fora, 30/08/2023.



Documento assinado eletronicamente por Mirian Pereira Rodarte, Coordenador(a), em 21/11/2023, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Humberto Moreira Hungaro, Professor(a), em 29/11/2023, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Evandro Martins, Usuário Externo, em 12/12/2023, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Italo Tuler Perroni, Professor(a), em 12/12/2023, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1441157 e o código CRC BCE702F5.

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus pelo equilíbrio que a fé me proporciona e por me guiar nesse caminho, que tem seus desafios e renúncias.

Aos meus pais, Edson Eduardo Teodoro e Angela Ap. Costa Teodoro, por todo amor e dedicação, além do apoio físico, material e emocional para que estudar fosse uma das minhas prioridades.

Ao meu companheiro, Lucas Angelis Modesto, pela paciência e incentivo às minhas conquistas pessoais e profissionais, mesmo que isso significasse adiar nossos planos como casal.

Ao Dr. Marcelo Henrique Otênio que, durante um período de fragilidade, foi um importante incentivador do meu ingresso no mestrado.

Aos meus orientadores que, hoje, tomo como referências pelo compromisso, confiança, orientação e por serem pessoas acessíveis. À Dra. Mirian por me receber e me inserir em um projeto com muitas oportunidades de aprendizado. Ao Dr. Humberto pela dedicação ao compartilhar seu conhecimento diretamente na bancada.

Aos Profs. Drs. Ítalo Tuler Perrone, Rodrigo Stephani, João Batista Ribeiro, Carla Christine Lange, Ângelo Márcio Leite Denadai e Patrícia Guedes Garcia e ao Me. Arlan Caldas Pereira Silveira com suas contribuições essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Aos Drs. Julia d'Almeida Francisquini e Juliano Rocha Pereira e ao Me. Danilo de Oliveira Luercio pelo auxílio na execução de metodologias importantes.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) e Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO) que contribuíram direta e indiretamente para esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados (PPGCTLD) e ao Programa de Bolsas da Universidade Federal de Juiz de Fora (PBPG/UFJF) pelo apoio financeiro, que permitiram minha dedicação exclusiva e ter uma experiência enriquecedora em conhecimento.

Aos bons amigos, que tenho e que fiz, obrigada pelo apoio, pelo companheirismo e por trazer mais leveza e alegria para essa fase da minha jornada profissional.

RESUMO

O leite condensado é um produto lácteo obtido pela eliminação parcial da água do leite adicionado de açúcar. Ele está entre os cinco produtos lácteos mais exportados pelo Brasil e deve ter consistência viscosa e semilíquida, cor branco amarelada, odor e sabor próprios, textura homogênea com ausência de arenosidade. Ao longo do tempo de prateleira, um aumento gradual da viscosidade é esperado, entretanto, o aumento excessivo da viscosidade até consistência de gel descaracteriza o produto. Este defeito é denominado de espessamento. O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras de leite condensado integral com defeito de espessamento, obtidas de uma indústria de laticínios brasileira. As amostras de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) foram avaliadas por meio de microscopia óptica e de medida de pH, de acidez, de teor de umidade (U), de sólidos totais (ST), de sólidos solúveis (SS), de atividade de água (A_w) e de gordura. Também foram analisados o perfil de bandas de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), atividade de protease, distribuição de partículas, cor, índice 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L) e a reologia. A análise microbiológica foi realizada para enumeração de aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras. As estirpes bacterianas foram selecionadas e caracterizadas por métodos bioquímicos, moleculares (rep-PCR) e espectrométricos (MALDI-TOF). Os resultados demonstraram que LCFP tem valor de acidez (0,59 g de ácido láctico/100g) e pH (5,37) não característicos para leite condensado, partículas e cristais de maior diâmetro, comportamento reológico típico de sólidos ($tg \delta < 1$) e viscosidade complexa superior a de LCP. *Staphylococcus* coagulase negativa e leveduras foram os principais grupos de microrganismos isolados das amostras. *Staphylococcus gallinarum* demonstrou capacidade de produzir espessamento em leite condensado integral, que progrediu para o estado de gel com o aumento de acidez e redução do pH. Os resultados desse estudo demonstraram que problemas de contaminação microbiana na cadeia produtiva de leite condensado podem produzir a característica de espessamento no produto, ao longo do tempo de armazenamento.

Palavras-chave: Leite condensado. *Staphylococcus* coagulase negativa. Viscosidade. Gelificação.

ABSTRACT

Sweetened condensed milk is a milk product which can be obtained by the partial removal of water from milk with the addition of sugar and is among the five dairy products most exported by Brazil. It must meet the sensory characteristics of viscous and semi-liquid consistency, yellowish white color, characteristic odor and flavor, homogeneous texture with no sandiness. Along the shelf life a gradual increase in viscosity is expected, however, the excessive increase in viscosity and gelation de-characterizes the product. This is a defect called thickening. The aim of this search was to characterize condensed milk samples with thickening, obtained from a Brazilian dairy industry. Standard (SCM) and non-standard (NSCM) condensed milk samples were analyzed for optical microscopy, pH, acidity, moisture content (MU), total solids (TS), soluble solids (SS), water activity (Aw) and fat. The profile of protein bands by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), protease activity, particle distribution, color, free 5-hydroxymethylfurfural index (HMFf) and rheology were also analyzed. Microbiological analysis was performed to enumerate mesophilic aerobic, coagulase positive *Staphylococcus*, filamentous fungi and yeasts. The bacterial strains were selected and characterized by biochemical, molecular (rep-PCR) and spectrometric (MALDI-TOF) methods. The results showed that NSCM has an acidity value (0.59 g/100g of lactic acid) and pH (5.37) uncharacteristic for condensed milk, particles and crystals larger (NSCMd90%: 34.88 μm), rheological behavior typical of solids and higher complex viscosity than SCM. Coagulase negative *Staphylococcus* and yeasts were the main groups of microorganisms isolated from the samples. *S. gallinarum* demonstrated the ability to produce thickening in sweetened condensed milk, which progressed to a gel state with an increase in acidity and a reduction in pH. The results of this study show that problems with microbial contamination in the production of sweetened condensed milk can cause thickening during the shelf life.

Keywords: Sweetened condensed milk. Coagulase negative *Staphylococcus*. Viscosity. Gelation

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Distribuição de partículas em leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP).....60
- Gráfico 2 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) com oscilação de amplitude..... 63
- Gráfico 3 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) oscilação de frequência 65
- Gráfico 4 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) com oscilação de temperatura 65
- Gráfico 5 – Crescimento microbiano de *Staphylococcus* coagulase negativa, ao longo de 60 dias, em uma matriz de leite condensado integral 75
- Gráfico 6 – Desenvolvimento de acidez em leite condensado integral provocado por *Staphylococcus* coagulase negativa, ao longo de 60 dias de incubação a 30 °C..... 75
- Gráfico 7 – Variação de pH de leite condensado integral por *Staphylococcus* coagulase negativa, após (A) 30 e (B) 60 dias de incubação a 30°C.. 77
- Gráfico 8 – Reologia oscilatória com variação de amplitude para leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus* coagulase negativa 80
- Gráfico 9 – Reologia oscilatória com variação de temperatura para leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus* coagulase negativa..... 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Principais marcos na história do leite condensado	15
Figura 2	–	Esquema representativo das principais etapas de produção de leite condensado.....	17
Figura 3	–	Representação da molécula de sacarose.....	21
Figura 4	–	Funcionamento básico de evaporador de película descendente.....	22
Figura 5	–	Representação da molécula de lactose	24
Figura 6	–	Microscopia eletrônica de amostra de leite condensado a) antes e b) depois de armazenado por 45 dias a 37 °C	33
Figura 7	–	Desenho experimental do estudo da relação entre espessamento do leite condensado e atividade microbiana.....	52
Figura 8	–	Presença de sólidos insolúveis em amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP), diluídos em água....	56
Figura 9	–	Avaliação de proteólise em leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)	58
Figura 10	–	Macro e Micrografia de amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)	61
Figura 11	–	Imagens representativas das características das colônias de microrganismos isolados de leite condensado	66
Figura 12	–	Dendrograma baseado na análise de clusters do fingerprint de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos por rep-PCR	69
Figura 13	–	Imagens representativas de teste qualitativo para capacidade de produção de polissacarídeo extracelular	71
Figura 14	–	Leite condensado integral (A) utilizado como controle e (B) inoculado com <i>Staphylococcus gallinarum</i> , após 30 dias de incubação a 30 °C.	79
Figura 15	–	Leite condensado integral inoculado com <i>Staphylococcus gallinarum</i> em a) 0 dias e b) 60 dias de incubação a 30°C	79
Figura 16	–	Leite condensado integral inoculado com <i>Staphylococcus gallinarum</i> após 90 dias.....	83
Figura 17	–	Avaliação de proteólise em leite UHT e leite condensado integral inoculado com <i>Staphylococcus gallinarum</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Critérios microbiológicos para leite condensado integral	26
Tabela 2	– Propriedades físico-químicas de leite condensado integral.....	54
Tabela 3	– Atividade de protease em amostras de leite condensado integral padrão (LCP), fora do padrão (LCFP) e amostra obtida no mercado local (LCML)	58
Tabela 4	– Parâmetros de distribuição de partículas para amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP).....	59
Tabela 5	– Indicadores de cor para amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)	61
Tabela 6	– Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, <i>Staphylococcus</i> spp. e leveduras em amostras de leite condensado integral.....	68
Tabela 7	– Características bioquímicas de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite condensado integral	70
Tabela 8	– Características de leite condensado integral obtido do mercado local (LCML)	74
Tabela 9	– pH de leite condensado integral inoculado com <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa, após 30 e 60 dias de incubação a 30°C.....	78
Tabela 10	– Teor de umidade de leite condensado integral inoculado com <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa, após 60 dias de incubação a 30 °C.....	82
Tabela 11	– Variação de pH para leite UHT, com e sem a presença de sacarose, inoculado com <i>Staphylococcus gallinarum</i>	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	PRODUÇÃO DE LEITE CONDENSADO	17
2.1.1	Matéria-prima	17
2.1.2	Padronização do leite	17
2.1.3	Tratamento térmico	19
2.1.4	Adição de sacarose	21
2.1.5	Evaporação	22
2.1.6	Resfriamento, cristalização e envase	24
2.2	ASPECTOS NORMATIVOS DE LEITE CONDENSADO BRASILEIRO	25
2.2.1	<i>Staphylococcus spp.</i>	28
2.3	DEFEITOS TECNOLÓGICOS	28
2.3.1	Espessamento por tempo de permanência ou por calor	30
2.3.2	Espessamento microbiano	33
3	OBJETIVO	37
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	AMOSTRAS	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA	38
4.2.1	pH e acidez	38
4.2.2	Teor de umidade, sólidos totais, sólidos solúveis e atividade de água	39
4.2.3	Gordura	40
4.2.4	Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	41
4.2.5	Atividade de protease	42
4.2.6	Microscopia	42
4.2.7	Distribuição do tamanho de partículas	43

4.2.8	Colorimetria e 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L)	43
4.2.9	Reologia	44
4.3	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	45
4.3.1	Isolamento dos microrganismos	45
4.3.2	rep-PCR	46
4.3.3	Identificação dos microrganismos por métodos bioquímicos	47
4.3.3.1	<i>Coloração de Gram</i>	47
4.3.3.2	<i>Catalase</i>	48
4.3.3.3	<i>Oxidação-Fermentação da Glicose (OF)</i>	48
4.3.3.4	<i>Suscetibilidade a antimicrobianos</i>	48
4.3.3.5	<i>Teste de Coagulase</i>	49
4.3.4	Identificação dos microrganismos isolados por MALDI-TOF MS	49
4.3.4.1	<i>Preparo das amostras</i>	49
4.3.4.2	<i>Processamento dos dados</i>	50
4.3.5	Produção de proteases pelos isolados obtidos	50
4.3.6	Produção de polissacarídeo extracelular (EPS)	50
4.4	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ESPESSAMENTO DO LEITE CONDENSADO E ATIVIDADE MICROBIANA	51
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA	54
5.1.1	pH, acidez e características de composição centesimal	54
5.1.2	Análise de proteína e atividade de proteases	55
5.1.3	Microscopia e distribuição do tamanho de partículas	59
5.1.4	Colorimetria e 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L)	61
5.1.5	Reologia	62
5.2	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	66
5.2.1	Isolamento dos microrganismos	66

5.2.2	<i>Fingerprint</i> genético e identificação dos microrganismos por métodos bioquímicos e MALDI-TOF MS	68
5.2.3	Relação entre espessamento do leite condensado e atividade microbiana.....	74
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

O leite bovino e seus derivados têm um importante papel no agronegócio brasileiro. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de leite e, em 2019, ocupou o quinto lugar no ranking mundial (IBGE, 2020; Rentero, 2023). A produção nacional alcançou 34,61 bilhões de litros, em 2022, o que representa uma boa capacidade de fornecimento de insumos para empreendedores do setor (IBGE, 2023).

O leite é consumido de várias formas, o que inclui o leite em pó, leite condensado, leite desnatado, queijos, requeijão, doce de leite, manteiga, iogurte, bebida láctea, creme de leite e outros (Vidal; Netto, 2018). Dentre os cinco produtos lácteos mais exportados pelo Brasil (leite em pó, leite fluido, leite condensado, creme de leite e queijo), o leite condensado ocupou a segunda posição, em 2022, representando 20,6% das exportações (CEPEA, 2022).

O leite condensado é definido como produto lácteo obtido pela eliminação parcial da água do leite adicionado de açúcar, ou por qualquer outro processo, que gere um produto de composição e característica similar (*Codex Alimentarius*, 2018). É encontrado em várias partes do mundo e popularmente usado como ingrediente de sobremesas e bebidas (Maurício *et al.*, 2021). Em suas aplicações, o leite condensado deve ter consistência viscosa, semilíquida e fluxo contínuo de escoamento (Brasil, 2018a). Durante o tempo de prateleira do produto acontece um aumento gradual da viscosidade, mas essa variação não deve ser excessiva a ponto de impedir o produto de fluir, isso torna o leite condensado inadequado para suas aplicações. O aumento excessivo da viscosidade de leite condensado até consistência de gel é chamado de espessamento (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920).

O pré-aquecimento inadequado, alta acidez do leite, concentração de sólidos e temperatura de estocagem elevada são condições favoráveis ao espessamento (Massari, 2018). A presença de atividade microbiana também pode contribuir para o defeito. *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. osmotolerantes têm sido capazes de crescer em produtos açucarados e provocar deterioração. Esses grupos microbianos produzem enzimas proteolíticas, cuja atividade pode resultar no espessamento de leite condensado, que no caso de *Micrococcus* pode ser acompanhado de acidificação (Carvalho *et al.*, 2017; Renhe; Perrone; Silva, 2011). Além disso, o gênero *Staphylococcus* possui espécies de patógenos oportunistas e produtores de toxinas, o que impõe um risco potencial à saúde de quem consome

produtos em que esses microrganismos ou suas toxinas estão presentes (Kadariya; Smith; Thapaliya, 2014).

Existem poucos estudos na literatura que discutem sobre o espessamento em leite condensado e a maioria das pesquisas foram realizadas há mais de sessenta anos (Downs, 1925; Rice; Downs, 1923; Rogers; Dahlberg; Evans, 1920; Samel; Muers, 1962a, 1962b, 1962c; Stebnitz; Sommer, 1935a, 1935b, 1935c; Webb; Hufnagel, 1948). Em 2020, a ocorrência de espessamento em leite condensado de uma indústria de laticínios brasileira indicou a necessidade de se avançar no entendimento do defeito. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar leite condensado integral com defeito tecnológico de espessamento e investigar as suas prováveis causas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

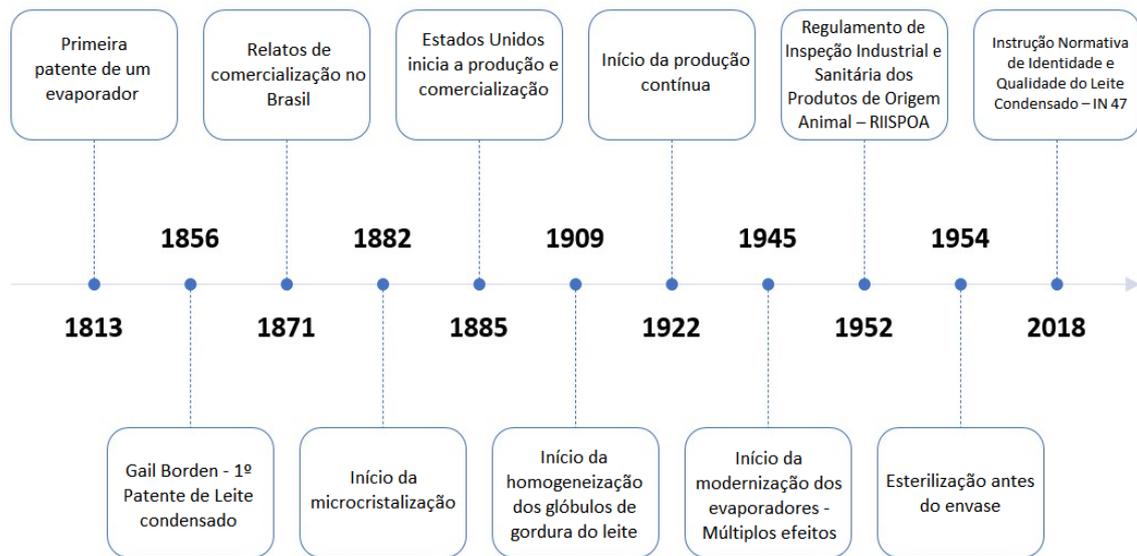
O leite condensado é um produto lácteo obtido pela eliminação parcial da água do leite adicionado de açúcar, ou por qualquer outro processo, que gere um produto de composição e característica similar. O produto integral é constituído no mínimo de 8% (m/m) de gordura láctea, 28% (m/m) de sólidos lácteos e 34%(m/m) de proteína láctea nos sólidos lácteos não gordurosos. O conteúdo de gordura e/ou proteína do leite pode ser ajustado, desde de que mantida a proporção de caseína e proteínas do soro, importante para a viscosidade do produto (*Codex Alimentarius*, 2018).

A norma brasileira IN 47/2018 adota os mesmos atributos de composição indicados pelo *Codex Alimentarius* (2018). As principais variedades citadas nestes documentos são o leite condensado com alto teor de gordura, integral, parcialmente desnatado e desnatado. A adição de gordura ou óleo vegetal não é admitida pela norma brasileira, mas o óleo de palma, em substituição ao óleo de coco, é citado em variedades produzidas por outros países (Brasil, 2018a; Nieuwenhuijse, 2016).

A invenção do leite condensado é atribuída ao americano Gail Borden. O produto surgiu da necessidade de resolução de um dos maiores desafios no consumo de leite fluido durante o século XIX, o leite se tornava impróprio para consumo antes de chegar ao consumidor (Mostaro, 2021). Em 1856, Borden patenteou um método de condensação, que permitiu o transporte e armazenamento de leite por longos períodos e sem a necessidade de refrigeração (Meirelles, 2019). O aumento da concentração de sólidos, pela remoção parcial de água e adição de açúcar, reduz a água disponível para reações bioquímicas aumentando a conservação do produto (Mostaro, 2021).

Por se tornar um produto de durabilidade e de alto valor calórico, o leite condensado se popularizou durante uma guerra civil americana (1861-1865) ao suprir as necessidades energéticas dos soldados. Contudo, somente em 1885 nos Estados Unidos da América, o leite condensado passou a ser produzido em escala industrial e ficou conhecido mundialmente (Mostaro, 2021; Renhe; Perrone; Silva, 2011). Abaixo são apresentados os principais marcos na história do leite condensado (Figura 1).

Figura 1 – Principais marcos na história do leite condensado



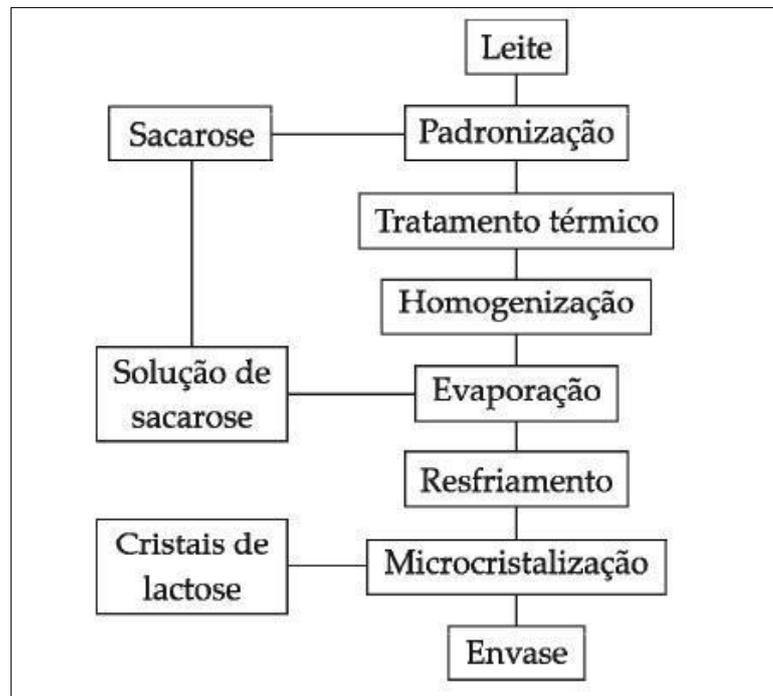
Fonte: Adaptado de Correa *et al* (2022).

O leite condensado está presente no mercado brasileiro desde o final do século XIX. Neste período, seu principal uso culinário foi como bebida na alimentação de crianças (Meirelles, 2019). O mercado de leite condensado, que até década de 1980, foi dominado principalmente pela União Europeia, EUA e ex-União Soviética, hoje, possui contribuições expressivas da América Latina, sendo o Brasil, o Peru e o Chile os principais produtores desta região (Neto; Siqueira, 2021). Em 2018, a produção brasileira alcançou 655 mil toneladas, se destacando como segundo maior produtor mundial, de acordo com a *International Dairy Federation* (2019 apud Neto; Siqueira, 2021). É um produto presente em 90% das casas brasileiras e utilizado em preparações culinárias diversas, principalmente, sobremesas e bebidas (ABRAS, 2020).

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE CONDENSADO

A seleção da matéria-prima, padronização, tratamento térmico, homogeneização, evaporação, resfriamento, microcristalização e envase são as principais etapas da produção industrial de leite condensado (Figura 2) (Renhe; Perrone; Silva, 2011). Existem muitas variações na tecnologia de fabricação deste produto quanto a composição da matéria-prima, forma de adição de açúcar (em pó antes do tratamento térmico ou xarope após a evaporação), homogeneização, temperatura de evaporação, temperatura de resfriamento e condução da cristalização (tempo, temperatura, agitação e tamanho dos cristais). As características do produto final estão intimamente relacionadas aos fatores de variação dentro do processo (Santos *et al.*, 2009a).

Figura 2 – Esquema representativo das principais etapas de produção de leite condensado



Fonte: Renhe, Perrone e Silva (2011).

2.1.1 Matéria-prima

O leite fluido (12% a 13,5% de sólidos lácteos), leite em pó (96,5% a 97% de sólidos lácteos), leite evaporado (40% a 50% de sólidos lácteos) ou a combinação

destes são as principais matérias-primas utilizadas na produção de leite condensado pelas indústrias de laticínios brasileiras (Renhe; Perrone; Silva, 2011).

O leite é uma dispersão coloidal de proteínas em emulsão com a gordura, de coloração branca opaca e produzido pela glândula mamária da fêmea de mamíferos (Walstra; Wouters; Geurts, 2005). É definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2017). Em sua constituição estão presentes água, gordura (4,0%), proteínas (3,3%), lactose (4,6%) e minerais (0,7%) (Walstra; Wouters; Geurts, 2005).

A qualidade da matéria-prima é um fator chave para as características do produto final. O leite cru deve ser branco homogêneo, com odor característico e atender aos parâmetros físico-químico para composição centesimal (mín. 3% (m/m) de gordura, 2,9% (m/m) de proteína total, 4,3% (m/m) de lactose, 8,4% (m/m) de sólidos não gordurosos e 11,4% (m/m) de sólidos totais), de acidez titulável (0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100mL), estabilidade ao alizarol (72% v/v), densidade relativa (1,028 e 1,034 g/mL, a 15 °C) e índice crioscópico em graus Hortvet (-0,530 °H a -0,555 °H) (Brasil, 2018b).

O leite deve ser isento de antibióticos, inibidores de crescimento microbiano, neutralizantes de acidez e reconstituintes de densidade. Quanto aos parâmetros microbiológicos, a média geométrica trimestral de células somáticas (CS) não deve exceder a 5×10^5 CS/mL e o limite máximo para Contagem Padrão em Placas antes do beneficiamento é de 9×10^5 UFC/mL (Brasil, 2018b). Após classificação da carga de leite quanto ao odor, temperatura e corpos estranhos, o leite é pré-beneficiado. A remoção de impurezas é realizada por etapas de filtração e clarificação. Este é um ponto de controle da produção, mas tem um pequeno efeito na qualidade bacteriológica do leite (Ali; Fischer, 2002; Brasil, 2017).

O Brasil, apesar de ser um dos maiores produtores mundiais de leite bovino, tem problemas frequentes associados à contaminação por microrganismos (Marioto *et al*, 2020). Embora a refrigeração a 4 °C reduza o crescimento de bactérias mesófilas, bactérias psicrófilas são capazes de crescer nestas condições e produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis. O tratamento térmico é capaz de inativar microrganismos psicrófilos, mas as enzimas produzidas por estes continuam a causar problemas tecnológicos, como a redução de vida de prateleira e alterações organolépticas (Mörschbacher; Rempel; Maciel, 2017).

A homogeneização é utilizada, principalmente, no uso do leite na forma em pó e concentrada. Isso contribui para a solubilização, mas também para a viscosidade do leite condensado (Renhe; Perrone; Silva, 2011). A homogeneização contribui para a viscosidade inicial, mas não provoca mudanças significativas ao longo do tempo de armazenamento (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920). Durante a homogeneização, a membrana do glóbulo de gordura é desestabilizada e há o aumento da área superficial com a formação de glóbulos de tamanho menor. As proteínas do leite, principalmente, caseína e β -lactoglobulina se adsorvem à superfície para restituir a membrana dos novos glóbulos formados, conseqüentemente, há um aumento da interação com a fase aquosa, o que contribui para aumento da viscosidade (Kielczewska *et al.*, 2021).

2.1.2 Padronização do leite

O leite por ser um produto de síntese biológica tem oscilações naturais em sua composição. A espécie, raça, idade, fase de lactação, alimentação, influências sazonais e climáticas são os principais fatores de variabilidade. Entre espécies e raças a gordura é o componente de maior variação (Vidal; Netto, 2018).

A padronização tem como objetivo uniformizar a relação entre o teor de gordura (%G) e sólidos não gordurosos (%SNG), uma vez que, o leite condensado é um produto comercializado em composição integral, semidesnatado e desnatado (Perrone *et al.*, 2017). O fator de padronização (RF: %G / %SNG) depende da composição desejada. Por exemplo, o leite condensado com 8,5% de gordura e 16,5% de sólidos não gordurosos (SNG) possui RF de 0,5152.

A padronização pode ser realizada tanto para o teor de gordura, quanto para o teor de SNG. A adição de leite desnatado ou creme é utilizada para padronização da gordura, enquanto a adição de açúcar, sólido ou xarope, é utilizado para padronização dos sólidos (Silva, 2016). Na padronização de gordura a quantidade de leite desnatado ou de creme pode ser calculada pela Equação 1, conforme Perrone *et al.* (2017)

$$MCLD = \frac{[(RF \cdot SNGli) - Gdli] \cdot Qp}{Gdld - (RF \cdot SNGld)} \quad (1)$$

Em que : MCLD: massa de creme ou de leite desnatado a ser adicionada (kg); RF: fator de padronização desejado no leite condensado; SNGli : teor de sólidos não gordurosos do leite integral (% m/m); SNGld: teor de sólidos não gordurosos de leite desnatado ou creme (% m/m); Gdli: teor de gordura do leite integral (% m/m);Gdld: teor de gordura do leite desnatado ou do creme (% m/m); e QLp: quantidade de leite a ser padronizado (Kg).

2.1.3 Tratamento térmico

O pré-aquecimento, a pasteurização lenta (63 °C a 65 °C, 30 minutos), pasteurização rápida (72 °C a 75 °C, 15 a 20 segundos), ultra-alta temperatura (130 °C a 150 °C, 2 a 4 segundos) e esterilização (110 °C a 130 °C, 20 a 40 minutos) são os principais tratamentos térmicos aplicados no beneficiamento do leite cru com o objetivo de redução da carga de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Outros binômios tempo e temperatura são permitidos, desde que comprovada a eficiência do processo (Brasil, 2017).

A escolha do método depende da tecnologia de fabricação e das modificações químicas desejadas. Na produção de leite condensado é comum a aplicação de temperaturas acima da utilizada no processo de pasteurização rápida. O produto obtido de matéria-prima combinada é aquecido entre 85 °C a 95 °C, enquanto o produto de leite cru a 100 °C ou superior (Nieuwenhuijse, 2016). O tratamento térmico entre 85 °C a 100 °C, por 20 segundos é capaz de destruir microrganismos vegetativos e muitas enzimas são inativadas. Entretanto, microrganismos esporulados, proteinase endógena (plasmina) e algumas enzimas microbianas (proteinas e lipases) não são completamente inativadas. Além disso, ocorre a desnaturação das proteínas do soro, desenvolvimento de sabor de cozido e auto-oxidação da gordura. Estas alterações controladas são desejáveis, pois contribuem para as características de viscosidade, *flavor* e cor do produto (Renhe; Perrone; Silva, 2011).

Renhe, Perrone e Silva (2011) reuniram as principais alterações no leite provocadas pelo tratamento térmico, que são citadas por diversos autores, dentre elas:

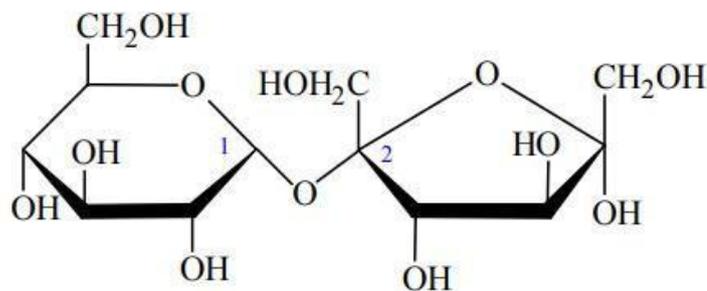
- a) Eliminação de gases (CO₂ e O₂);
- b) Migração de fosfato de cálcio para fase coloidal;

- c) Produção de ácido fórmico e lactulose por isomerização da lactose;
- d) Hidrólise de ésteres fosfóricos da caseína e de fosfolipídeos;
- e) Redução do pH por alteração do equilíbrio salino, isomerização da lactose e hidrólise de ésteres fosfóricos;
- f) Desnaturação das proteínas do soro;
- g) Aumento do risco de auto-oxidação da gordura por transferência de cobre do plasma para a gordura.

2.1.4 Adição de sacarose

A sacarose (Figura 3) é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e frutose, em ligação glicosídica α -1,2 extraído da cana de açúcar e beterraba. É o principal açúcar usado na fabricação de leite condensado, pois tem boa solubilidade, baixa susceptibilidade à fermentação e efeito preservativo. Além disso, por não ser um açúcar redutor não favorece a reação Maillard (Bryksa; Yada, 2015; Massari, 2018).

Figura 3 – Representação da molécula de sacarose



Fonte: Google Imagens.

A reação de *Maillard* é um dos tipos de reação de escurecimento não enzimático, que acontece entre o grupo carbonila do açúcar redutor com o agrupamento amino livre de aminoácidos, peptídeos e proteínas (Francisquini *et al.*, 2017). Ao contrário da sacarose, a lactose é um açúcar redutor, naturalmente presente no leite e participa da reação de *Maillard*. Dentre as consequências dessa reação nos derivados lácteos podemos citar: diminuição do valor nutritivo, devido a polimerização de compostos reativos com resíduos de aminoácidos essenciais como, por exemplo, a lisina que não fica disponível para a digestão; formação de compostos antioxidantes,

antibacterianos e que conferem sabor e aroma; e desenvolvimento de coloração amarronzada, devido as melanoidinas (Renhe, Perrone; Silva, 2011).

A reação de *Maillard* é favorecida principalmente em condições de pH alcalino (9 a 10), valores intermediários de atividade de água (0,5 a 0,8) e aquecimento prolongado. É uma reação lenta em temperaturas mais baixas, mas duplica a cada aumento de 10 °C entre 40 °C e 70 °C. Os produtos desta reação contribuem para o aroma, sabor e cor dos alimentos tratados termicamente, sendo eles desejáveis ou indesejáveis (Francisquini *et al.*, 2017)

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade brasileiro para leite condensado (Brasil, 2018a), assim como *Codex Alimentarius* (2018) não estabelecem um valor padrão para adição de açúcar. O teor deve ser o mínimo para manter a qualidade do produto e o máximo para não ocorrer cristalização de sacarose. Na prática industrial o teor de sacarose é de 45% (m/m) para o produto integral. O índice de açúcar (Equação 2) mínimo é de 0,625 não devendo exceder o valor 0,645 (Nieuwenhuijse, 2016; Silva, 2016). Quando utilizado concentração acima de limite superior ocorre cristalização de sacarose e quando abaixo do limite inferior a atividade de água é maior que 0,85 contribuindo para um produto microbiologicamente instável (Massari, 2018).

$$\text{Índice de açúcar} = \frac{\% \text{ sacarose}}{\% \text{ sacarose} + \% \text{ água}} \quad (2)$$

O açúcar deve ter qualidade microbiológica, ao contrário, pode veicular fungos filamentosos e esporos termoresistentes, que podem se manter viáveis durante o tratamento térmico e se desenvolver no produto final (Carvalho *et al.*, 2017).

A adição de sacarose pode ser realizada antes do tratamento térmico ou após a evaporação na forma de xarope (Nieuwenhuijse, 2016). A adição antes do tratamento térmico é a mais utilizada pelas indústrias brasileiras, o que contribui para produção de leite condensado de maior viscosidade e diminui os riscos de contaminação posterior (Massari, 2018; Nieuwenhuijse, 2016).

2.1.5 Evaporação

Na tecnologia de leite condensado, a concentração do leite é comumente realizada em evaporadores a vácuo. Embora fisicamente não estejam em condições reais de vácuo, o termo é amplamente empregado na literatura e entre profissionais

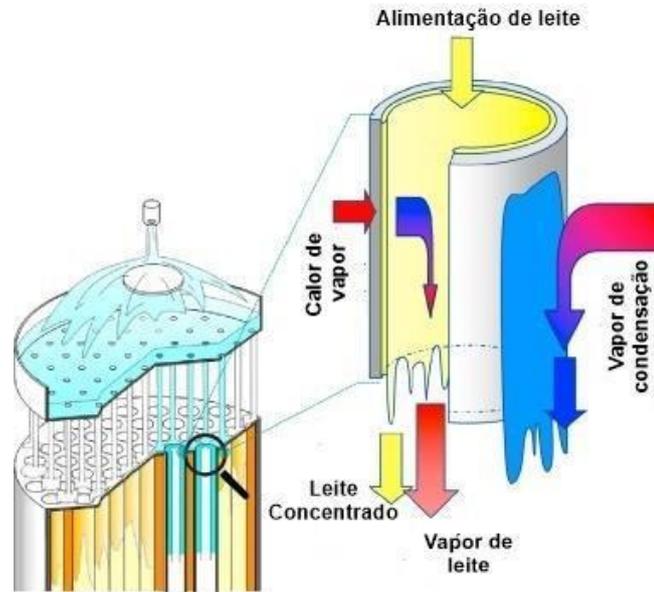
da área. Esta etapa produz o aumento do teor de sólidos, diminuição da atividade de água do produto e favorece a saturação da lactose (Perrone *et al.*, 2017). A concentração também contribuiu para a diminuição do pH, aumento da força iônica, transferência de fosfato de cálcio para fase coloidal e instabilidade de proteínas. Em condições de baixa pressão, a eliminação parcial da água acontece em temperatura inferior à que ocorreria sob pressão atmosférica. A temperatura de evaporação varia de 45 °C a 70 °C prevenindo o excesso de modificações químicas causadas pelo aquecimento (Maurício *et al.*, 2021).

Em uma linha de produção de leite condensado, os principais componentes do evaporador são os trocadores de calor, separador líquido-vapor, sistema de redução da pressão, finalizador, tanque de retenção e sistema de resfriamento (Perrone *et al.*, 2017).

A alimentação do evaporador pode ser realizada com leite ou com mistura do leite adicionado de sacarose (calda) (Nieuwenhuijse, 2016). A evaporação é um processo com alto consumo de energia e muitos esforços têm sido feitos para o reduzir, como o reaproveitamento do vapor e incorporação de outras tecnologias, que diminuem o teor de umidade do produto que chega ao evaporador (Mendes; Furtado; Perrone, 2012; Maurício *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018). Ao final do processo, o teor de sólidos totais deve estar entre 70% a 72% (m/m) (Maurício *et al.*, 2021). O teor de sólidos totais determina o final da evaporação e o estabelecimento de um valor mínimo é importante para o rendimento industrial, eficiência de cristalização da lactose e atividade de água (Renhe *et al.*, 2018).

Na indústria de laticínios, evaporadores tubulares de película descendente com múltiplos efeitos são os mais comuns, pois são fáceis de projetar, têm uma grande área de transferência de calor e produzem um tempo de residência curto (Zhang *et al.*, 2018). Eles possuem um arranjo de casco e tubo. A alimentação acontece pela parte superior e o produto é distribuído por meio de uma placa. Uma fina película de líquido é formada no interior dos tubos verticais aquecidos. O calor é fornecido pelo vapor de condensação na parte externa dos tubos (Figura 4). Por ação da gravidade, o fluxo é direcionado em sentido descendente e a evaporação acontece à medida que o fluido desce pela superfície. O produto condensado e o vapor são separados na parte inferior do evaporador (Gourdon; Mura, 2017; Morison; Broome, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

Figura 4 – Funcionamento básico de evaporador de película descendente



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.*(2018).

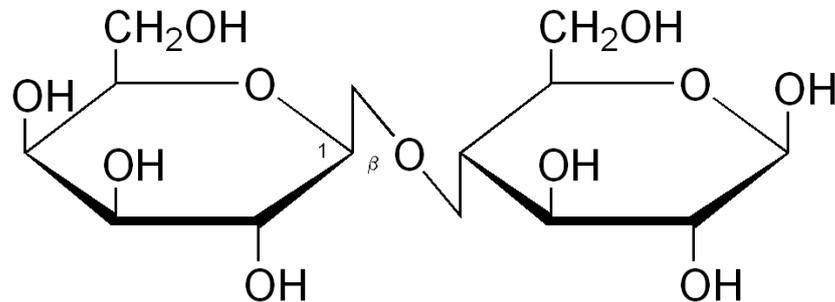
Ao final do último efeito os evaporadores são equipados com um finalizador, que controla o teor final de sólidos. É importante para garantir um fluxo regular no tubo do evaporador, evitar incrustações e baixa transferência de calor (Nieuwenhuijse, 2016).

2.1.6 Resfriamento, cristalização e envase

Após a saída do evaporador, o leite condensado é resfriado entre 20 °C a 28 °C, em sistemas conhecidos como *flash cooler* (Perrone *et al.*, 2017). Com o resfriamento, a cristalização da lactose acontece espontaneamente, devido à alta concentração na solução (maior que 37 g/100 g de água). O teor final de lactose em solução dependerá do teor inicial e da quantidade de água no produto concentrado, mas um leite condensado de ótimos atributos sensoriais é obtido quando o processo de cristalização é controlado (Pereira *et al.*, 2019; Perrone *et al.*, 2017).

A lactose (Figura 5) é umaçúcar naturalmente presente no leite e principal fonte de carboidrato para os recém-nascidos de mamíferos. É um dissacarídeo redutor formado por uma molécula de galactose e glicose em ligação glicosídica β -1,4 (Bryksa; Yada, 2015).

Figura 5 – Representação da molécula de lactose



Fonte: Google Imagens.

A lactose aparece em duas formas isoméricas, α e β -lactose. Os isômeros possuem diferentes propriedades físico-químicas, o que inclui a solubilidade. Em solução, os isômeros α e β -lactose estão em equilíbrio, devido ao processo de mutarrotação. A mistura final tem solubilidade de 21,6g/100g de água, a 25 °C (Santos, 2012; Whittier, 1944). A presença de sacarose em alta concentração contribui para diminuição da solubilidade da lactose e a mutarrotação se torna mais lenta. Nestas condições, a lactose cristaliza para restabelecer o equilíbrio (Nickerson; Moore, 1972; Santos, 2012).

A cristalização ocorre pelo período mínimo de 4 h (Mostaro, 2021) e é definida como a formação de partículas sólidas dentro de uma fase homogênea. A saturação da solução, nucleação primária, nucleação secundária e crescimento do cristal são as principais etapas deste processo. A supersaturação é resultado da adição de soluto, além da capacidade de dissolução do solvente. Em geral, a quantidade de lactose utilizada varia de 0,01% a 0,05% sobre a massa de produto a ser cristalizado (Massari, 2018; Perrone *et al.*, 2017).

A nucleação primária corresponde ao aparecimento dos primeiros cristais e ocorre, espontaneamente, por associação entre as moléculas de soluto, principalmente em regiões de elevada supersaturação, como ao redor das superfícies de resfriamento e nas zonas de ebulição (Perrone *et al.*, 2017). A nucleação secundária, consiste na sementeira de lactose em pó (α -lactose), que induz a formação de novos cristais e aumenta a concentração de núcleos de cristalização por área do produto, o que permite controlar o tamanho dos cristais (Nieuwenhuijse, 2016; Perrone *et al.*, 2017).

A cristalização espontânea sempre leva a formação de cristais grandes, mas a inoculação de núcleos de cristalização (1 μm) evita a formação de cristais perceptíveis ao paladar (maior que 25 μm), que produzem o defeito de arenosidade (Alves *et al.*, 2020; Nieuwenhuijse, 2016). Uma vez que um número suficiente de núcleos se forma, o crescimento é influenciado pela temperatura, agitação, taxa de resfriamento, área disponível para deposição e viscosidade. O aumento da viscosidade diminui a mobilidade dos cristais e retarda a cristalização, formando grandes cristais. A agitação suficiente para manter as partículas em suspensão e maior taxa de resfriamento leva a formação de cristais numerosos, mas de pequeno tamanho. O produto final deve conter cristais abaixo de 16 μm para assegurar a qualidade (Alves *et al.*, 2020; Renhe *et al.*, 2018; Santos, 2012).

O envase deve ser realizado a temperatura de aproximadamente 60 °C, seguido de junção hermética da tampa e armazenamento a temperatura ambiente (Correa *et al.*, 2022). Os sistemas de embalagem assépticos são cada vez mais importantes, mas o envase em lata, não asséptico, ainda é amplamente empregado. De acordo com Silva (2016), as embalagens de lata passam por soprador para retirada de impurezas grosseiras e são esterilizadas a 135 °C. Em seguida, são conduzidas para unidade de enchimento, onde tem contato com o ambiente externo. A descida da tampa estéril é acionada após preenchimento da embalagem, as latas passam por uma corrente de nitrogênio para aumentar o tempo de conservação do produto e, então, são fechadas. Outros recipientes usados incluem tubos plásticos, embalagens cartonadas revestidas de alumínio e tambores de capacidade para até 1000 kg (Nieuwenhuijse, 2016).

2.2 ASPECTOS NORMATIVOS DE LEITE CONDENSADO BRASILEIRO

O leite condensado brasileiro é classificado de acordo com o teor de gordura em: com alto teor de gordura (mín. 16 g/100 g), integral (8 g a 16 g/100 g), semidesnatado (1 g a 8 g/100 g) e desnatado (máx. 1 g/100 g). O leite (fluido, concentrado ou a mistura) e sacarose são os ingredientes obrigatórios, enquanto, creme de leite, gordura anidra de leite, lactose, leite em pó e manteiga são opcionais. A substituição parcial de sacarose por outros açúcares (dissacarídeos e/ou monossacarídeos) é permitida, enquanto, o uso de gordura ou óleo vegetal, amido e maltodextrinas não (Brasil, 2018a).

Nos últimos anos, produtos com proposta similar, que permitem a presença de outros ingredientes, são ofertados com menor custo como, por exemplo, a mistura láctea condensada. A mistura láctea condensada é produzida pela desidratação parcial da mistura de leite, soro de leite e outros derivados do leite, além de conter aditivos como amido de milho, que contribui para a viscosidade (Rosa; Rezende; Pires, 2022). De acordo com o Art. 366 do Decreto nº 9013 de 29 de março de 2017, é admitida a substituição dos constituintes do leite em formulações alternativas, desde que o produto contenha o mínimo de 50% de produtos lácteos ou produtos lácteos compostos e a denominação de venda seja acompanhada da palavra “mistura de (nome do produto lácteo ou produto lácteo composto) e (produto adicionado)” (Brasil, 2017). Trata-se de uma opção de menor custo, mas que tem dividido opiniões dos consumidores quanto à experiência sensorial e similaridade com o leite condensado tradicional (Constantino; Sousa, 2022).

O leite condensado deve ter consistência viscosa e semilíquida, cor branca amarelada, odor e sabor próprio, textura homogênea e sem arenosidade. Os critérios físico-químicos se limitam ao teor de gordura, proteína nos sólidos lácteos não gordurosos e sólidos lácteos não gordurosos. O produto integral deve conter o mínimo de 8% (m/m) de gordura láctea, 28% (m/m) de sólidos lácteos e 34% (m/m) de proteína láctea nos sólidos lácteos não gordurosos. O teor de sacarose não é estabelecido, mas recomenda-se o mínimo para assegurar a qualidade do produto e o máximo para que não ocorra a cristalização do açúcar (Brasil, 2018a). Na prática industrial utiliza-se 45%, valor de referência anteriormente citado pelo Art. 658 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, atualmente revogado (RIISPOA, 1952).

Embora tenha ocorrido uma evolução na tecnologia de produção do leite condensado, as etapas tecnológicas e o açúcar não tornam o produto estéril. Fungos filamentosos (*Aspergillus repens*, *Aspergillus glaucus*, e *Penicillium* spp.), leveduras (*Torulopsis* spp.) e bactérias (*Staphylococcus* spp., e *Micrococcus* osmotolerantes, *Bacillus* spp., *Clostridium butyricum* e *Clostridium perfringens*) são grupos de microrganismos já identificados em leite condensado. Os principais defeitos causados por eles são o estufamento das embalagens pela produção de gás, aparecimento de protuberâncias coloridas e firmes, espessamento, acidificação, odor não característico e sabor indesejável devido à proteólise e lipólise. Além disso, alguns gêneros possuem espécies com potencial patogênico (Carvalho *et al.*, 2017).

Santos *et al* (2009a), ao avaliar os aspectos normativos de leite condensado brasileiro e no mundo, identificou que apenas duas (África Oriental e a Índia) das doze legislações analisadas (Brasil, Austrália, Nova Zelândia, Hong Kong, Estados Unidos, Malawi, Escócia, Índia, África Oriental, Inglaterra, Singapura e União Européia) estabeleciam padrões microbiológicos. No Brasil, esses padrões foram definidos com a aprovação do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RQTI) de leite condensado, em 2018 (Brasil, 2018a). Os autores entenderam que a ausência desses critérios nas demais legislações pode se relacionar com a qualidade da matéria-prima, fabricação em circuito fechado, características de envase e comercialização, enquanto, nas regiões em que os critérios são aderidos, as condições de processamento predis põem o produto a alterações de característica microbiológica (Santos *et al.*, 2009a).

A legislação brasileira estabelece critérios microbiológicos para *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras, em que o limite que separa um produto aceitável do inaceitável é 10^2 UFC/g (Tabela 1). Para um total de 5 unidades (N = 5) recolhidas de um mesmo lote e analisadas individualmente, o número máximo aceitável de unidades com enumeração de microrganismos entre 10 a 10^2 UFC/g é de 2 unidades (c = 2) (Brasil, 2018a).

Tabela 1 – Critérios microbiológicos para leite condensado integral

Microrganismos	Especificação
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	N=5; c=2; m=10; M= 10^2
Contagem de fungos filamentosos e Leveduras UFC/g	N=5; c=2; m=10; M= 10^2

Fonte: Instrução Normativa nº 47, de 26 de Outubro de 2018.

Legenda: N: número de unidades a serem recolhidas de um mesmo lote e analisadas individualmente; c: é o limite máximo aceitável de unidades de amostras com contagem entre os limites m e M; m: limite que, em um plano de 3 classes, separa o produto de aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária; M: é o limite que, em um plano de duas classes, separa o produto de aceitável do inaceitável.

2.2.1 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus é um gênero de bactérias que pertence à família *Staphylococcaceae* e ordem *Bacillales*. São encontrados na pele, glândula e mucosa

de humanos e outros animais (Giri *et al.*, 2021). São aeróbios facultativos e cocos gram positivos, que formam arranjos em cachos de uva. São imóveis, não esporogênicos e, geralmente, catalase positiva e oxidase negativa. Quimiorganotróficos, com metabolismo respiratório e fermentativo de carboidratos (Silva *et al.*, 2017).

O gênero compreende espécies de patógenos oportunistas, que podem causar infecções humanas como lesões cutâneas superficiais, pneumonia, endocardite, meningite e síndrome do choque tóxico através da liberação de toxinas na corrente sanguínea (Pexara *et al.*, 2020). O fator agravante é a prevalência de multirresistência a antimicrobianos entre as estirpes, o que dificulta o tratamento (Nunes *et al.*, 2016).

A produção de coagulase é considerada um fator de patogenicidade entre as espécies, sendo o gênero dividido em dois grupos, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e negativa (SCN) (Silva *et al.*, 2017). *Staphylococcus aureus*, por exemplo, é um SCP responsável por infecções com alta taxa de mortalidade e, frequentemente, associado à intoxicações alimentares, pois é produtor de enterotoxinas (Giri, *et al.*, 2021; Rall *et al.*, 2010). Contudo, foi demonstrado que SCN também podem estar envolvidos em casos similares, visto que podem carregar genes em seu genoma que codificam enterotoxinas (Nunes *et al.*, 2016). As toxinas estafilocócicas podem ter termoestabilidade, o que é preocupante, já que o risco de toxicidade permanece independente da presença de microrganismos viáveis (Kadariya; Smith; Thapaliya, 2014).

Por muitos anos, *S. aureus* foi considerado a única espécie patogênica do gênero, à medida que SCN foram classificados como agentes contaminantes (Nunes *et al.*, 2016). A legislação vigente para leite condensado (Brasil, 2018a) estabelece limite de tolerância para SCP, enquanto, SCN são negligenciados. Todavia, o potencial enterotoxigênico já foi descrito para espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa como *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. schleiferi subsp. schleiferi*, *S. warneri* e *S. xylosus* (Renhe, Perrone; Silva, 2011).

As principais fontes de contaminação no ambiente por esses microrganismos é a água, alimentos crus, poeira, manipuladores e animais. Atenção também deve ser dada à higienização dos equipamentos, pois são microrganismos capazes de aderir às superfícies e formar biofilme. Os biofilmes são fontes contínuas de contaminação, pois aumentam a resistência bacteriana às condições de estresse e à sanitização

permitindo permanência dos microrganismos no ambiente (Abdallah *et al.*, 2014). O leite condensado por ser um produto viscoso e açucarado não é facilmente removido da superfície, sendo assim, falhas higiênico sanitárias podem deixar resíduos que favorecem a adesão bacteriana (Renhe, Perrone; Silva, 2011).

2.3 DEFEITOS TECNOLÓGICOS

A cristalização de lactose, contaminação por fungos e leveduras, precipitação de proteínas e escurecimento, atualmente, são os principais defeitos tecnológicos observados em leite condensado (Correa *et al.*, 2022).

Nos anos de 1920 um defeito, atualmente, pouco descrito era recorrente e uma série de estudos descreveram a tendência do leite condensado de adquirir consistência de gel, que limitava o seu comportamento fluido (Downs, 1925; Felipe; Melcón; Zapico, 1991; Rice; Downs, 1923; Rogers; Dahlberg; Evans, 1920; Samel; Muers, 1962a, 1962b, 1962c; Stebnitz; Sommer, 1935a, 1935b, 1935c; Webb; Hufnagel, 1948). Desde de Felipe, Melcon e Zapico (1991), poucos estudos foram encontrados descrevendo esse defeito, denominado de *espessamento*. Certamente, o conhecimento adquirido da tecnologia de leite condensado e as boas práticas de fabricação contribuíram para sua prevenção. Contudo, ocorrências recentes em indústria brasileira de laticínios, como o caso deste estudo, traz a oportunidade de melhor compreensão do defeito, pela utilização de ferramentas de pesquisa mais modernas.

A mudança do leite condensado de um estado fluido para o comportamento de gel depende da qualidade do leite, das características do processo de fabricação e das condições de armazenamento do produto final (Webb; Rufnagel, 1948). O espessamento tem tanto causas físicas e químicas, quanto microbiológicas. No primeiro caso, é denominado de *espessamento por tempo de permanência ou por calor*, enquanto no segundo de *espessamento microbiano* (Downs, 1925; Rice; Downs, 1923).

2.3.1 Espessamento por tempo de permanência ou por calor

Rogers, Dahlberg e Evans (1920) descreveram a temperatura de armazenamento, a temperatura de pré-aquecimento, o teor de sólidos lácteos não

gordurosos e o teor de fosfato, como principais influências sobre o aumento da viscosidade de leite condensado.

Os experimentos com leite condensado desnatado demonstraram, que quando armazenado por 59 dias em temperatura de 30 °C e 37 °C, a viscosidade atingiu valores de 6,0 e 14,8 vezes superiores, respectivamente (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920). Webb e Hufnagel (1948) encontraram resultados similares para leite condensado armazenado a 37 °C. Em menos de 50 dias a viscosidade atingiu o valor de 600 poise (P). Os mesmos autores descreveram que leite condensado com viscosidade de 600 P a 800 P tem característica de espessamento e já não é considerado adequado para uso.

Uma das preocupações com a temperatura de pré-aquecimento é que fosse suficientemente alta para eliminar microrganismos patogênicos, mas sem causar grande influência sobre a viscosidade (Stebnitz; Sommer, 1935a). Stebnitz e Sommer (1935a) demonstraram que o tratamento térmico em 79 °C a 85 °C/ 10 minutos é satisfatório do ponto de vista do espessamento e até para eliminação de atividade de lipases responsáveis por sabor rançoso. Contudo, o tratamento térmico do leite adicionado de açúcar aumenta a chance espessamento, em comparação, à adição na forma de xarope ao final da evaporação. Dessa forma, uma maneira eficiente de prever o espessamento é por aquecer o leite e o açúcar, separadamente, e realizar a mistura (leite + xarope) antes da condensação.

A concentração de sólidos lácteos não gordurosos combinada com a temperatura de pré-aquecimento, também tem um efeito relevante sobre a viscosidade, que aumentou 3,75, 8,3 e 24,7 vezes, ao final de 24 dias, para leite condensado pré-aquecido a 80 °C com 24%, 26% e 28% de sólidos, respectivamente. Para os mesmos teores de sólidos lácteos, mas em leite pré-aquecido a 60 °C não houve mudança significativa (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920).

O espessamento por tempo de permanência foi relatado como tendo prevalência entre o final da primavera e início do verão, o que coincidia com período de maior instabilidade do leite, provavelmente relacionado às alterações na composição (Stebnitz; Sommer, 1935b). A gordura, lactose e sacarose são os componentes do leite com pouco efeito sobre a viscosidade, enquanto as proteínas e os sais provocam alterações mais relevantes (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920).

Rogers, Dahlberg e Evans (1920) demonstraram um rápido aumento de viscosidade em leite condensado desnatado aquecido a 96 °C. Em sete dias, houve

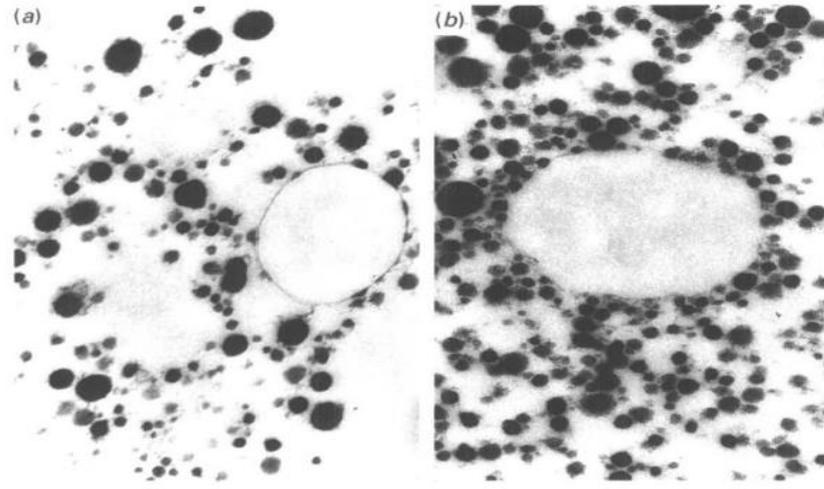
um aumento de 7,2 vezes. Ao comparar com a amostra submetida às mesmas condições, mas com remoção de caseína, a viscosidade aumentou lentamente (1,3 vezes) dentro do mesmo período. A amostra que teve tanto a remoção de caseína, quanto de albumina, manteve o baixo valor de viscosidade ao final de 32 dias.

Experimentos realizados com leite e soro de leite condensado visavam demonstrar qual das frações proteicas mais contribuíam para o espessamento. Soro de leite condensado não apresentou alterações de viscosidade ao longo do tempo, apresentando aumento de 4 P em período superior de 13 dias enquanto, a viscosidade de leite condensado aumentou para 1140 P em 3 dias. Os resultados levaram à conclusão, que a caseína tem efeito predominante no espessamento de leite condensado, em comparação às proteínas do soro (Samel; Muers, 1962c).

Samel e Muers (1962a) sugeriram que o espessamento por tempo de permanência se deve a interligação de micelas de caseína formando uma rede de agregados proteicos, que aumentam a viscosidade. Embora interpretaram que as proteínas do soro, em associação com a caseína, não desempenham um papel significativo no espessamento, Felipe, Melcon e Zapico (1991) ao descrever os aspectos das micelas de caseína em amostras com espessamento por tempo de permanência, observaram um contorno irregular. Característica similar foi encontrada em leite tratado termicamente (90 °C/ 10 min ou autoclavados a 121 °C /15 min). As proteínas do soro desnaturadas se agregam à superfície das micelas, levando, Felipe, Melcon e Zapico (1991) a concordar que as proteínas de soro poderiam estimular o desenvolvimento de estruturas que favorecem a agregação micelar e, conseqüentemente, o espessamento.

O papel do tamanho das micelas de caseína na consistência do produto, em amostras estocadas a 37 °C por 45 dias, foi examinado por microscopia eletrônica. Ao final desse período, amostras envelhecidas tinham mais agregados de caseína (Figura 6) (Felipe; Melcon; Zapico, 1991). A observação justificaria a maior taxa de sedimentação de caseína para leite condensado envelhecido, devido ao aumento do tamanho das partículas (Samel; Muers, 1962c).

Figura 6 – Microscopia eletrônica de amostra de leite condensado a) antes e b) depois de armazenado por 45 dias a 37 °C



Fonte: Felipe, Melcon e Zapico (1991).

Legenda: Agregação de caseína ao longo do tempo de armazenamento.

O estudo de Stebnitz e Sommer (1935c) sobre a influência dos sais demonstrou que a adição de fosfato dissódico, antes ou depois da condensação, aumenta a tendência de espessamento. Dentro do período de 4 a 6 dias a viscosidade atingiu valores impossíveis de mensurar, devido às limitações do instrumento para medidas superiores a 1100 P. Os resultados concordam com o estudo preliminar de Rogers, Dahlberg e Evans (1920) para o efeito dos fosfatos.

O acetato de cálcio e citrato de sódio também demonstraram contribuir para o aumento da viscosidade. O acetato de sódio produziu espessamento em 4 dias impossibilitando a medida de viscosidade, enquanto o citrato de sódio aumentou a viscosidade em até 72 vezes ao final de 21 dias. Estes dois sais demonstraram efeito controverso para algumas condições, levando os autores a concluir, que a influência dos sais sobre o espessamento depende da concentração, estabilidade do leite, etapa de adição e temperatura de pré-aquecimento (Stebnitz; Sommer, 1935c).

Na avaliação do efeito de ânions e cátions adicionados em leite antes do pré-aquecimento, observou-se que os ânions aumentam a prevalência de espessamento por tempo de permanência e a ação desestabilizadora é maior com o aumento da valência. A tendência ao espessamento pela ação de ânions polivalentes pode estar relacionada à provável formação de pontes entre átomos de cálcio, que estão

presentes na estrutura da micela, facilitando a agregação proteica (Samel; Muers, 1962b).

2.3.2 Espessamento microbiano

O espessamento por tempo de permanência foi foco de várias pesquisas entre 1920 e 1991, diferente do espessamento microbiano limitado a dois estudos (Downs, 1925; Rice; Downs, 1923) citados nesse trabalho. Provavelmente, os vários fatores envolvidos no espessamento por tempo de permanência e a interação entre eles trouxe a necessidade de mais pesquisas, enquanto as limitações tecnológicas da época impediam que o mesmo pudesse ser realizado na caracterização e identificação de microrganismos espessantes.

Os espessamentos por tempo de permanência e microbiano têm características distintas. O espessamento por tempo de permanência mantém as características de sabor e odor, enquanto, o espessamento microbiano é acompanhado de grande aumento de acidez, odor incomum, gosto desagradável e formação de coalhada ao ser diluído em água e aquecido. Para leite condensado normal, o valor de acidez compreende valores de 0,23% a 0,33% em ácido láctico, em contrapartida, amostras espessadas podem atingir valor superior a 0,75% (Rice; Downs, 1923).

Webb e Hufnagel (1948) relataram uma característica incomum em amostras com espessamento por tempo de permanência. Após incubadas por 640 dias, em três diferentes temperaturas, foi observado um aumento da acidez. Os testes, ao final do período de armazenamento, foram negativos para presença de microrganismos. Aparentemente a alteração da acidez não foi causada por crescimento bacteriano, embora não tenha sido demonstrado que os organismos estavam ausentes durante todo o período de armazenamento.

Assim como no espessamento por tempo de permanência, o espessamento microbiano era um problema de ocorrência no final da primavera, no início do verão e ao ser comercializado em regiões de clima tropical. A contagem microbiana em amostras espessadas foi descrita como significativamente alta, muitas vezes superior que 10^6 células/g. A morfologia dos microrganismos era predominantemente de cocos. Em geral, no leite condensado de boa qualidade o número de bactérias era considerado relativamente baixo (10^2 células/g) e microrganismos patogênicos quase sempre ausentes (Rice; Downs, 1923).

Para fins de estudos, quando estirpes padrões de bactérias foram inoculadas no produto, não tinham capacidade de crescimento e a contagem diminuía com o tempo. Aparentemente, um grupo limitado tolera as condições presentes em leite condensado. Fungos filamentosos e leveduras foram os principais microrganismos relacionados a defeitos em leite condensado (Rice; Downs, 1923). Os “botões de mofo”, por exemplo, eram massas coaguladas, marrom-avermelhadas, de bordas regulares e tamanho variável de 0,6 a 2,0 cm. Eles possuem consistência firme e são formados pelo endurecimento da caseína, provavelmente por ação enzimática de fungos como *Aspergillus repens*. O defeito não afetava o aroma e valor alimentício do produto, mas a aparência era desagradável e causava rejeição pelo consumidor (Rogers; Dahlberg; Evan, 1920).

Um total de quatro experimentos realizados por Rice e Downs (1923) demonstraram que os sólidos lácteos não interferem no crescimento de microrganismos espessantes e que a proporção de sacarose é o fator que mais influencia. Em vista disso, a alta concentração de sacarose tem sido utilizada como medida preventiva para crescimento de bactérias, mas fungos filamentosos e leveduras são capazes de crescer em meio de elevada pressão osmótica e baixa atividade de água, sendo necessárias outras medidas de contenção para esses grupos (Rice; Downs, 1923; Rogers; Dahlberg; Evan, 1920).

Para índice de açúcar (Equação 2) inferior a 0,6150 há maior chance de crescimento e de atividade microbiana. O espessamento foi interrompido para valores de 0,6277 e 0,6312 e, em alguns casos, concentrações maiores (0,6418 e 0,6453) foram necessárias. O índice de sacarose deve ser alto como 0,6450 para prevenir o crescimento de microrganismos espessantes (Rice; Downs, 1923).

No século XIX, uma grande parte do mercado padronizava o índice de sacarose abaixo do considerado seguro e nem sempre o produto se tornava defeituoso, ainda que, os microrganismos estivessem presentes. Durante o inverno não se desenvolvia espessamento, mas ao serem incubadas, logo, a característica era desenvolvida (Downs, 1925). A observação explicaria a maior frequência de ocorrências em climas tropicais ou estações do ano mais quentes, em que facilmente poderia se alcançar a temperatura ótima de 30 °C (Rice; Downs, 1923).

O baixo índice de sacarose, devido à maior disponibilidade de água, também reflete no tempo em que o espessamento ocorre. Amostras com 40% a 35% de teor

de umidade desenvolveram espessamento após 2 semanas (14 dias), 30% em 3 semanas (21 dias) e 27% em 8 semanas (56 dias) (Downs, 1925).

Downs (1925) distinguiu duas variedades de microrganismos espessantes, A e B. Ambos grupos são cocos gram positivos, de 0,4 a 0,5 μm de diâmetro com temperatura ótima de crescimento em 30 °C e um ligeiro crescimento entre 20 °C e 37 °C. Em ágar, as colônias são circulares, tem diâmetro de 0,75 a 1,5 mm, superfície lisa e elevação convexa. As bordas podem ser chanfradas e, às vezes, o centro está deprimido. A variedade "A" possui cor translúcida ao branco pálido, produz ácido pela fermentação de sacarose e lactose, reduz nitratos para nitritos e não tolera 64 °C / 10 min. A variedade "B" em alguns casos tem pigmento amarelo, produz ácido pela fermentação de sacarose, mas não fermenta lactose e nem reduz nitratos. Os autores sugeriram que as duas variedades eram similares a *Staphylococcus pyogenes albus* e *Micrococcus lactis*, respectivamente. A variedade "A" pôde ser isolada em leite condensado espessado, do ambiente da fábrica, do leite com pó e do ar, enquanto a variedade "B" predominava em leite condensado (Downs, 1925).

Em amostras espessadas as bactérias em forma de cocos demonstraram capacidade de destruir e inverter a sacarose (glicose + frutose), o que foi constatado pela diminuição da sua concentração e aumento aparente da concentração de lactose, quantificada por métodos de redução (Rice; Downs, 1923). Entretanto, a produção de ácido não necessariamente foi responsável pelo espessamento. Amostras espessadas foram caracterizadas com um aumento de acidez (mín. 0,40 % e máx. 1,05 % em ácido láctico), o que é um indicador de atividade microbiana, mas nem toda amostra com aumento de acidez apresentou características de espessamento (máx. 0,77 % em ácido láctico).

Alguns microrganismos produziram alta acidez em leite condensado, mas que não espessou. Por outro lado, microrganismos incapazes de fermentar sacarose ou lactose produziram espessamento em leite condensado e uma coalhada em testes realizados em leite, o que indica que o espessamento deve ser causado por outros fatores, como a ação de uma enzima tipo renina (Downs, 1925).

3 OBJETIVO

Caracterizar leite condensado integral com defeito tecnológico de espessamento e investigar as suas prováveis causas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o leite condensado com defeito de espessamento quanto aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos;

Isolar, identificar e caracterizar os microrganismos das amostras de leite condensado com defeito de espessamento;

Investigar a relação entre o espessamento do leite condensado e a atividade microbiana ao longo do tempo de armazenamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite condensado integral armazenadas em temperatura ambiente foram submetidas a caracterização física, química e microbiológica. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Alimentos e Águas (LAAA), Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA), Química e Tecnologia (QUIMTEC), Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), campus Juiz de Fora, Laboratório de Química, Física e Fluidos, campus Governador Valadares e Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.1 AMOSTRAS

Amostras de leite condensado integral foram fornecidas por uma indústria de laticínios brasileira e classificadas como lotes padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP). O lote padrão atende aos critérios de identidade e qualidade de leite condensado, enquanto o lote fora de padrão não tem consistência semilíquida. O leite condensado padrão foi utilizado como controle nos ensaios. As amostras foram obtidas de lotes produzidos no mesmo dia e utilizadas quatro repetições para cada grupo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

As amostras foram analisadas, para os seguintes atributos: pH, acidez, teor de umidade (U), sólidos totais (ST), sólidos solúveis (SS), atividade de água (A_w), gordura (G), perfil de bandas de proteína, atividade de protease, microscopia, distribuição de partículas, colorimetria, 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L) e reologia.

4.2.1 pH e acidez

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado em pHmetro previamente calibrado com soluções tampões de pH 7 e 4. O eletrodo foi inserido diretamente na amostra para aferição das medidas.

A acidez titulável foi determinada por volumetria, de acordo com os métodos analíticos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Em 50 mL de água morna (aproximadamente 50 °C) foram diluídas 5 g de amostra. Após atingir a temperatura ambiente, a solução

foi titulada com solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L, utilizando solução alcoólica de fenolftaleína (1%) como indicador.

A acidez em ácido láctico foi determinada, conforme a Equação 3.

$$\%Acidez \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad (3)$$

Em que, V , é o volume (mL) gasto de solução NaOH 0,1 mol/L; f o fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L; m a massa de amostra utilizada no ensaio (g); e 0,9 o fator de conversão para ácido láctico. A acidez foi expressa em g de ácido láctico/100 g.

4.2.2 Teor de umidade, sólidos totais, sólidos solúveis e atividade de água

O teor de umidade e sólidos totais foram determinados por método gravimétrico (ISO 6734 | IDF15: 2010) com poucas alterações. O conjunto cápsula de alumínio com bastão de vidro e areia do mar purificada foi mantido em estufa, entre 100 °C a 105 °C por 1 hora (h). Após esfriar em dessecador, 3 g de amostra foi adicionada ao conjunto. A mistura do leite condensado com areia foi facilitada pela adição de, aproximadamente, 3 mL de água destilada. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar, entre 100 °C a 105 °C por tempo inicial de 4 h. As amostras esfriaram em dessecador e foram pesadas. O procedimento foi repetido até que a diferença, de duas pesagens consecutivas, fosse menor ou igual a 0,0005 g. O teor de umidade (U) e teor de sólidos totais (ST) foi determinado, conforme Equação 4 e 5, respectivamente.

$$U \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \quad (4)$$

$$ST \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{P_f - T}{P_i - T} \quad (5)$$

Em que, m_2 , é perda de massa (g), obtida pela diferença entre a massa inicial de amostra adicionada do peso da cápsula, e a pesagem final; m_1 é a massa da amostra (g); P_f é o resultado da última pesagem (g); P_i é o resultado da pesagem inicial após adição de amostra (g); T é a tara da cápsula com areia e bastão de vidro (g). Os resultados foram expressos em g/100 g.

A atividade de água (A_w) foi medida a 25 °C, utilizando analisador digital 4TE (Aqualab, Decagon Devices Inc., USA). As amostras foram homogeneizadas, distribuídas em uma cápsula e inserida na câmara do equipamento.

Os sólidos solúveis foram determinados com a utilização de um refratômetro digital (Reichert, modelo AR200). Uma porção da amostra foi adicionada diretamente sobre o prisma cobrindo toda a superfície. A leitura foi feita diretamente do instrumento de medida em Grau Brix (°Bx).

4.2.3 Gordura

A determinação de gordura foi realizada, em triplicata, pelo método de Gerber (ISO 19662 | IDF 238:2018) adaptado. O método consiste no tratamento da amostra com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e álcool isoamílico. Uma solução de análise foi preparada pela diluição de 20 g de leite condensado em 100 mL (1:5) de água destilada morna (40 °C \pm 2 °C). Em um butirômetro Gerber para leite foram adicionados 10 mL de H_2SO_4 ($d_{20\text{ °C}} = 1,825\text{ g/L}$). Em seguida, cuidadosamente, transferidos pela parede do butirômetro 11 mL da solução de análise (a 25°C) e 1 mL de álcool isoamílico ($d_{20\text{ °C}} = 811\text{ g/L}$) formando duas camadas acima do ácido. O gargalo foi limpo com papel, vedado e envolvido por uma toalha, pois a mistura libera calor. Posteriormente, foi vigorosamente agitado até a ausência de partículas. Uma centrífuga para butirômetro (ITR, 8BT) foi utilizada para centrifugar o conjunto (butirômetro + solução) por 15 min. O conjunto foi transferido para banho-maria (65 °C \pm 1 °C/ 10 minutos), mantendo a tampa virada para baixo. Quando necessário, a tampa do butirômetro foi ajustada para alinhar a coluna de gordura à linha de graduação do instrumento. A leitura foi realizada diretamente na escala do butirômetro e o teor de gordura (G) obtido pela seguinte relação:

$$G \left(\frac{m}{m} \right) = L \times D \quad (6)$$

Em que L representa o teor de gordura lido na escala do butirômetro e D o fator de diluição da solução de análise ($D = 5$). Os resultados foram expressos em g/100 g.

4.2.4 Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

A proteólise em leite condensado foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O preparo das amostras foi realizado de acordo com Veloso, Teixeira, Ferreira (2002), com poucas alterações. As amostras de leite condensado integral foram diluídas em água destilada (1:5) e centrifugadas a 700 g, a 4 °C, por 10 min para separação de gordura. A caseína foi precipitada por adição de tampão acetato de amônia 1 mol/L pH 4,3. As amostras acidificadas foram centrifugadas a 3000 g, a 20 °C, por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de amônia 0,1 mol/L pH 4,3, centrifugado a 3000 g, a 20 °C, por 10 min. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Para eliminar a gordura remanescente, o precipitado foi lavado com acetona e deixado secar a temperatura ambiente. A caseína precipitada foi armazenada a 8 °C, até o uso.

A caseína precipitada das amostras foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. As amostras foram vigorosamente agitadas e mantidas em banho ultrassônico até a dissolução total. Em seguida, centrifugadas a 3000 g, a 4 °C, por 10 min para remoção de partículas em suspensão. A concentração de proteína na amostra foi determinada por método de Lowry, utilizando albumina sérica bovina 0,1% (Sigma-Aldrich) na elaboração da curva padrão (7,7 µg/mL a 77 µg/mL) (Lowry *et al.*, 1970).

A SDS-PAGE foi realizada em cuba vertical Mini-Protean Tetra (Biorad), conforme orientação do fabricante. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra 2X (Laemmli 2x: 62,5 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol; adicionado de 5% β-mercaptoetanol) e, em seguida, aquecidas a 100 °C por 5 min. O total de 20 µg de proteína foi aplicado em gel de poliacrilamida a 4% para empilhamento e gel de poliacrilamida a 15% para separação das proteínas, ambos contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). Os géis foram polimerizados pela adição de 0,05% (v/v) de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 0,25% e 0,5% de persulfato de amônia a 10% para o gel de empilhamento e para o gel de separação, respectivamente. O tampão de corrida utilizado foi Tris/Glicina/SDS 1X, pH 8,3 (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L de glicina, 0,1% SDS). A caseína (Merck), a albumina (Sigma-Aldrich) e padrões de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards - Biorad) foram aplicados no gel para comparação dos resultados.

A corrida foi executada em 100 V até a frente do corante atingir a parte inferior do gel. Posteriormente, o gel foi corado por 16 h, à temperatura ambiente, com solução de azul brilhante Coomassie R a 0,03% em metanol (200 mL): ácido acético (35 mL) : água (500 mL). A descoloração foi realizada, em solução de metanol (200 mL) : ácido acético (50 mL): água (500 mL) até obter contraste adequado. Os perfis foram visualizados sob luz branca em fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) e processado por software ImageLab™ v.6.0 (Bio-Rad).

4.2.5 Atividade de protease

A atividade de protease foi avaliada utilizando azocaseína como substrato (Ewings; O'connor; Mitchell, 1984). Leite condensado diluído (1:5) foi centrifugado a 3000 g por 20 minutos. A camada de gordura foi removida e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo contendo 0,5 mL de azocaseína 0,5% e 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,5. A mistura foi incubada a 37 °C /4 h em banho-maria. Posteriormente, adicionado 0,9 mL de ácido tricloroacético – TCA - (10%) e os tubos transferidos para banho de gelo por 15 minutos. Após resfriamento, foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante, medida em espectrofotômetro a 366 nm, em triplicata. Leituras de absorbância das amostras sem incubação (37 °C/ 4 h) foram utilizadas como branco e descontadas nas leituras espectrofotométricas de cada amostra correspondente. Os resultados foram obtidos pela Equação 7.

$$Atividade(UP) = \frac{A_a - A_b}{t \times 0,01} \quad (7)$$

Em que A_a é a absorbância da amostra, A_b a absorbância do branco correspondente à amostra, t é o tempo de incubação em horas (h) e 0,01 o fator de conversão de absorbância/hora para cada unidade de atividade enzimática proteolítica ($1UP = 0,01 \frac{A}{h}$) (Pinto, 2004).

4.2.6 Microscopia

As amostras foram homogeneizadas e aproximadamente 3 mg de leite condensado foi colocado sobre uma lâmina para microscópio. O centro da lamínula foi colocado sobre a amostra e uma leve pressão foi exercida (Hough; Martinez; Contarini, 1990). As amostras foram visualizadas com auxílio de lente objetiva de 40x,

em microscópio óptico (B3 série - Medilux) com câmera acoplada. No total, seis micrografias foram obtidas para cada amostra (2 lâminas x 3 campos por lâmina). As imagens obtidas foram utilizadas para comparação qualitativa do tamanho dos cristais de lactose.

4.2.7 Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição do tamanho de partículas foi realizada conforme descrito por Pereira *et al.* (2019), com algumas alterações. As medidas foram obtidas em analisador de partículas por difração a laser LS 13 320 (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA) com módulo líquido acoplado. No módulo líquido foi utilizado água, em temperatura ambiente, para dissolução das amostras. A adição de amostra foi realizada gradativamente até grau de obscurecimento correspondente a $47 \pm 5\%$ PIDS (*Polarization Intensity Differential Scattering System*). Os dados foram coletados a cada 90 segundos, sendo realizada três medições consecutivas para cada duplicata. Os resultados foram apresentados pelo volume (%) ocupado pelas partículas em função do seu diâmetro (μm). O percentual de partículas com diâmetro abaixo de 1 micrômetro ($<1 \mu\text{m}$) e o diâmetro de noventa por cento das partículas ($d_{90\%}$) também foram utilizados para interpretação dos resultados.

4.2.8 Colorimetria e 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L)

O perfil colorimétrico foi obtido através de colorímetro CR-400 Crhoma Meter (Konica Minolta Sensing Americas) por leitura da reflectância das coordenadas de luminosidade (L^*), coordenada cromática a^* (a^*) e coordenada cromática b^* (b^*). As amostras foram distribuídas em uma superfície de fundo branco cobrindo-o completamente. O colorímetro foi posicionado perpendicularmente às amostras, conforme recomendação do fabricante. Dentre as coordenadas fornecidas pelo equipamento foram considerados os parâmetros do sistema de escala de cor CIE $L^* a^* b^*$, o mais utilizado para avaliação da cor, em que L^* assume valores no intervalo 0 (preto absoluto) a 100 (branco total), a^* representa as cores verde-vermelha ($-a^*$; $+a^*$) e b^* as cores azul-amarelo ($-b^*$, $+b^*$). O índice de brancura (Wh) foi calculado, conforme Equação 8 (Lohman; Hartel, 1994).

$$Wh = 100 - \sqrt{[(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]} \quad (8)$$

A determinação de 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L) foi realizada por espectrofotometria (Keeney; Bassette, 1959). O HMF_L representa o teor de HMF presente na amostra, enquanto o HMF total indicaria a capacidade máxima de sua formação no alimento. A massa de 10 g da amostra foi misturada a 5 mL de ácido oxálico 0,3 mol/L. A desproteíntização da amostra ocorreu por adição de 5 mL de ácido tricloroacético 40% (m/v) e, em seguida, a solução foi filtrada. O ácido tiobarbitúrico 0,05 mol/L, um reagente cromogênico, foi adicionado a 4 mL do filtrado na proporção de 1:1. As amostras foram levadas ao banho-maria a 40 °C por 30 min e resfriadas até temperatura ambiente para leitura espectrofotométrica, em λ 443 nm. A concentração de HMF_L ($\mu\text{mol/g}$) foi calculada através da construção de uma curva analítica (Equação 9), utilizando HMF padrão em diferentes concentrações.

$$HMF_L = 187,73x + 1,89 \quad (9)$$

Em que x corresponde a absorbância da amostra.

4.2.9 Reologia

O comportamento reológico foi determinado a 25 °C por método oscilatório, em Reômetro Dinâmico Híbrido DHR1 da T.A. Instruments®, equipado com geometria placa-placa (PP25/S-SN 15782; gap de 1,0 mm), com controle de temperatura através da placa com sistema Peltier (25,00 \pm 0,02 °C).

Foram realizados três tipos de experimentos: oscilação de amplitude, com frequência constante, oscilação de frequência, com amplitude constante e varredura de temperatura. A primeira sequência de experimentos ocorreu com varreduras crescentes de amplitude de deformação na faixa entre 0,1 e 100%, na frequência angular constante de 1 Hz, mantendo a temperatura fixa em 25 °C para se determinar a região de viscoelasticidade linear (LVE), ou seja, limite de amplitude de deformação na qual a estrutura do fluido é preservada.

A segunda sequência de experimentos ocorreu com varredura de frequência, ao longo do intervalo de 0,1 e 100 Hz, a uma amplitude de deformação fixa em 1 % dentro da LVE, para se observar o efeito da frequência externa na estrutura molecular.

Finalmente, foi realizado um experimento de temperatura, de 10 a 80 °C, numa taxa de aquecimento de 10 °C/s, a uma frequência de 1 Hz e deformação de 1%, para verificar o efeito da temperatura na estrutura de interações intermoleculares do fluido.

O módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G''), tangente de delta δ (G''/G') e viscosidade complexa (η^*) foram os parâmetros utilizados para caracterizar o comportamento das amostras. Os dados foram coletados utilizando o software TRIO v 5.1.1 (TA Instruments) e os gráficos gerados no OriginPro v.2022b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As amostras foram avaliadas para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, fungos filamentosos e leveduras. Os isolados selecionados foram caracterizados por métodos bioquímicos e distintos por métodos moleculares (rep-PCR) e espectrométricos (MALDI-TOF).

4.3.1 Isolamento dos microrganismos

As análises microbiológicas foram realizadas para quatro grupos de microrganismos, de acordo com a metodologia recomendada pela *American Public Health Association* (APHA) e *International Organization for Standardization* (ISO), descritas por Silva *et al.* (2017). Foi utilizada a técnica de contagem padrão em placas para microrganismos aeróbios mesófilos (APHA 08:2015), *Staphylococcus* coagulase positiva (ISO:6888-1:1999/Amd 1:2003) e fungos filamentosos e leveduras (APHA 21:2015), pois fazem parte dos requisitos microbiológicos do regulamento técnico de leite condensado (Brasil, 2018).

As embalagens foram sanitizadas em gaze estéril embebida em álcool 70 °GL, e, assepticamente, 25 g de cada amostra foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}). As diluições decimais seguintes (10^{-2} e 10^{-3}) foram realizadas em tubos contendo 9 mL do mesmo diluente. Para cada uma das diluições correspondentes, foram feitas análises em duplicata.

A contagem dos grupos microbianos foi realizada por plaqueamento em superfície, com inoculação de 0,1 mL de cada diluição. Para contagem de aeróbios mesófilos foram utilizadas placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubadas a 32 ± 1 °C/ 48 ± 2 h. A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi realizada em Ágar Batata Dextrose (PDA) acidificado com ácido tartárico 10% até pH 3,5, seguida de incubação a 25 °C/5 dias. Para *Staphylococcus* coagulase positiva foram utilizadas placas de Ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio 1% (1mL/100

mL de meio) e emulsão de gema de ovo (5 mL/100 mL de meio). As placas foram incubadas 35 ± 1 °C/ 48 ± 2 h. Colônias típicas (pretas ou cinzas, brilhantes, convexas, 1,5 a 2,5 mm de diâmetro, rodeadas por halo claro transparente) e atípicas (cinzentas sem halo claro ou pretas brilhantes, com ou sem células esbranquiçadas na borda, com halo transparente pouco visível ou ausente e anel opaco também pouco visível) foram selecionadas para teste de coagulase. Em todas as análises as placas foram invertidas durante a incubação.

Colônias bacterianas e leveduriformes fenotipicamente distintas foram selecionadas de PCA, PDA, BP, por amostra. As colônias foram estriadas em ágar infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 35 °C/24 h, em seguida, foram preservadas por congelamento a -18 °C, em uma mistura estéril de caldo BHI e glicerol 50%(v/v).

4.3.2 rep-PCR

A reação em cadeia da polimerase em sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (rep-PCR) foi realizado com objetivo de distinguir qualitativamente os clones isolados, com base na geração de um perfil genético exclusivo de cada microrganismo (*fingerprint*). A análise foi realizada para um total de 13 isolados bacterianos selecionados e fenotipicamente distintos, por amostra (Total por agrupamento: LCFP: 6 isolados, LCP: 7 isolados). Os isolados congelados foram repicados, pelo menos duas vezes, em BHI a 30 °C/24 h para reativação e confirmação da pureza.

A metodologia utilizada foi descrita por Švec *et al.* (2010), com algumas alterações. O DNA genômico total foi obtido por extração alcalina: 6 colônias foram homogeneizadas em 40 µL de solução de lise (0,25% SDS, 0,05 mol/L NaOH) e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. O lisado de células foi diluído em 360 µL de água ultrapura estéril e centrifugado a 15.493 g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e mantido a -18 °C.

O DNA foi amplificado utilizando *primer* (GTG)₅: 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'. A reação de PCR consistiu na adição de 1 µL de lisado de células à 24 µL de uma mistura contendo: 2 µmol/L do primer (GTG)₅, 200 µmol/L de cada dNTP (Uniscience), 2 U de *Taq* DNA polimerase (Easy), 2,5 µL de Tampão de reação Easy 10x (100 mmol/L Tris-HCl pH 8,5, 500 mmol/L KCl), 2 mmol/L de MgCl₂ (Easy) e água

ultrapura para completar o volume. Uma reação sem presença de DNA molde foi utilizada como controle negativo.

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp™ (ThermoFisher, PCR System 9700). A desnaturação inicial (95 °C por 15 min), foi seguida por 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 30 segundos), anelamento do primer (40 °C por 1 min) e extensão (65 °C por 8 min). O último ciclo foi seguido de uma etapa de extensão final (65 °C por 10 min). O produto PCR foi mantido em banho de gelo, para posterior aplicação no gel.

O volume de 10 µL de produto PCR foi misturado com aproximadamente 3 µL de tampão de carregamento da amostra 5x Green Gotaq® Flexi (Promega) e aplicado em gel de agarose a 1,5% (p/v) (13 x 14 cm). A separação dos fragmentos de DNA foi realizada em cuba horizontal (Loccus Biotecnologia), por 2 h a 100V (5 V/cm), em tampão Tris/borato/EDTA 1X pH 8,3 (TBE 10X: 0,9 mol/L Tris base, 0,9 mol/L de ácido bórico, 4% de EDTA 0,5 mol/L pH 8) utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) (Biolabs, New England, USA) e 1 kb (Promega), para posterior normalização da imagem do gel.

O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 1 h. A descoloração foi realizada em água destilada, pelo mesmo período. Os perfis foram visualizados sob luz UV a 302 nm em fotodocumentador Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad) e processado por software ImageLab™ v.6.0 (Bio-Rad). A similaridade e a relação entre os isolados foram avaliadas pela construção de um dendrograma, utilizando as distâncias de Jaccard com tolerância de 2% e método de agrupamento de pares com média aritmética não ponderada (UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean), em software Bionumerics v.6.6.11 (Applied Maths, Bélgica).

A manutenção dos isolados geneticamente distintos foi feita em Ágar Trypticase de Soja (TSA), sob refrigeração a 8 °C, com subcultivo a cada 15 dias.

4.3.3 Identificação dos microrganismos por métodos bioquímicos

O total de 12 isolados bacterianos foram utilizados para caracterização e estudos adicionais.

4.3.3.1 Coloração de Gram

Um esfregaço foi preparado a partir de cultura em meio sólido. Uma gota de solução salina estéril (NaCl 0,85%) foi colocada no centro de uma lâmina limpa e

desengordurada. A alçada de uma colônia foi emulsionada na gota, seca ao ar e fixada na chama de um bico de Bunsen. Posteriormente, foram adicionadas duas gotas de cristal violeta sobre a lâmina, por um minuto. A lâmina foi lavada em água corrente e, em seguida, adicionadas duas gotas de Lugol, por um minuto. O lugol foi removido por gotejamento de solução acetona: etanol (1:1), por 15 segundos. A lâmina foi lavada em água corrente e coberta com solução fucsina, deixando atuar por 30 segundos. Em seguida, novamente lavada em água corrente, deixada secar na posição vertical e observada ao microscópio óptico usando objetiva de imersão (100x) (MS, 1997).

4.3.3.2 *Catalase*

As colônias foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio 10 V sobre a colônia. A prova foi considerada positiva quando houve a formação imediata e constante de bolhas, ao contrário, considerada negativa (Midigan *et al.*, 2016).

4.3.3.3 *Oxidação-Fermentação da Glicose (OF)*

Um teste de oxidação-fermentação modificado por Baker (1984) foi utilizado para avaliar a capacidade dos isolados de fermentar glicose. Com uma agulha de repique, meio Ágar OF Glicose foi inoculado três vezes sucessivas, até dois terços da altura. O volume de aproximadamente 1 mL de vaselina líquida foi adicionado formando uma camada superior. Os tubos foram incubados a 35 °C/48 h. A fermentação foi considerada positiva pela alteração da cor do meio de verde para amarela.

4.3.3.4 *Suscetibilidade a antimicrobianos*

O teste de suscetibilidade foi realizado usando disco de difusão de furazolidona e bacitracina, em Ágar Müller-Hinton. As suspensões microbianas foram padronizadas para 0,5 na escala de McFarland e semeadas em placas com auxílio de swab. Os discos foram inseridos na superfície com uma pinça estéril e as placas foram incubadas a 35 °C/24 h. Os isolados foram classificados como suscetível (S) ou resistente (R), de acordo com formação ou não de zonas de inibição (Baker, 1984).

4.3.3.5 Teste de Coagulase

Cada colônia foi transferida para tubo com 3 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubadas 35 °C /24 h. O volume de 0,5 mL de cada cultura obtida em BH, foi transferida para um tubo estéril (10x100mm), contendo 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA. Os tubos foram misturados com movimentos de rotação lenta e incubados a 35 °C. A formação de coágulo foi observada após 4 h a 6 h. No caso de teste negativo, a incubação foi completada para 24 h e os tubos examinados novamente. Foram considerados como coagulase negativa todas as estirpes que não apresentaram formação de coágulo ocupando mais que metade do volume original do líquido. *Staphylococcus aureus* foi utilizado como controle positivo (Silva *et al.*,2017).

4.3.4 Identificação dos microrganismos isolados por MALDI-TOF MS

Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massa do tipo tempo-de-voo (MALDI-TOF MS) - do Inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* – foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3.4.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas, conforme Coimbra-e-Souza *et al.* (2019). Os isolados foram inoculados em TSA e incubados a 35 °C/24 h. Com auxílio de um palito de madeira, as colônias foram depositadas em placa de aço inoxidável, mantida em repouso até secagem do material. Posteriormente, 1 µL de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado sobre cada amostra, para lise da parede celular. Após secar, 1 µL da matriz [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico contendo acetonitrila a 50% (v/v) e ácido trifluoroacético a 2,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] foi depositada. Mais uma vez a placa foi mantida em repouso para secar e, em seguida, inserida no compartimento de amostra do MALDI-TOF *Microflex LT* (Bruker Daltonics, MA, EUA), equipado com um laser de nitrogênio de 337 nm de caminho linear.

As amostras foram aplicadas em duplicata. Para cada aplicação foram realizadas duas leituras, obtendo-se ao final quatro resultados por amostra. O

espectro de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* DH5 α foi utilizado como controle interno do equipamento.

4.3.4.2 *Processamento dos dados*

Os dados espectrais foram coletados na faixa de proporção massa/carga de 2.000 a 20.000 Da, registrados pelo programa *CelFlex Control* 3.3 e analisados pelo software *MALDI Biotyper Realtime Classification* 3.1.2 (Bruker Daltonics, MA, EUA). Um escore é gerado como indicador de qualidade da identificação. Os escores iguais ou maiores que 2,3 foram considerados como identificação altamente provável para a espécie; entre 2,0 e 2,29 como identificação segura para gênero e provável para espécie; entre 1,7 e 1,9 como identificação provável apenas para gênero; e abaixo de 1,69 como não confiáveis.

4.3.5 **Produção de proteases pelos isolados obtidos**

A atividade de proteases foi determinada em Ágar leite, preparado a partir de Ágar Padrão (PCA) suplementado para 2% de leite desnatado. A semeadura foi realizada por método de estria simples e as placas incubadas a 32 °C/48 h. Colônias rodeadas por uma zona clara foram consideradas positivas para produção de protease (Santos *et al.*, 2009b).

4.3.6 **Produção de polissacarídeo extracelular (EPS)**

A produção de polissacarídeo extracelular (EPS) foi avaliada qualitativamente, de acordo com a metodologia de Freeman, Falkiner, Keane (1989). Os isolados bacterianos foram estriados em placas de Ágar vermelho Congo (Caldo BHI 37 g/L, sacarose 50 g/L, ágar 10 g/L e vermelho do Congo 0,8 g/L) e incubados a 37°C por 24 h. O resultado positivo foi indicado por colônias pretas com consistência cristalina seca, enquanto o negativo por colônias rosas. Foram utilizadas as estirpes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) como controle positivo e negativo, respectivamente.

4.4 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ESPESSAMENTO DO LEITE CONDENSADO E ATIVIDADE MICROBIANA

A capacidade dos isolados bacterianos de alterar as características (pH, acidez e viscosidade) de leite condensado foi estudado ao longo do tempo, em condições simuladas. A concentração do inóculo, a concentração de sacarose no meio para revigoração, o tempo e temperatura de incubação foram baseados nos estudos de Downs (1925) e Rice e Downs (1923).

Amostras de leite condensado integral de baixa contagem microbiana adquiridas no mercado local foram utilizadas como matriz principal. Um único lote foi utilizado para diminuir as fontes de variação do experimento. Em condições assépticas, 70 g de leite condensado integral foram distribuídas em recipiente estéril.

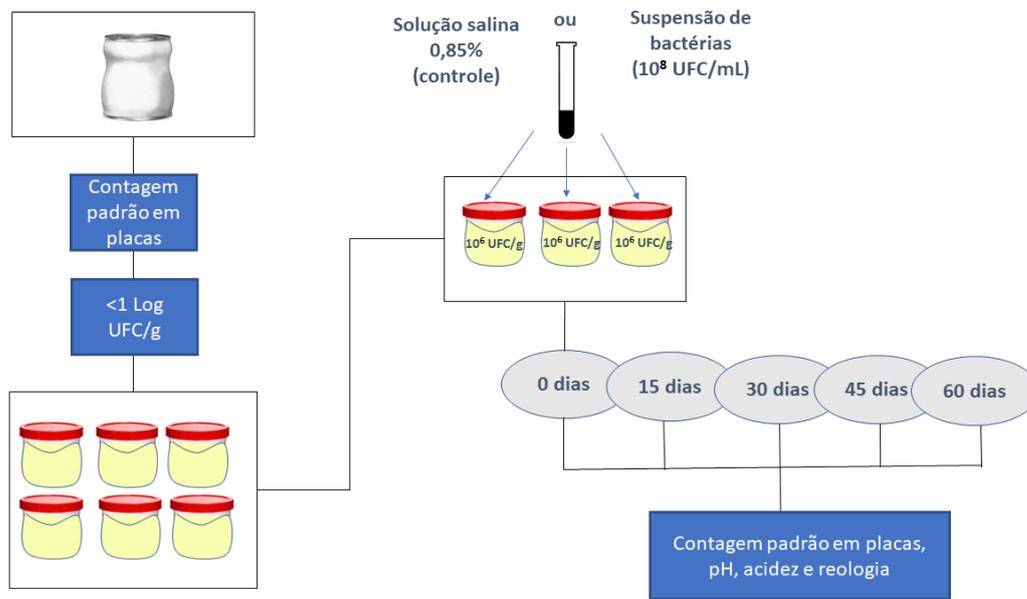
Os isolados geneticamente distintos por rep-PCR (12 isolados) foram diariamente transferidos para caldo BHI com 1% de sacarose, incubados a 30 °C, pelo período total de 10 dias. Posteriormente, foram usados para o preparo das suspensões microbianas.

As suspensões microbianas foram homogeneizadas, distribuídas em alíquotas de 1 mL e centrifugadas a 2292 g por 5 minutos. O pellet foi ressuspenseo com solução salina estéril 0,85% e padronizado para $DO_{600nm} = 0,1$ (equivalente a 10^8 UFC/mL). O volume de 0,7 mL da suspensão ($= 10^8$ UFC/mL) foi inoculado, em triplicata, em 70 g de leite condensado (inóculo 10^6 UFC/g). O inóculo misto (IM) foi obtido pela transferência de 60 µL de cada suspensão microbiana (12) para o mesmo recipiente. O controle negativo foi preparado pela adição de 0,7 mL de solução salina 0,85% estéril. O experimento foi realizado em triplicata e em três repetições, com espaço de tempo de 15 dias entre elas, totalizando 126 unidades experimentais (14 tratamentos x 3 replicatas x 3 repetições).

O meio era uniforme e as condições ambientais controladas (condições homogêneas). As amostras foram incubadas à temperatura de 30 °C e monitoradas no tempo de 0, 15, 30, 45 e 60 dias. Para cada tratamento, as respostas ao longo do tempo foram obtidas a partir da mesma unidade experimental (Figura 7). A acidez, reologia (obs: frequência constante modificada para 10 Hz no experimento de amplitude e temperatura) e contagem total de mesófilos aeróbios foram as variáveis respostas medidas ao longo do tempo. O pH foi medido apenas no início (T= 0 dias),

no meio (T= 30 dias) e no final do experimento (T= 60 dias). Os resultados de cada tratamento foram comparados entre si e ao controle.

Figura 7 – Desenho experimental do estudo da relação entre espessamento do leite condensado e atividade microbiana



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Amostras que desenvolveram espessamento foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito no item 4.2.5.

O isolado microbiano capaz de espessar amostra de leite condensado foi submetido a um teste de acidificação em leite. Uma suspensão foi padronizada para DO de 0,1 a 600 nm (10^8 UFC/mL) e inoculada em leite UHT sem e com a presença de sacarose (45g/100mL) produzindo um inóculo de 10^6 UFC/mL. O leite UHT com adição de sacarose foi aquecido até levantar fervura e, em seguida, resfriado em banho de gelo para garantir a inocuidade. Após adição de inóculo os tratamentos foram incubados a 30 °C e o pH medido após 6 e 9 dias.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo do comportamento dos isolados em uma matriz de leite condensado foi utilizado o delineamento em esquema fatoriais, em que o efeito de dois fatores foi avaliado: o microrganismo inoculado (Fator 1) e o tempo (Fator 2).

Os testes T-Student e Student-Newman-Keuls (SNK) foram utilizados para comparação das médias, a nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). O software Sisvar v.5.7 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil) foi usado para análise de variância (ANOVA) e comparação de médias de dois grupos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados em duas seções secundárias principais, que correspondem a caracterização física e química e microbiológica das amostras.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

Os resultados apresentados a seguir correspondem as análises para os seguintes atributos: pH acidez, teor de umidade (U), sólidos totais (ST), sólidos solúveis (SS), atividade de água (A_w), gordura (G), perfil de bandas de proteína, atividade de protease, microscopia, distribuição de partículas, colorimetria, 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L) e reologia.

5.1.1 pH, acidez e características de composição centesimal

As amostras de leite condensado classificadas como fora do padrão (LCFP) diferiram estatisticamente das amostras padrão (LCP) em seis das sete características físico-químicas avaliadas (Tabela 2).

Em LCFP, o pH (5,37) está abaixo do valor descrito por Ferreira *et al.* (2016) de 6,61 a 6,86 para leite condensado integral brasileiro. Brondi *et al.* (2011 apud Faria *et al.*, 2020) ao avaliar diferentes marcas encontrou o valor médio de 6,27. A acidez em LCFP (0,59 g de ácido láctico/100g) foi 1,7 vezes superior à acidez em LCP (0,34 g de ácido láctico/100g). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leite condensado não estabelece um padrão de acidez (Brasil, 2018a). Entretanto, Massari (2018) encontrou valores de 0,20 a 0,32 g de ácido láctico/100g para 11 marcas de leite condensado, valor cerca de duas vezes inferior ao determinado para as amostras fora do padrão reportados neste estudo.

A redução do pH de leite condensado tem causas associadas tanto ao tratamento térmico quanto à contaminação microbiana. Durante o tratamento térmico a produção de ácido fórmico, o deslocamento do equilíbrio salino e hidrólise de ésteres fosfóricos podem provocar a redução do pH (Anema, 2009; Mendes; Furtado; Perrone, 2012). Após o tratamento térmico, outras oportunidades de contaminação ocorrem e alguns cocos são capazes de produzir grande quantidade de ácido por meio da fermentação da sacarose ou da lactose (Downs, 1925). Rice e Downs (1923) descreveram amostras espessadas por atividade microbiana com acidez superior a

0,75 g/100g de ácido láctico. Contudo, a redução do pH e a produção de ácido não necessariamente causam mudanças excessivas na viscosidade.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de leite condensado integral

Caraterísticas	Amostra	
	LCFP	LCP
pH	5,37 ± 0,14 ^a	6,29 ± 0,05 ^b
A _c (g/100g)	0,59 ± 0,05 ^b	0,34 ± 0,03 ^a
U (g/100g)	26,93 ± 0,56 ^b	25,50 ± 0,51 ^a
ST (g/100g)	73,07 ± 0,56 ^a	74,50 ± 0,51 ^b
SS (^o Bx)	70,05 ± 0,37 ^a	71,43 ± 0,44 ^b
A _w	0,8305 ± 0,0233 ^a	0,8386 ± 0,0262 ^a
Gordura (g/100g)	8,25 ± 0,29 ^a	8,88 ± 0,25 ^b

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; A_c: acidez em g de ácido láctico/100g U: teor de umidade em g/100g; ST: teor sólidos totais em g/100g; SS: sólidos solúveis em Grau Brix; A_w: atividade de água; Gordura: teor de gordura em g/100g. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, p > 0,05).

Os sólidos totais determinados para LCFP e LCP foram de 73,07% e 74,50%, respectivamente. Apesar dos sólidos totais entre os dois grupos de amostras serem estatisticamente diferentes, os valores estão dentro do intervalo (70,13% a 75,72% ST) encontrado por Renhe *et al.*, (2018), ao avaliar nove marcas de leite condensado brasileiro.

A fração não gordurosa dos sólidos totais é a que mais influencia o aumento da viscosidade de leite condensado. A gordura tem pouco efeito sobre a viscosidade adquirida durante o armazenamento (Rogers; Dahlberg; Evans, 1920). LCFP (8,25 g/100g) apresentou menor teor de gordura que LCP (8,88 g/100g). A variação observada não justifica a diferença no comportamento fluido das amostras. Ainda

assim, os valores determinados atendem ao critério mínimo de 8,0 g/100g para leite condensado integral (Brasil, 2018a).

De acordo com Flauzino (2007) o aumento da concentração de sólidos solúveis aumenta a viscosidade dos fluidos. Entretanto, os resultados deste estudo não corroboram com essa afirmativa. As amostras de LCFP apresentaram menor concentração de sólidos solúveis em comparação aquelas de LCP. Em lácteos concentrados o teor de sólidos solúveis apresenta uma estimativa da quantidade de água presente no produto final. Quanto maior a quantidade de sólidos solúveis, menor é a quantidade de água. Os valores determinando (LCFP: 70,05 °Bx; LCP:71,42 °Bx) são similares aos encontrados em estudos com leite condensado brasileiro ou produzido por outros países do Mercosul (Bedim; Fiori, 2014; Renhe; Perrone; Silva, 2011).

O teor de umidade foi maior para amostras de LCFP (26,93%), o que não provocou uma diferença significativa na quantidade de água disponível para reações bioquímicas (A_w). Isto sugere, que a umidade excedente em LCFP pode estar na forma constitucional ligada aos solutos, ou na cobertura de hidratação externa e, dessa forma, não disponível na forma livre (Damodaran; Parkin, 2019).

Leites condensados brasileiros têm, em média, atividade de água (A_w) de 0,85 (Massari, 2018; Renhe *et al*, 2018). A presença de sacarose, sais do leite e lactose contribuem para o valor intermediário de A_w (A_w 0,60 a 0,90) e obtém-se um produto microbiologicamente mais estável. Contudo, o leite condensado não é um produto estéril e está sujeito à deterioração microbiana. Os valores encontrados para as amostras de 0,83 (LCFP) e 0,84 (LCP) ainda permitem o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras (Nieuwenhuijse, 2016).

Dentre os critérios físico-químicos avaliados, o pH e a acidez foram os atributos que não estão de acordo com o descrito na literatura para leite condensado.

5.1.2 Análise de proteína e atividade de proteases

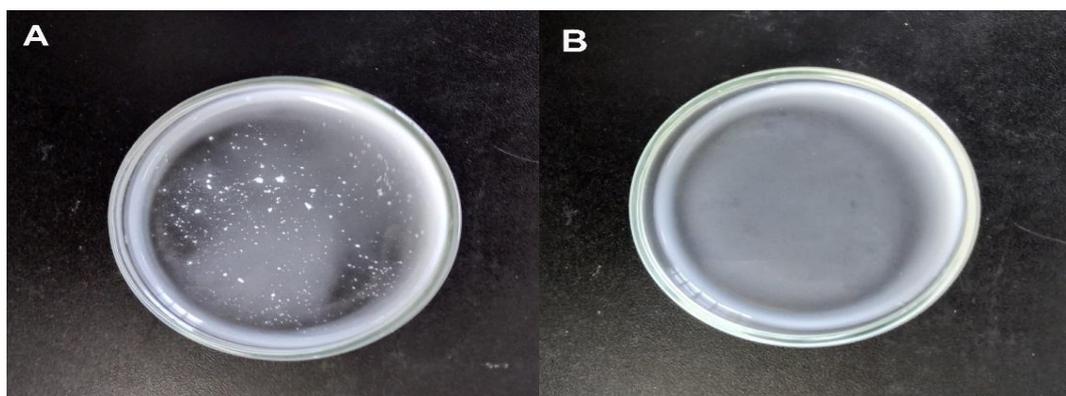
As modificações químicas e estruturais nas proteínas provocam as alterações mais relevantes em leite condensado, sendo a caseína a proteína do leite que mais contribui para o espessamento (Rogers; Deysher; Evans, 1920; Samel; Muers, 1962c). Downs (1925) indicou que o espessamento poderia se relacionar à ação de enzimas tipo renina. A renina ou quimosina (EC 3.4.23.4) são proteases que hidrolisam

a ligação Phe105 - Met106 da k-caseína (k-CN) desestabilizando as micelas de caseína, o que resulta na gelificação do leite (McMahon; Brown, 1984).

A presença de sólidos insolúveis (Figura 8), semelhantes aos agregados proteicos formados durante a coagulação do leite, foi observada para amostras de LCFP ao ser diluída em água, em proporção 1:10. Tendo isso em vista, a atividade de protease foi avaliada para as amostras, mas não foi encontrada diferença significativa que justifique a alteração no produto (Tabela 3). O tempo transcorrido entre a data de fabricação e a análise (dezessete meses) foi suposto como um fator limitante, contudo, os valores determinados para as amostras do estudo são estatisticamente iguais ao encontrado para amostra obtida no mercado local (três meses), sem características de espessamento e com menor tempo de prateleira (Tabela 3).

A integridade da caseína e possível degradação por hidrólise enzimática foi avaliada por SDS-PAGE (Figura 9). McMahon e Brown (1984) descreveram que quando a coagulação é observada fisicamente, 90% da k-caseína no leite já sofreu proteólise. E em produtos concentrados o efeito da proteólise na gelificação é acelerado (Manji; Kakuda, 1988). Entretanto, não foi observada diferença entre as frações de caseína ao comparar amostras de LCFP com amostras de LCP, o que indica que a desestabilização coloidal de leite condensado pode ter sido desencadeada por outro fator, como a acidificação.

Figura 8 – Presença de sólidos insolúveis em amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP), diluídos em água



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: (A) se refere a diluição 1:10 de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e (B) de leite condensado integral padrão (LCP).

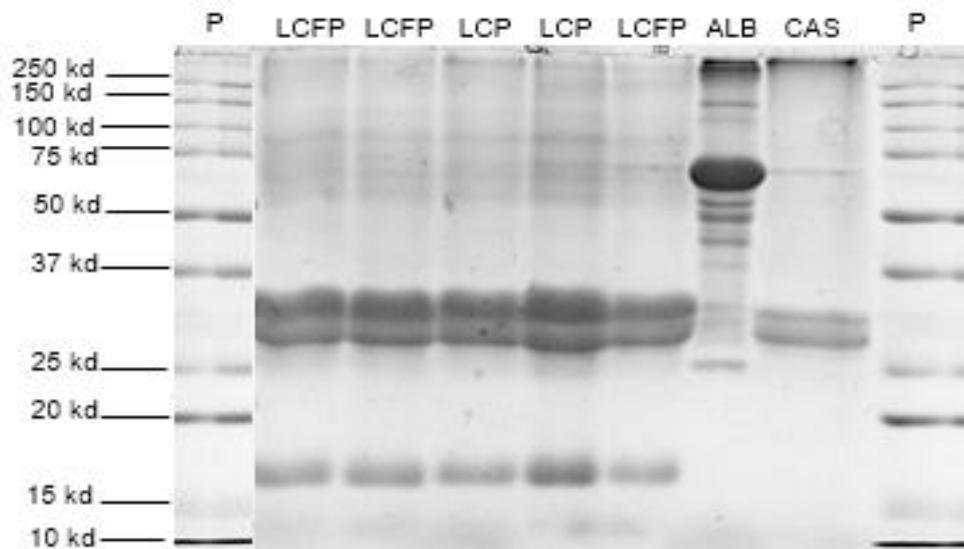
Tabela 3 – Atividade de protease em amostras de leite condensado integral padrão (LCP), fora do padrão (LCFP) e amostra obtida no mercado local (LCML)

Amostra	Atividade (UP/g)
LCFP	28,82 ± 9,45 ^A
LCP	37,99 ± 4,33 ^A
LCML	35,97 ± 7,02 ^A

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; LCML: leite condensado integral obtido no mercado local. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, $p > 0,05$).

Figura 9 – Avaliação de proteólise em leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: P: marcador de peso molecular; LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; CAS: padrão de caseína; ALB: padrão de albumina.

5.1.3 Microscopia e distribuição do tamanho de partículas

No leite condensado a gordura, a lactose e as proteínas são as partículas em suspensão. No leite homogeneizado, o glóbulo de gordura tem tamanho de 1 μm ou menos. As caseínas representam a maior parte das proteínas do leite bovino (80%) e as micelas possuem diâmetro médio de 200 nm (0,2 μm). Leite condensado com boas propriedades sensoriais deve ter cristais de lactose abaixo de 16 μm (Cruz *et al.*, 2016).

Existe um menor percentual de partículas abaixo de 1 μm em LCFP (Tabela 4). Além disso, nessas amostras o maior volume de partículas está concentrado em uma região de maior diâmetro (entre 10 μm a 40 μm) (Gráfico 1a), sendo o tamanho máximo e 90% da distribuição do volume percentual ($d_{90\%}$) de 34,88 μm (Tabela 4). Por outro lado, nas amostras utilizadas como controle (LCP), a região com maior volume de partículas concorda com o encontrado por Pereira *et al.* (2019), entre 1 a 2 μm (Gráfico 1b) e $d_{90\%}$ de 5,96 μm , cerca de 6 vezes inferior a LCFP (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros de distribuição de partículas para amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)

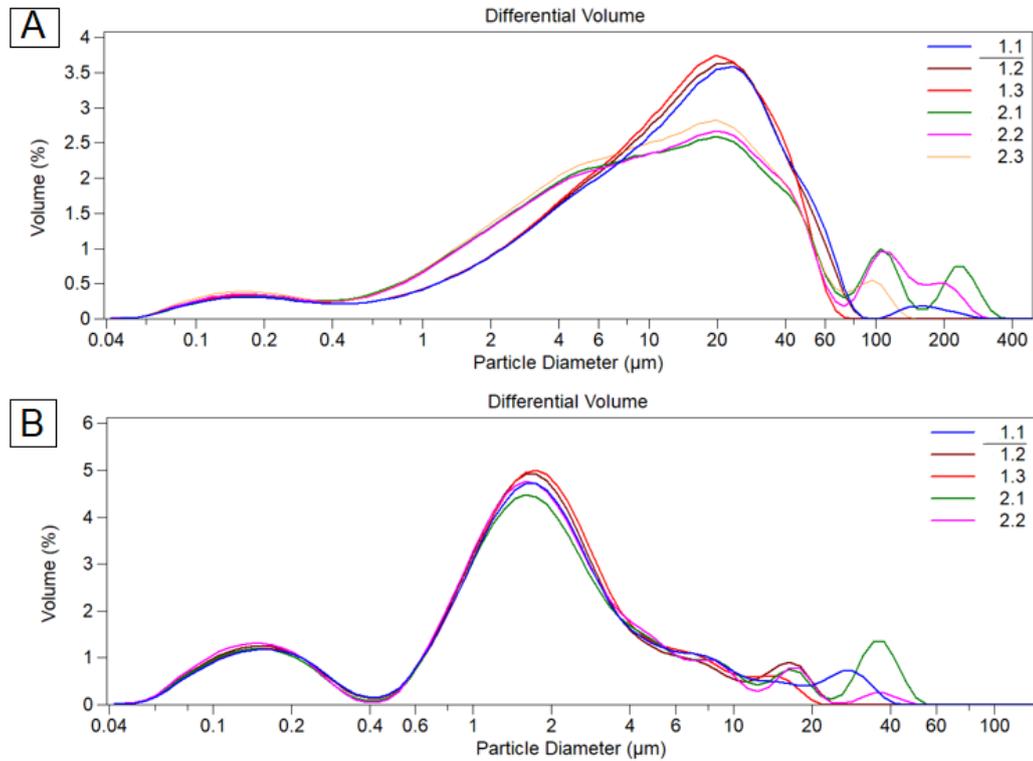
Amostra	Distribuição de partículas	
	< 1 μm (%)	$d_{90\%}$ (μm)
LCFP	8,45 \pm 1,65 ^A	34,88 \pm 5,78 ^B
LCP	26,29 \pm 3,37 ^B	5,96 \pm 1,64 ^A

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; <1 μm : percentual de partículas com diâmetro abaixo de um micrômetro; $d_{90\%}$: representa o tamanho máximo de partícula e 90% da distribuição do volume percentual. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, $p > 0,05$).

O maior tamanho de partículas encontrado em LCFP pode estar relacionado a problemas de cristalização ou à formação de aglomerados proteicos. Samel e Muers (1962a; 1962c) observaram em microscópio eletrônico a interligação de micelas de caseína formando uma rede de agregados em amostras espessadas, que resultou na maior taxa de sedimentação de caseína, devido ao aumento do tamanho das partículas. A presença de sedimentos (Figura 8) e partículas com maior diâmetro (Gráfico 1a), também foram observações feitas para amostras espessadas deste estudo.

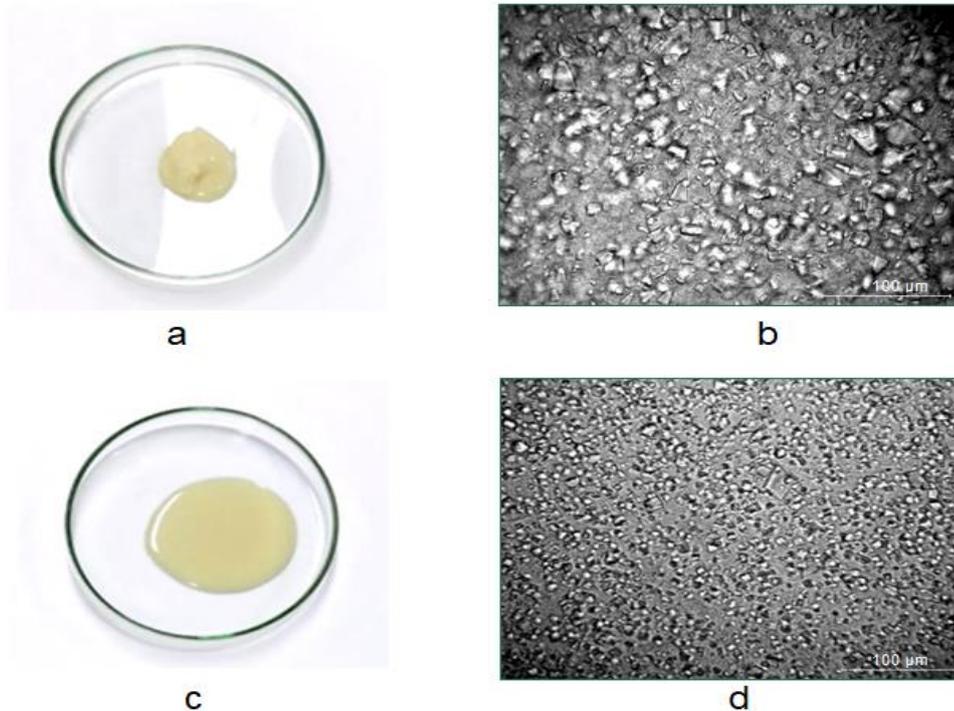
Gráfico 1 – Distribuição de partículas em leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Imagens representativas do conjunto de amostras (A) de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) (B) e padrão (LCP). As cores representam três medições consecutivas para cada duplicata.

Figura 10 – Macro e Micrografia de amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: (A) leite condensado integral fora do padrão (LCFP) (B) micrografia de LCFP com aumento de 400x (C) leite condensado integral padrão (LCP) (D) micrografia de LCP com aumento de 400x. Imagens representativas do grupo de amostras.

As micrografias (Figura 10 b,d) revelaram uma diferença no processo de cristalização, em que comparativamente é possível perceber a formação de cristais de maior tamanho em LCFP (Figura 10b). O crescimento dos cristais é influenciado pela temperatura, agitação, taxa de resfriamento, área disponível para deposição e viscosidade. A alteração de um desses fatores pode ter contribuído para a diferença encontrada entre as amostras. Apesar disso, não é possível confirmar a natureza das partículas, visto que a análise de difração a laser não é específica, as partículas são agrupadas por tamanho, não sendo levado em consideração a composição e outros critérios de segregação (Pereira *et al.*,2019).

5.1.4 Colorimetria e 5-hidroximetilfurfural livre (HMF_L)

O tempo em que o tratamento térmico é aplicado tem grande impacto na viscosidade final (Renhe; Perrone; Silva, 2011). Em produtos lácteos, geralmente, a cor é utilizada como indicador de tratamento térmico severo (Mortier *et al.*,2000).

Embora os parâmetros colorimétricos e índice HMF não revelaram diferenças significativas entre as amostras de LCFP e LCP (Tabela 5), isso não significa que esta possibilidade deve ser excluída. De acordo com profissionais da área, para a tecnologia de leite condensado, cor e HMF não são bons indicadores. A formação limitada de pigmentos marrons tem pequeno efeito na cor (Nieuwenhuijse, 2016). A intensificação de reação de *Maillard* a ponto de provocar mudanças na cor do produto exigiria um tempo de tratamento térmico muito diferente entre as amostras.

Tabela 5 – Indicadores de cor para amostras de leite condensado integral fora do padrão (LCFP) e padrão (LCP)

Parâmetros colorimétricos	Amostra	
	LCFP	LCP
L*	75,01 ± 0,20 ^a	75,11 ± 0,74 ^a
a*	-3,63 ± 0,24 ^a	-3,47 ± 0,62 ^a
b*	15,87 ± 1,18 ^a	18,04 ± 1,85 ^a
Wh	70,16 ± 0,77 ^a	69,02 ± 1,08 ^a
HMF _L (µmol/L)	82,57 ± 1,63 ^a	77,28 ± 5,19 ^a

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; L*: luminosidade (- escuro/ +claro); a*: coordenada cromática a*(verde/+vermelho); b*: coordenada cromática b* (-azul/+amarelo); Wh: índice de brancura; HMF_L: índice 5-hidroximetilfurfural livre.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, p > 0,05).

Stebnitz e Sommer (1935c) demonstraram que o tratamento térmico por 10 minutos entre 82 °C a 95 °C leva ao espessamento em 6 dias. Contudo, a formação de pigmento marrom escuro só ocorreu para tratamento térmico aplicado em temperatura superior (110 °C a 120 °C), mas nessas condições o leite condensado foi menos suscetível ao espessamento. Esses resultados apontam que amostras de leite condensado podem espessar por influência do tratamento térmico sem necessariamente ter produção de pigmentos escuros. Por outro lado, as amostras podem ter cor não característica devido à severidade do tratamento térmico e não desenvolver espessamento.

5.1.5 Reologia

A reologia oscilatória foi utilizada pelo fato de as amostras apresentarem forte comportamento viscoelástico, ou seja, apresentam comportamento simultâneo de materiais sólidos (elástico) e de fluidos (viscoso).

Experimentos com oscilação de amplitude de deformação ($\gamma\%$) demonstraram que amostras de LCFP apresentaram comportamento bastante elástico, com região de viscoelasticidade linear (LVE), isto é, limite de amplitude de deformação na qual a estrutura do fluido é preservada, de $\gamma\% \leq 0,63\%$ (Gráfico 2a). Após a LVE, a estrutura do fluido começa a se romper até atingir o regime de fluxo. Os valores de $\tan \delta$ (G''/G') para LCFP foram menores que 1 em toda a faixa de amplitude varrida demonstrando comportamento elástico predominante, típico de sólidos. A $\tan \delta$ é um parâmetro que representa a relação entre o módulo de perda (G'') e o módulo de armazenamento (G'). G'' caracteriza a porção viscosa do comportamento viscoelástico, enquanto G' caracteriza a porção elástica. Quando a amostra tende a ter comportamento fluídico $\tan \delta > 1$ e quando tende a ter comportamento de sólido $\tan \delta < 1$.

A amostra LCP demonstrou comportamento fluídico, pois $\tan \delta$ (G''/G') foi maior que 1 em toda a faixa de amplitude varrida. Vale ressaltar que G'' foi maior que G' em toda a faixa (Gráfico 2b), demonstrando comportamento fluídico. Além disso, a LVE foi aproximadamente constante em todo o experimento, não apresentando limite de escoamento. É importante frisar que regiões acima da LVE, há um rompimento das interações intermoleculares até um limite de escoamento.

Experimentos oscilatórios em função da frequência (ω) permitiram medir a viscosidade complexa (η^*), parâmetro análogo à viscosidade estacionária (η), mas medida para fluidos viscoelásticos em regime de manutenção da microestrutura de interações intermoleculares. Conforme observado no Gráfico 3a, a amostra de LCFP apresenta maior viscosidade que LCP. Considerando toda a faixa varrida, a viscosidade de LCFP atingiu valores de 2 a 48 vezes superior à viscosidade de LCP. Além disso, a queda da viscosidade complexa com a frequência de cisalhamento é característico de pseudoplasticidade. Quanto maior a queda na viscosidade, maior a pseudoplasticidade.

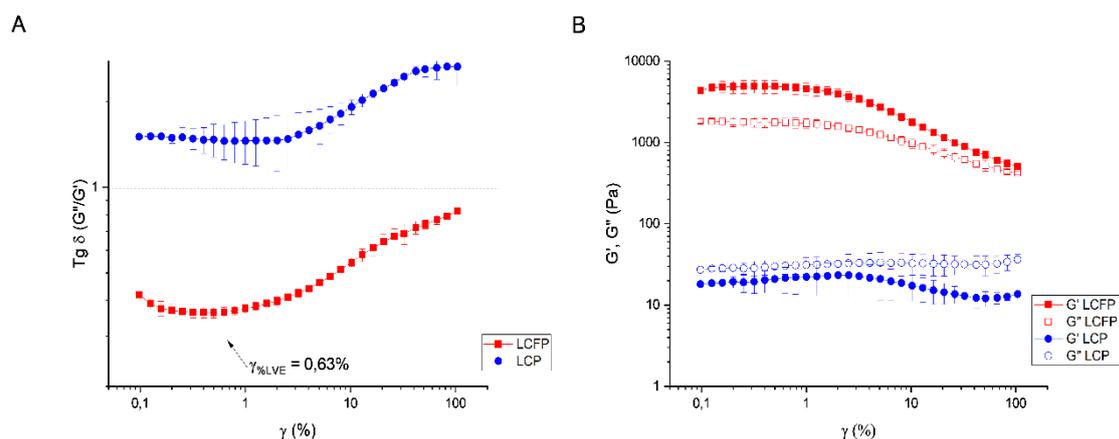
Apenas LCP apresentou ponto de cruzamento entre G' e G'' (Gráfico 3b) a 0,8 Hz, representando transição gel/sol induzida pela frequência de cisalhamento.

Amostra de LCFP, embora apresentou comportamento tendendo à transição gel/sol, dentro da faixa varrida não houve cruzamento.

Amostras de LCFP apresentou valor de $\text{tg } \delta$ (G''/G') menor que 1 em toda a faixa de temperatura, reforçando o comportamento de gel forte (alta viscoelasticidade). Além disso, teve aumento de $\text{tg } \delta$ (G''/G') próximo a 30 °C, sugerindo forte desestabilização coloidal nesta temperatura. LCP mostrou comportamento complexo, com oscilação da $\text{tg } \delta$ (G''/G') próximo de 1 e mínimo em 30 °C, sugerindo também desestabilização, seguida de perda de água em torno de 50 °C (Gráfico 4a).

A presença de inflexão próximo de 30 °C para as amostras sugere que algum componente em comum esteja sofrendo alguma transição/desestabilização, o que pode prejudicar as amostras acima desta temperatura. Apenas LCP apresentou ponto de cruzamento entre G' e G'' (Gráfico 4b) próximo a 50 °C, representando transição gel/sol induzida pela temperatura. Amostra de LCFP, embora apresentou comportamento tendendo à transição gel/sol, dentro da faixa varrida não houve cruzamento.

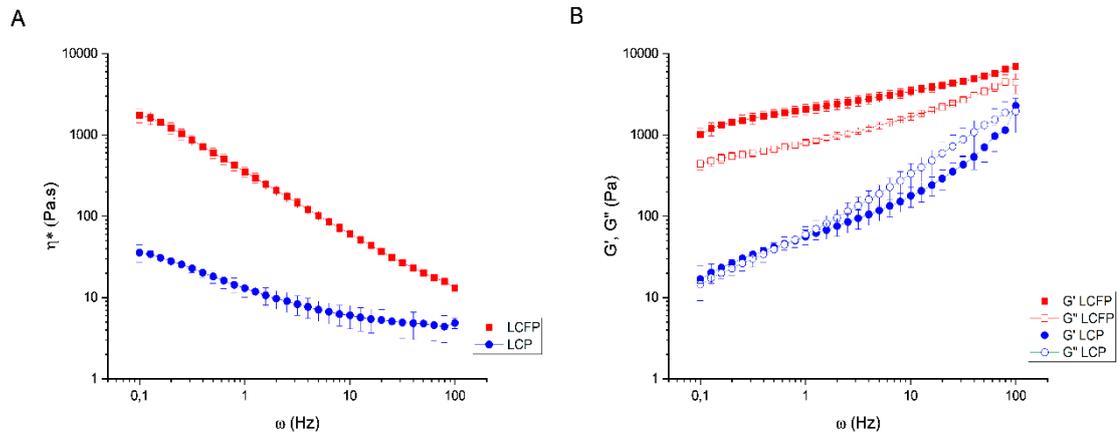
Gráfico 2 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) com oscilação de amplitude



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; (A) representa a relação entre tangente de delta ($\text{Tg } \delta$) e amplitude de deformação em % (γ); (B) representa a relação entre módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') com a amplitude de deformação em % (γ).

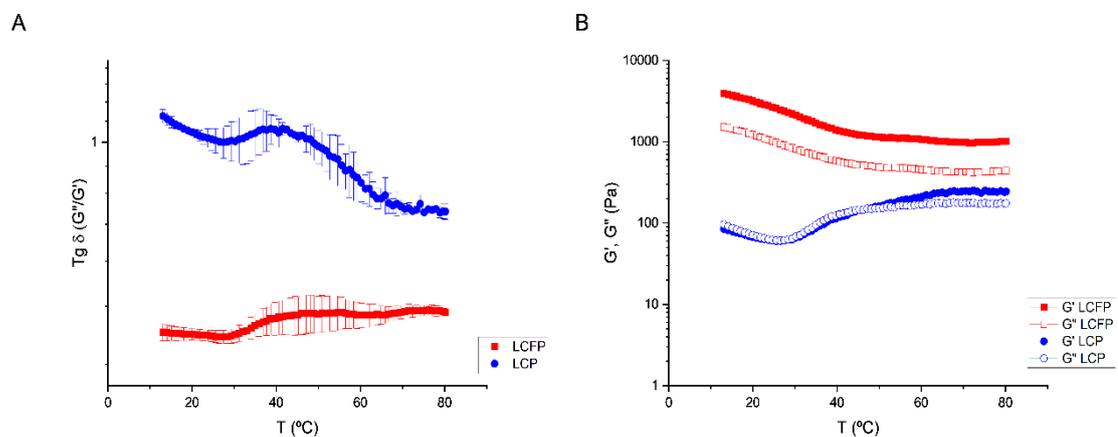
Gráfico 3 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) oscilação de frequência



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; (A) representa a relação entre a viscosidade complexa (η^*) e a oscilação de frequência (ω) em Hertz; (B) representa a relação entre módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') com a oscilação de frequência (ω) em Hertz.

Gráfico 4 – Análise reológica de leite condensado padrão (LCP) e fora do padrão (LCFP) com oscilação de temperatura



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; (A) representa a relação entre tangente de delta ($Tg \delta$) e a temperatura (T) em grau Celsius; (B) representa a relação entre módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') com a temperatura (T) em grau Celsius.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Os grupos de microrganismos isolados das amostras e a caracterização deles por métodos bioquímicos, moleculares e espectrométricos são apresentados nas subseções a seguir.

5.2.1 Isolamento dos microrganismos

O total de 29 microrganismos foram isolados de leite condensado integral padrão e fora do padrão, dentre eles prováveis *Staphylococcus* spp. (25) e leveduras (4) identificados pelas características da colônia, utilização de meio de cultura seletivo e provas bioquímicas. Em Ágar Padrão, as colônias eram circulares, de superfície convexa e lisa, borda inteira, brilhantes e com pigmento amarelo (A) ou branco (B) e de forma irregular, de superfície umbilicada, fosca e pigmento amarelo (C). As colônias leveduriformes (D) cultivadas em Ágar Batata Dextrose (PDA) eram grandes, circulares, de superfície convexa e lisa, pigmento branco e consistência cremosa (Figura 11).

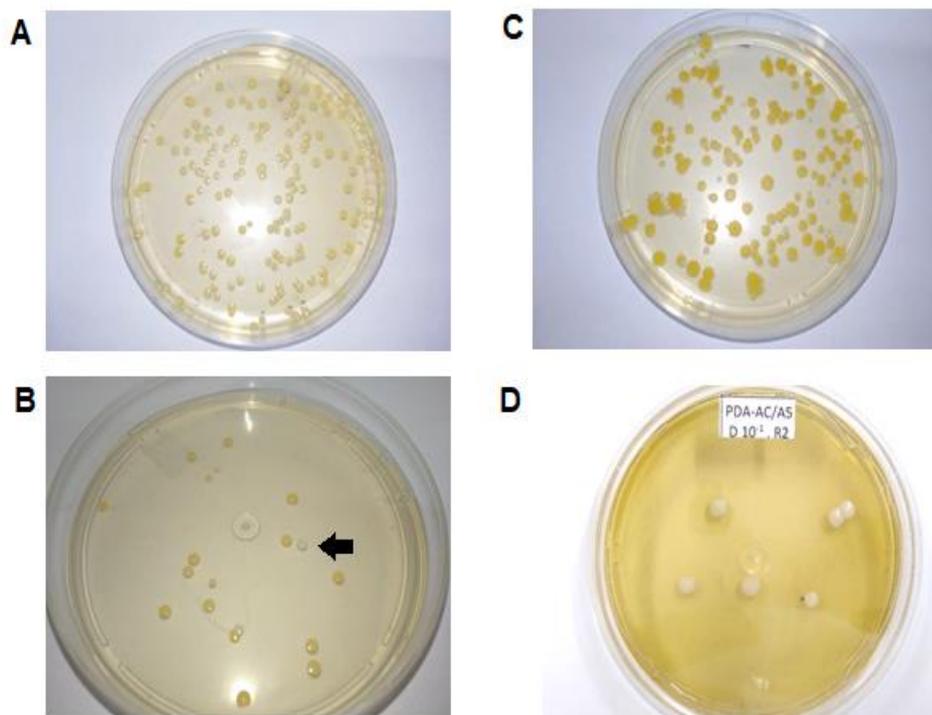
A contagem total de bactérias foi menor em LCFP (2,87 log UFC/g), em comparação a LCP (4,60 log UFC/g) (Tabela 6). A menor carga microbiana em LCFP pode estar relacionada ao valor mais baixo de pH para o grupo de amostras. Bactérias crescem melhor em ambientes próximos da neutralidade (pH 6,5 a 7,5), enquanto fungos e leveduras podem crescer em variações maiores de pH (Paulus, 2005). O metabolismo de leveduras pode liberar componentes ácidos no meio (Alla *et al*, 2021), mas em LCFP a contagem de leveduras estava abaixo do limite de detecção (< 2,0 log UFC/g).

As leveduras são contaminantes comuns em fábricas de açúcar ou fábricas que processam soluções concentradas de açúcares. As matérias-primas utilizadas para produção de sacarose, como o melaço da beterraba ou a cana-de-açúcar, contêm grande carga microbiana. Os fungos filamentosos e leveduras, geralmente não sobrevivem às altas temperaturas utilizadas no processo de fabricação, mas podem novamente contaminar o produto final ao serem transportadas pelo ar ou por ocorrerem nas superfícies dos equipamentos da refinaria (Siavoshi *et al*, 2020).

Siavoshi *et al.* (2020) demonstraram que leveduras osmotolerantes podem servir de reservatório para grupos microbianos, como *Staphylococcus* spp, por abrigar formas viáveis no interior dos vacúolos, o que gravemente facilitaria a disseminação

de microrganismos em humanos por meio de alimentos altos em teor de açúcar, nos quais não seriam diretamente encontrados, devido às condições de estresse. As leveduras são mais tolerantes do que as bactérias às condições de estresse osmótico, ácido e baixa atividade de água, pois acumulam glicerol e outros polióis no interior da célula. Os grupos hidroxila dessas moléculas retêm polímeros intracelulares na forma hidratada e, conseqüentemente, preserva a atividade enzimática (Siavoshi *et al*, 2020). Mas alguns *Staphylococcus* spp. também são capazes de tolerar condições de estresse osmótico (Carvalho *et al.*, 2017; Ming *et al.*, 2019).

Figura 11 – Imagens representativas das características das colônias de microrganismos isolados de leite condensado



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: (A) Colônias de bactérias circulares, de superfície convexa e lisa, borda inteira, brilhantes e com pigmento amarelo; (B) A seta indica uma colônia de bactéria circular, de superfície convexa e lisa, borda inteira, brilhantes e com pigmento branco; (C) colônias de bactérias irregulares, de superfície umbilicada, fosca e pigmento amarelo; (D) colônias de leveduras circulares, de superfície convexa e lisa, pigmento branco e consistência cremosa.

Tabela 6 – Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* spp. e leveduras em amostras de leite condensado integral

Amostra	Contagem total de A. M. (Log UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. (Log UFC/g)	Leveduras (Log UFC/g)
LCFP	2,88 _{est.± 0,73} ^A	2,90 _{est. ± 0,72} ^A	<2,0 _{est. ± 0,00} ^A
LCP	4,61 ± 0,75 ^B	4,77± 0,84 ^B	2,60 _{est. ± 0,75} ^B

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCFP: leite condensado integral fora do padrão; LCP: leite condensado integral padrão; A.M.: aeróbios mesófilos.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, $p > 0,05$).

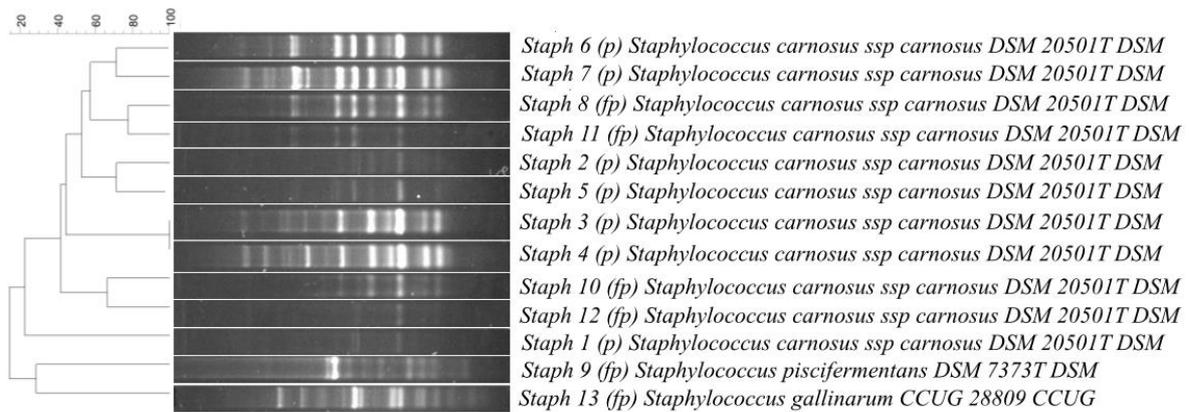
A presença de contaminantes, como leveduras e *Staphylococcus* spp. em leite condensado, expõe a necessidade de melhor controle higiênico-sanitário durante a produção de leite condensado, visando a segurança do alimento na comercialização e consumo.

5.2.2 *Fingerprint* genético e identificação dos microrganismos por métodos bioquímicos e MALDI-TOF MS

O total de 13 isolados bacterianos (Tabela 7), obtidos de amostras de LCFP e LCP foram selecionados para estudo adicional conforme descrito no item 4.4. Uma colônia de cada característica morfológica A, B e C (Figura 11), isolada por amostra de cada grupo (LCP e LCFP) foi escolhida. As estirpes bacterianas foram preferencialmente estudadas, visto que a literatura associa a atividade de bactérias em forma de cocos com o espessamento de origem microbiana e não foram encontradas leveduras viáveis em amostras de LCFP.

A diversidade e distinção entre clones genéticos foi avaliada por rep-PCR. A análise gerou produtos de amplificação entre 300 a 4000 pares de base (pb), a partir do DNA dos microrganismos isolados. Considerando similaridade de 100% foi encontrado apenas um clone, resultando em doze clusters após análise do padrão de bandas dos treze isolados (Figura 12).

Figura 12 – Dendrograma baseado na análise de clusters do *fingerprint* de *Staphylococcus* spp. obtidos por rep-PCR



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Staph 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (p): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (fp): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão. O dendrograma foi construído utilizando distância de Jaccard com tolerância de 2% e método de agrupamento de pares com média aritmética não ponderada (UPGMA).

Os doze isolados são cocos gram positivos e catalase positivos (Tabela 7), características de *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (Baker, 1984; Falk, Guering, 1983). A diferenciação entre os dois gêneros de bactérias foi realizada por teste de fermentação de glicose e sensibilidade a antimicrobianos, utilizando discos de difusão de furazolidona e bacitracina, em ágar Müeller-Hinton. Os isolados foram todos fermentadores de glicose, resistentes a bacitracina e sensíveis a furazolidona, sendo identificadas para o gênero *Staphylococcus*.

A produção de coagulase é um importante indicador de patogenicidade do grupo e os isolados testaram negativamente. *Staphylococcus* também podem produzir polissacarídeo extracelular (EPS) (Figura 13), um fator de virulência que favorece a adesão em superfícies e formação de biofilme (Abdallah *et al.*, 2014). Dentre os doze isolados, apenas dois deles (Staph 9 e Staph 13) demonstraram capacidade de produzir EPS (Tabela 7). A temperatura ideal de crescimento foi de 35 °C, exceto para Staph 9 e Staph 13 que crescem a 30 °C.

Tabela 7 – Características bioquímicas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite condensado integral

Estirpe	Identificação por MALDI TOF MS	G R A M	C A T A L	C O A G	O F	FU Z.	B C	P R O T	E P S
Staph 1 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 2 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 3 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 5 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 6 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 7 (p)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 8 (fp)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 9 (fp)	<i>Staphylococcus piscifermentans</i> DSM 7373T DSM	+	+	-	F	S	R	-	+
Staph 10 (fp)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 11 (fp)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 12 (fp)	<i>Staphylococcus carnosus ssp carnosus</i> DSM 20501T DSM .	+	+	-	F	S	R	-	-
Staph 13 (fp)	<i>Staphylococcus gallinarum</i> CCUG 28809 CCUG	+	+	-	F	S	R	-	+

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (p): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (fp): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; CATAL: teste de catalase; COAG: teste de coagulase; OF: teste de oxidação/fermentação de glicose; FUZ: furazolidona; BAC: bacitracina; F: fermentador; S: sensível; R: resistente; PROT: atividade de protease; EPS: produção de polissacarídeo extracelular; + : positivo; - : negativo.

Figura 13 – Imagens representativas de teste qualitativo para capacidade de produção de polissacarídeo extracelular



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Colônias de pigmentação rosa indicam resultado negativos para produção de polissacarídeo extracelular e colônias escuras com consistência seca, resultado positivo.

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) não são comumente relacionados a casos de intoxicação alimentar, mas são patógenos oportunistas cada vez mais identificados em infecções humanas e animais (Irlinger, 2008; Chajeka-Wierzchowska *et al.*, 2015). O tratamento terapêutico por infecções causadas por SCN tem sido desafiador, pois uma grande proporção é resistente à meticilina (Becker; Heilmann; Peters, 2014). Além disso, algumas espécies podem produzir enterotoxinas (Nunes *et al.*, 2016) e possuem muitos genes de resistência. Uma vez presentes em alimentos prontos para consumo, a transferência de genes de resistência entre espécies estafilocócicas e/ou a transmissão direta de patógenos resistentes para humanos, representa um perigo à saúde pública (Chajeka-Wierzchowska *et al.*, 2015). O RTIQ de leite condensado não contém critérios microbiológicos para SCN, pois apresentam menor potencial de virulência, em comparação a *Staphylococcus aureus*, contudo, deveriam ser considerados um indicador de risco microbiológico.

Os doze isolados foram submetidos a identificação por MALDI-TOF MS. Os doze isolados SCN foram confirmados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e classificados em três espécies: *S. carnosus* (10), *S. piscifermentans* (1) e *S. gallinarum* (1) (Tabela 7). Para *S. carnosus* a identificação é segura para gênero e provável para espécie (score 2,03 a 2,14), enquanto *S. piscifermentans* (1,93) e *S. gallinarum* (1,98), a identificação é provável apenas para gênero. *S. carnosus* teve

uma prevalência de 83,3% dos isolados. De amostras LCFP foram isolados representantes das três espécies, enquanto LCP apenas isolados *S. carnosus*.

As proteínas ribossômicas são abundantes em células bacterianas e a técnica de MALDI-TOF MS gera espectros de massa dessas proteínas para agrupar e identificar bactérias, a partir de informações disponíveis em um banco de dados (Ghyselinck *et al.*, 2011). Para espécies *S. carnosus* e *S. piscifermentans* do gênero *Staphylococcus*, as sequências do gene 16S rRNA são muito semelhantes, portanto, é difícil distinguir as espécies mencionadas.

S. carnosus e *S. piscifermentans* são espécies não patogênicas utilizados na fermentação de alimentos (Gupta *et al.*, 2018). Estudos descrevem o potencial probiótico e antimicrobiano desses isolados, que podem ser explorados em benefício da saúde humana (Gupta *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018). Uma das principais características desses microrganismos é a capacidade de reduzir nitrato e nitrito, importantes para propriedades sensoriais, estabilidade e segurança higiênica de alimentos (Hartmann; Wolf; Hammes, 1995; Löfblom *et al.*, 2017). Segundo Tanasupawat *et al.* (1992), as duas espécies são semelhantes em suas características fenotípicas, mas técnicas baseadas na análise de DNA têm auxiliado na distinção entre elas (Pantöček *et al.*, 1999).

S. carnosus é utilizada como cultura iniciadora na fermentação de alimentos embutidos, protegendo-os de microrganismos indesejáveis. Na década de 1950 foi usada principalmente na produção de salsichas (Löfblom *et al.*, 2017). Rosenstein (2009) ao sequenciar o genoma de *S. carnosus* descreveu que o genoma possui nove sistemas de osmoproteção, o que justifica sua tolerância a ambientes com altas concentrações de sal e/ou açúcar. A maioria das toxinas de *S. aureus* não estão presentes no genoma de *S. carnosus*, assim como genes envolvidos na formação de biofilme, o que reforça sua condição não patogênica.

S. piscifermentans foi isolado pela primeira vez em peixe fermentado na Tailândia e é o habitat mais frequentemente encontrado (Bannerman, 1996; Gupta *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018; Tanasupawat *et al.*, 1992). Contribui para o desenvolvimento de sabor, cor vermelha, diminuição do pH e da oxidação em alimentos. Tolerância a uma faixa de pH entre 2 a 8, bem como concentrações de sal entre 2% a 8% (Gupta *et al.*, 2018).

S. gallinarum é um patógeno oportunista, frequentemente isolado da pele e vias nasais de aves e raro em humanos (Pimenta *et al.*, 2021; Larosa-Ramos *et al.*, 2021;

Sorour *et al.*, 2023; Tibra *et al.*, 2010). A taxa de infecção e morbidade de *S. gallinarum* é relativamente baixa e seus efeitos em humanos são limitados (Yu *et al.*, 2008). Sorour *et al.*, (2023) demonstraram que infecções por *S. gallinarum* podem provocar 20% de mortalidade em plantéis avícolas. Os autores descreveram cepas multirresistentes a antimicrobianos, com gene para produção de enterotoxina estafilocócica e de resistência à meticilina. Em humanos, *S. gallinarum* foi isolado de feridas sépticas (Kolawole; Shittu, 1997), em pacientes com infecção crônica de vírus da hepatite B (Yu *et al.*, 2008), na cavidade oral de adultos saudáveis (Ohara-Nemoto *et al.*, 2008) e em infecção no interior dos olhos (Tibra *et al.*, 2010). Oliveira *et al.* (2022) também descreveu a presença de *S. gallinarum* em rebanhos leiteiros com mastite subclínica.

Embora *S. gallinarum* esteja relacionado a infecções humanas e animais, trabalhos recentes também demonstraram sua presença em ambientes variáveis como em alimentado fermentado (Onda *et al.*, 2003), água de coco (Raj *et al.*, 2023) e no solo (Harboul *et al.*, 2022) e discutem o potencial uso probiótico e na biorremediação de metais pesados para estirpes da espécie.

5.2.3 Relação entre espessamento do leite condensado e atividade microbiana

Amostra de leite condensado obtido do mercado local (LCML) foi caracterizada quanto aos atributos de pH, acidez, umidade, sólidos totais, atividade de água e gordura (Tabela 8).

Tabela 8 – Características de leite condensado integral obtido do mercado local (LCML)

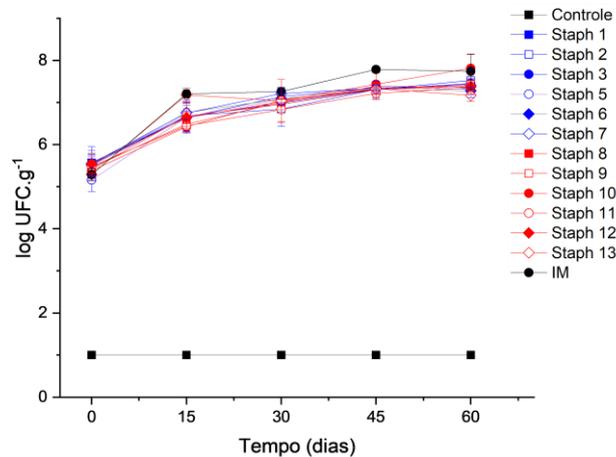
Caraterísticas	Amostra LCML
pH	6,31 ± 0,03
A_c (g/100g)	0,29 ± 0,01
U (g/100g)	29,88 ± 0,25
ST (g/100g)	70,12 ± 0,25
A_w	0,8761 ± 0,0037
Gordura (g/100g)	7,75 ± 0,35

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: LCML: leite condensado integral de baixa contagem microbiana obtido no mercado local; A_c: acidez em g de ácido láctico/100g U: teor de umidade em g/100g; ST: teor sólidos totais em g/100g; A_w: atividade de água; Gordura: teor de gordura em g/100g.

No Gráfico 5 é possível observar a curva de crescimento microbiano. Os resultados demonstraram que *Staphylococcus* coagulase negativa obtidos nesse estudo podem se manter metabolicamente ativos em condições de estresse osmótico, em alimento rico em açúcar como o leite condensado. Ao final dos 60 dias a população microbiana cresceu cerca de cem vezes (2 Log UFC/g).

Gráfico 5 – Crescimento microbiano de *Staphylococcus* coagulase negativa, ao longo de 60 dias, em uma matriz de leite condensado integral



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

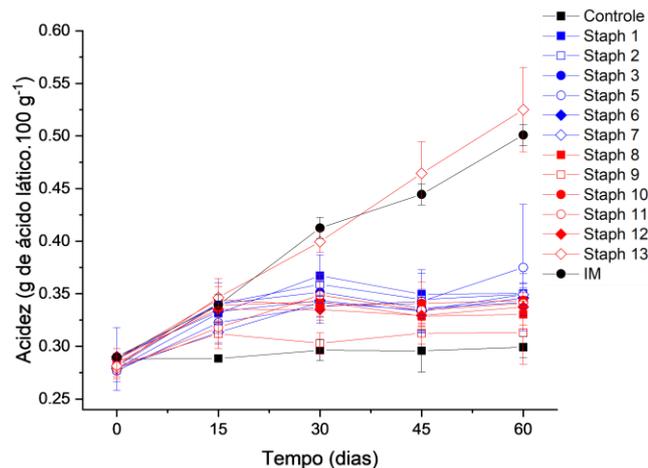
Legenda: Controle: Leite condensado sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (em azul): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (em vermelho): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão.

Para *S. carnosus* a fase de crescimento exponencial, 0 a 15 dias, foi a de alterações mais significativas na acidez do leite condensado (Gráfico 6), mas não foi observada diferença entre o efeito produzido pelas estirpes de *S. carnosus* obtidas de LCP (Staph 1, Staph 2, Staph 3, Staph 5, Staph 6, Staph 7) e de LCFP (Staph 8, Staph 10, Staph 11, Staph 12). A variação da acidez no leite condensado foi de $0,05 \pm 0,01$ g de ácido láctico/100g para estirpes obtidas de LCFP e $0,06 \pm 0,02$ g de ácido láctico/100g para estirpes obtidas de LCP (Gráfico 6). Posteriormente, a diminuição da velocidade de crescimento foi acompanhada de menor variação. Entre 15 a 30 dias a acidez variou $0,01 \pm 0,02$ g de ácido láctico/100g e entre 30 a 60 dias $0,00 \pm 0,02$ g de ácido láctico /100g.

S. piscifermentans (Staph 9) embora também tenha demonstrado capacidade de crescer em leite condensado não provocou mudanças significativas na acidez do produto. Ao final de 60 dias a acidez foi de $0,29 \pm 0,01$ para $0,31 \pm 0,03$ g de ácido láctico/100g, enquanto *S. gallinarum* (Staph 13) aumentou a acidez em 1,8 vezes, resultando em $0,53 \pm 0,04$ g de ácido láctico/100g. Esse resultado pode ser explicado pela capacidade *S. gallinarum* de fermentar a sacarose (Raj et al., 2023) e de produzir ácido a partir de vários carboidratos (Devriese, 1983), enquanto *S. piscifermentans*

e *S. carnosus* podem utilizar lactose, mas não a sacarose que está presente em maior proporção no leite condensado (Gupta *et al.*, 2018; Rosenstein *et al.*, 2009).

Gráfico 6 – Desenvolvimento de acidez em leite condensado integral provocado por *Staphylococcus* coagulase negativa, ao longo de 60 dias de incubação a 30 °C



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

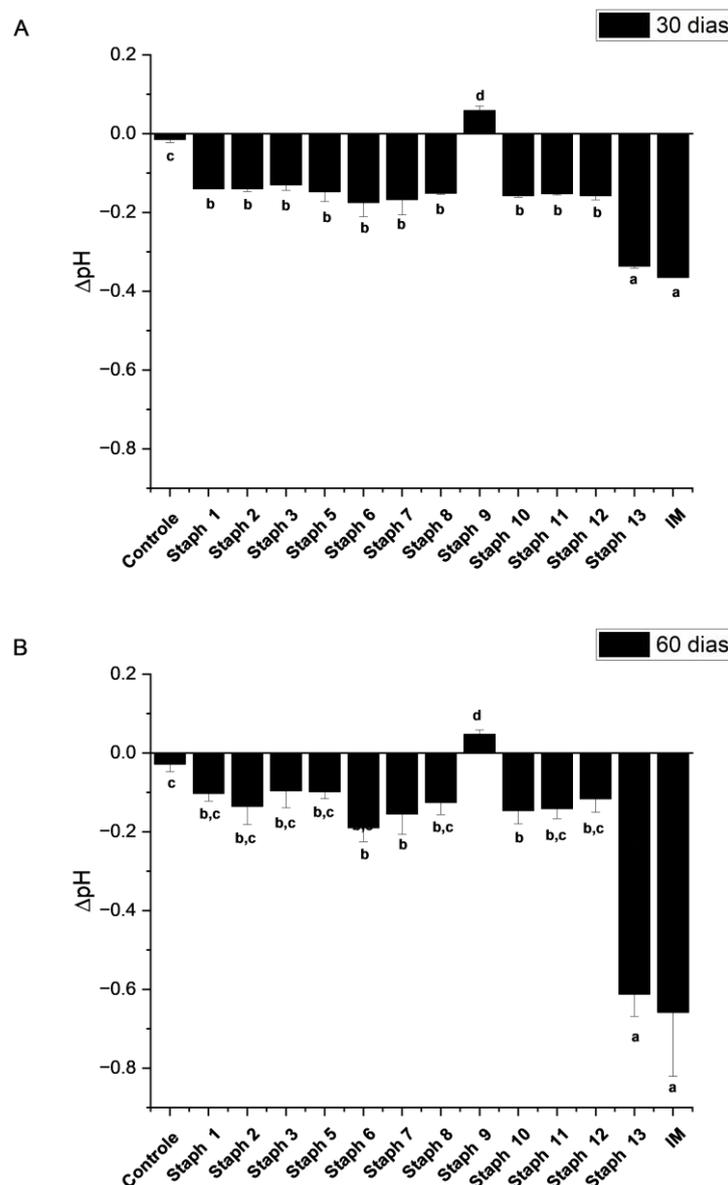
Legenda: Controle: Leite condensado sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (em azul): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (em vermelho): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão.

O aumento da acidez está intimamente relacionado a diminuição de pH nas amostras (Gráfico 7). A maior variação foi observada para *S. gallinarum* (Staph 13). Ao final de 60 dias, o pH da amostra diminuiu $0,61 \pm 0,06$ unidades, resultando no valor final de $5,70 \pm 0,06$ (Tabela 9). Neste caso, a variação do pH é estatisticamente igual a observada para amostras com inóculo misto ($0,66 \pm 0,16$ unidades). Isso indica que dentre os isolados *S. gallinarum* tem efeito predominante sobre o pH, pois não há diferença nos efeitos individuais de estirpes de *S. carnosus* (Staph 1, Staph 2, Staph 3, Staph 5, Staph 6, Staph 7, Staph 8, Staph 10, Staph 11, Staph 12) e *S. piscifermentans* (Staph 9), ao final de 30 e de 60 dias (Tabela 9).

Além disso, *S. piscifermentans* contribuiu para aumento do pH de leite condensado e compostos de caráter básico podem estar sendo produzidos. Nos trabalhos da literatura científica, que identificam a presença ou estudam o comportamento de *Staphylococcus* spp. em leite condensado (George *et al.*, 1959; Renhe *et al.*, 2018; Sutejo; Amarantini; Budiarmo, 2017) não foram encontradas

relações com a capacidade de redução de pH, o que pode ser considerado um diferencial deste trabalho.

Gráfico 7– Variação de pH de leite condensado integral por *Staphylococcus* coagulase negativa, após (A) 30 e (B) 60 dias de incubação a 30°C



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Controle: Leite condensado integral sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7: *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13: *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, $p > 0,05$).

Tabela 9 – pH de leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus* coagulase negativa, após 30 e 60 dias de incubação a 30°C

Estirpe utilizada no tratamento	pH	
	30 dias	60 dias
IM	5,95 ± 0,00 ^{Aa}	5,65 ± 0,02 ^{Ab}
Staph 13 (fp)	5,97 ± 0,00 ^{Aa}	5,70 ± 0,06 ^{Ab}
Staph 5 (p)	6,16 ± 0,02 ^{Ba}	6,11 ± 0,18 ^{Ba}
Staph 6 (p)	6,14 ± 0,04 ^{Ba}	6,12 ± 0,05 ^{Ba}
Staph 7 (p)	6,14 ± 0,04 ^{Ba}	6,16 ± 0,05 ^{BCa}
Staph 10 (fp)	6,15 ± 0,00 ^{Ba}	6,16 ± 0,03 ^{BCa}
Staph 11 (fp)	6,16 ± 0,00 ^{Ba}	6,17 ± 0,02 ^{BCa}
Staph 2 (p)	6,17 ± 0,01 ^{Ba}	6,17 ± 0,05 ^{BCa}
Staph 8 (fp)	6,16 ± 0,00 ^{Ba}	6,18 ± 0,03 ^{BCa}
Staph 12 (fp)	6,15 ± 0,01 ^{Ba}	6,19 ± 0,03 ^{BCa}
Staph 1 (p)	6,17 ± 0,00 ^{Ba}	6,21 ± 0,03 ^{BCa}
Staph 3 (p)	6,18 ± 0,01 ^{Ba}	6,21 ± 0,04 ^{BCa}
Controle	6,30 ± 0,01 ^{Ca}	6,27 ± 0,02 ^{Ca}
Staph 9 (fp)	6,37 ± 0,01 ^{Ca}	6,36 ± 0,02 ^{Da}

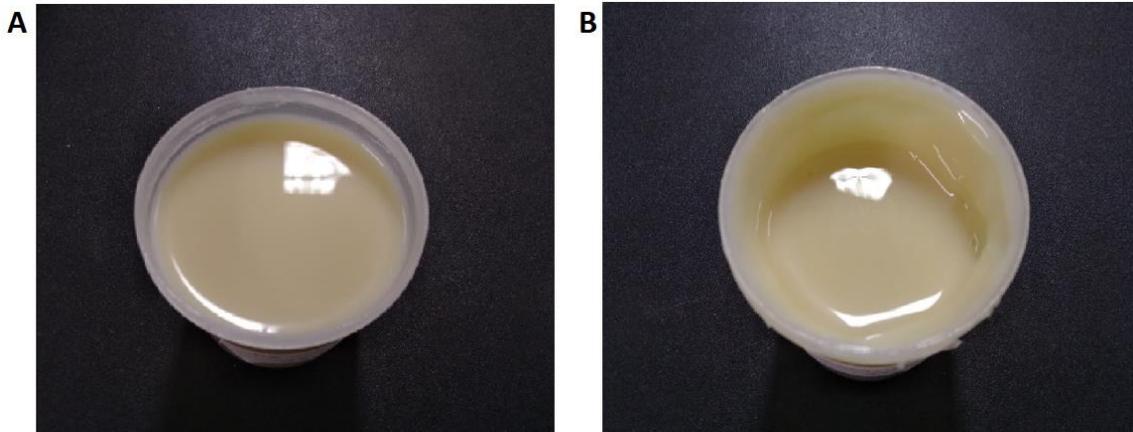
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Controle: Leite condensado integral sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (p): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (fp): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão.

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha letra, não diferem estatisticamente entre si, (Teste Student-Newman-Keuls $p > 0,05$).

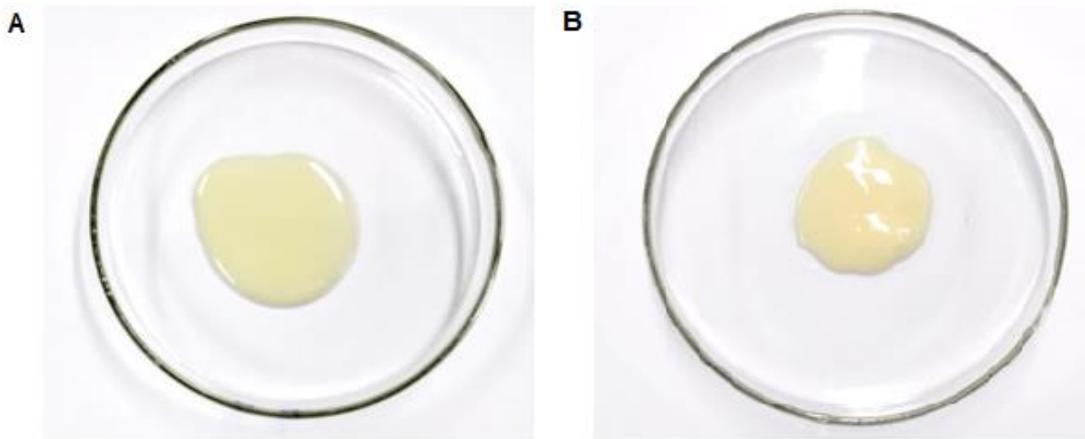
A redução do pH e aumento da acidez do leite condensado foi acompanhado de uma mudança visualmente percebida para amostras inoculadas com *S. gallinarum* (Staph 13) e com inóculo misto (IM). Aos 30 dias de experimento uma camada superficial espessa começou a ser formada (Figura 14b) e aos 60 dias, a alteração de consistência foi visível em toda a amostra (Figura 15). As amostras espessadas tiveram elevado aumento da acidez e odor não característico para leite condensado, assim como Rice e Downs (1923) descreveram para espessamento de origem microbiana.

Figura 14 – Leite condensado integral (A) utilizado como controle e (B) inoculado com *Staphylococcus gallinarum*, após 30 dias de incubação a 30 °C



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 15 – Leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus gallinarum* em (A) 0 dias e (B) 60 dias de incubação a 30°C



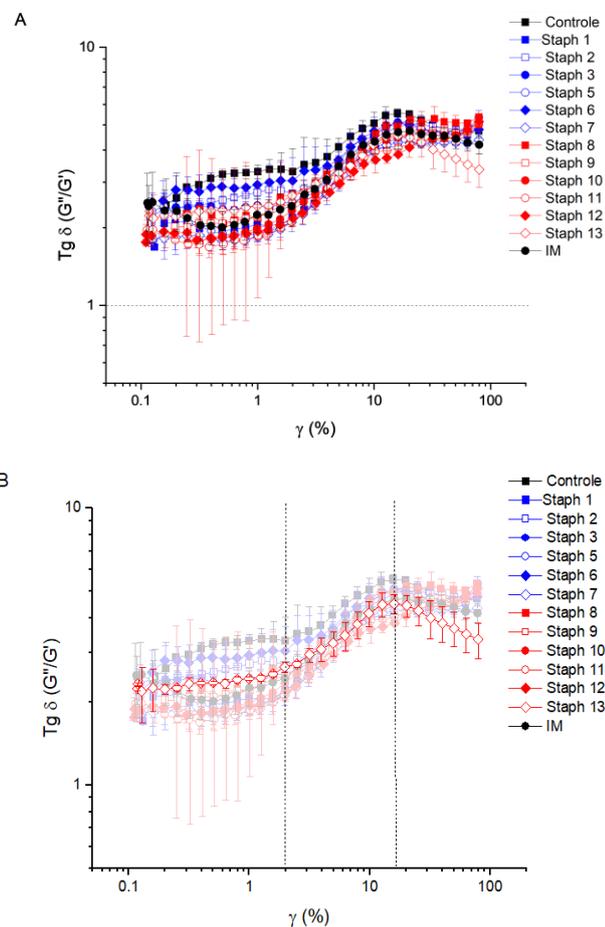
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Leite condensado inoculado com *Staphylococcus gallinarum* com A) 0 dias e B) 60 dias de incubação a 30°C.

De acordo com Downs (1925), a disponibilidade de água reflete no tempo em que o espessamento ocorre. Amostras com 40% a 35% de teor de umidade desenvolveram espessamento após 2 semanas (14 dias), 30% em 3 semanas (21 dias) e 27% em 8 semanas (56 dias). LCML tem 29,88% de umidade e os primeiros sinais de espessamento foram observados aos 30 dias. Quanto a amostras inoculados com *S. carnosus* e *S. piscifermentans* visualmente não foram identificadas alterações.

A análise por reologia oscilatória em função da amplitude (Gráfico 8a) demonstrou que aos 60 dias de incubação as amostras ainda têm um comportamento predominantemente fluídico ($\text{tg } \delta > 1$). O valor de $\text{tg } \delta$ permaneceu acima de 1 para toda faixa de varredura. Quando a amostra tende a ter comportamento fluídico $\text{tg } \delta > 1$ e quando tende a ter comportamento mais rígido, típico de sólidos $\text{tg } \delta < 1$. Amostras inoculadas com microrganismos tem valores de $\text{tg } \delta$ mais próximos de um em comparação ao controle. Isso significa que a presença de microrganismos diminuiu a fluidez.

Gráfico 8 – Reologia oscilatória com variação de amplitude para leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus* coagulase negativa



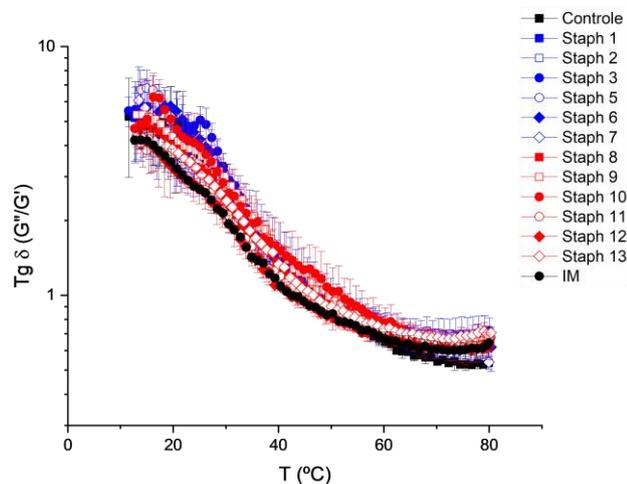
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Controle: Leite condensado integral sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (em azul): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (em vermelho): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão; (A) representa a relação entre tangente de delta ($\text{Tg } \delta$) e amplitude de deformação (γ) em %; (B) destaca a amostra inoculada com *S. gallinarum* (Staph 13).

Em torno de 2% de amplitude há um ponto de inflexão que determina a região de viscoelasticidade linear (LVE), ou seja, o limite de amplitude de deformação na qual a estrutura do fluido é reservada (Gráfico 8b). Após LVE inicia-se o regime de fluxo. A amostra adicionada de *S. gallinarum* (Staph 13) tem um segundo ponto de inflexão em 16,04% de amplitude de deformação. À medida que tende a deformar para o dobro do seu tamanho inicial ($\gamma\% = 100$), a amostra tem um comportamento mais rígido, em comparação aos outros tratamentos.

A perda de água provoca o aumento de rigidez de leite condensado (Gráfico 9). Entretanto, em experimento com oscilação de amplitude para amostras incubadas 30 °C, por 60 dias, não houve indícios que o aumento de rigidez foi causado por perda de água, visto que não há diferença significativa do teor de umidade dos tratamentos em relação ao controle (Tabela 10).

Gráfico 9 – Reologia oscilatória com variação de temperatura para leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus* coagulase negativa



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Controle: Leite condensado integral sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7 (em azul): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13 (em vermelho): *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus* coagulase negativa obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão; Tg δ: tangente de delta; T: temperatura em grau celsius.

A produção de macromoléculas também contribui para tornar as amostras mais rígidas. Foi demonstrado que *S. gallinarum* (Staph 13) e *S. piscifermentans* (Staph 9) são produtores de polissacarídeo extracelular (EPS). Não foi identificada a produção

de EPS para as estirpes de *S. carnosus*, mas isso não significa que não estejam produzindo outros tipos de macromoléculas.

Tabela 10 – Teor de umidade de leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus coagulase negativa*, após 60 dias de incubação a 30 °C

Estirpe utilizada no tratamento	Teor de umidade (%)
Controle	28,67 ± 0,56 ^A
Staph 1	28,47 ± 0,71 ^A
Staph 2	29,11 ± 0,83 ^A
Staph 3	28,65 ± 0,87 ^A
Staph 5	28,58 ± 0,33 ^A
Staph 6	28,29 ± 0,68 ^A
Staph 7	28,75 ± 0,17 ^A
Staph 8	28,33 ± 0,43 ^A
Staph 9	28,73 ± 0,08 ^A
Staph 10	29,41 ± 0,74 ^A
Staph 11	28,14 ± 0,88 ^A
Staph 12	27,81 ± 1,27 ^A
Staph 13	27,82 ± 1,03 ^A
IM	28,13 ± 1,16 ^A

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Controle: Leite condensado integral sem a presença de microrganismos; Staph 1, 2, 3, 5, 6, 7: *Staphylococcus coagulase negativa* obtido de leite condensado integral padrão; Staph 8, 9, 10, 11, 12, 13: *Staphylococcus coagulase negativa* obtido de leite condensado integral fora do padrão; IM: inóculo misto de *Staphylococcus coagulase negativa* obtido de leite condensado integral fora do padrão e padrão.

Médias seguidas de mesma não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna (Teste Student-Newman-Keuls $p > 0,05$).

Ao final dos 60 dias de experimento, as amostras foram mantidas sob refrigeração a 8 °C. Após 30 dias, foi observado o espessamento completo da amostra de leite condensado inoculada com *S. gallinarum* Staph 6 (Figura 16). Downs (1925) atribuiu a atividade de protease como uma provável razão para espessamento de origem microbiana e Devriese (1983) descreveu, que estirpes de *S. gallinarum* possuem capacidade de hidrolisar caseína. Contudo, o teste de produção de

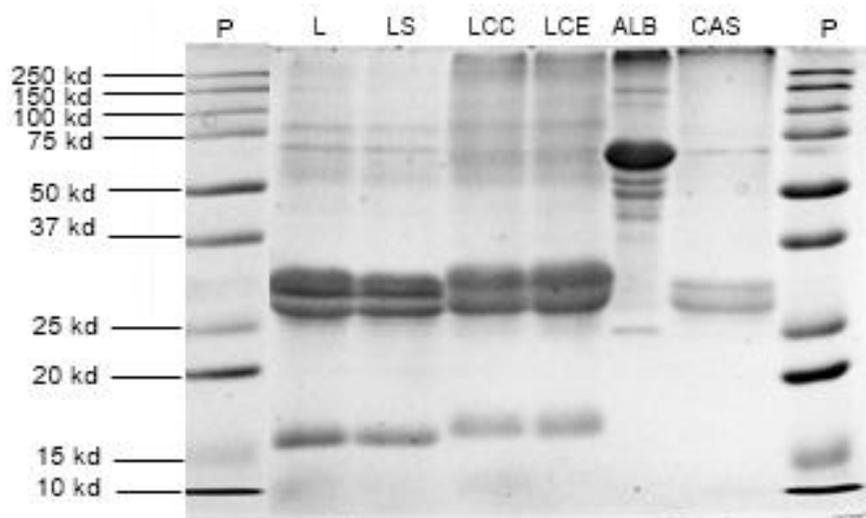
proteases para *S. gallinarum* foi negativo (Tabela 7) e a SDS-PAGE das amostras não revelou sinais de degradação de caseína (Figura 17).

Figura 16 – Leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus gallinarum* após 90 dias



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 17 – Avaliação de proteólise em leite UHT e leite condensado integral inoculado com *Staphylococcus gallinarum*



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: P: marcador de peso molecular; L: leite UHT; LS: Leite UHT adicionado de sacarose; LCC: leite condensado integral incubado por 60 dias a 30 °C e utilizado como controle; LCE: leite condensado integral incubado por 60 dias a 30 °C e com característica de espessamento; ALB: padrão de albumina; CAS: padrão de caseína.

Um teste realizado em leite UHT com e sem a presença de sacarose (45 g em 100 mL) demonstrou a influência do açúcar na desestabilização coloidal do leite. Após

6 dias de incubação, o pH das amostras de leite com presença de sacarose diminuiu $1,30 \pm 0,01$ unidades de pH (Tabela 11). Ao final de 9 dias a variação total foi de $1,79 \pm 0,01$, acompanhada de coagulação e aumento de viscosidade. O resultado da SDS-PAGE realizadas nessas amostras também não demonstrou diferença nas frações de caseína (Figura 17).

Tabela 11 – Variação de pH para leite UHT, com e sem a presença de sacarose, inoculado com *Staphylococcus gallinarum*

Amostra	Tempo		
	0 dias	6 dias	9 dias
Leite UHT	$6,63 \pm 0,01^B$	$6,22 \pm 0,00^B$	$6,33 \pm 0,03^B$
Leite UHT + sacarose	$6,47 \pm 0,00^A$	$5,17 \pm 0,00^A$	$4,68 \pm 0,00^A$

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Legenda: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si (Teste T Student, $p > 0,05$).

Os resultados sugerem que espessamento em leite condensado, assim como a coagulação do leite UHT adicionado de sacarose, pode ser resultado de uma desestabilização de proteínas provocado pela redução do pH e não por atividade de proteases.

A caseína é a principal proteína do leite bovino e é encontrada principalmente na forma de micelas. A micela é composta de 94% de proteínas e 6% de constituintes de baixo peso molecular, como o fosfato de cálcio, magnésio e citrato. No interior da micela estão distribuídas as frações α -caseína e β -caseína, devido as propriedades hidrofóbicas, enquanto na superfície das micelas está localizada a k-caseína. Na fase C-terminal da k-caseína tem resíduos polares que mantêm região externa da micela carregada negativamente (Cruz *et al.*, 2016).

A acidificação é um dos fatores que afetam a estabilidade coloidal do leite, pois causa a migração de fosfato de cálcio, magnésio e citrato do interior da micela para a fase solúvel. Isso resulta na diminuição da carga negativa da caseína, que se torna insuficiente para separá-las. Além disso, a diminuição da carga afeta as interações eletrostáticas que mantêm a cadeia de K- caseína estendida, o que diminui a estabilização estérica. Desse modo, as micelas passam a se difundir mais próximas umas das outras e forças atrativas de curto alcance provocam a agregação de micelas, conseqüentemente, ocorre a transição sol-gel (Dalglish; Corredig, 2012).

Em leite tratado termicamente esse efeito é ainda mais pronunciado. As proteínas do soro desnaturadas se associam à superfície da micela formando complexos com a k-caseína, o que facilita a ligação com outras micelas através de pontes dissulfeto. Desse modo, a gelificação ácida pode acontecer em pH 5,3 antes de se atingir o ponto isoelétrico da caseína de 4,6 (Cruz *et al.*, 2016; Dalgleish; Corredig, 2012). Ao final de 60 dias de experimento o pH das amostras espessadas inoculadas com *S. gallinarum* foi de $5,70 \pm 0,06$. A produção de EPS pela estirpe pode ter um efeito adicional, já que o espessamento em leite condensado foi observado em pH acima de 5,3.

6 CONCLUSÕES

Amostras de leite condensado integral fornecidas por uma indústria de laticínios brasileira e com características de espessamento (LCFP) apresentaram atributos não característicos em comparação ao leite condensado padrão (LCP), como pH mais baixo, aumento de acidez, sedimentação, maior tamanho de partículas e de cristais de lactose, maior rigidez e viscosidade.

Staphylococcus coagulase negativa foi o grupo de microrganismo predominantemente isolado das amostras. *S. carnosus*, *S. piscifermentans* e *S. gallinarum* foram as principais espécies isoladas de LCFP, enquanto em LCP apenas isolados *S. carnosus*.

Não existem diferenças para os parâmetros colorimétricos, atividade de protease e índice HMF, entre os dois grupos de amostras. Também não foram identificados sinais de degradação de caseína. As características de composição como teor de umidade, sólidos totais, gordura e sólidos solúveis foram diferentes para LCFP e LCP, mas estão de acordo com os valores encontrados em outros estudos.

A atividade microbiana de *Staphylococcus* coagulase negativa produziu em leite condensado aumento de acidez e diminuição de pH. As alterações mais relevantes e que resultaram na característica de espessamento foram provocadas por *Staphylococcus gallinarum*. *S. gallinarum* é um patógeno oportunista capaz de aumentar a acidez, reduzir o pH, alterar a aparência e viscosidade de leite condensado. Os resultados sugerem que o desenvolvimento de espessamento por *S. gallinarum* é, nesse caso, resultado de uma desestabilização coloidal do leite provocada por acidificação e não por atividade de proteases como presumido por outros autores.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M.; BENOLIEL, C.; DRIDER, D.; DHULSTER, P.; CHIHIB, N.. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 196, n. 7, p. 453-472, 18 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>.
- ALI, A. A.; FISCHER, R. M.. Implementation of haccp to bulk condensed milk production line. **Food Reviews International**, Petersburg, v. 18, n. 2, p. 177-190, 2002.
- ALLA, M.; CONTE, G.; GRASSI, A.; ESIN, S.; SERRA, A.; MELE, M.; GIOVANNETTI, M.; AGNOLUCCI, M.. Novel Yeasts Producing High Levels of Conjugated Linoleic Acid and Organic Acids in Fermented Doughs. **Foods**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 2087, 3 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10092087>.
- ALVES, N. M. G; GOMES, E. R.; PEREIRA, J.P.F.; PERRONE, I.T.; OLIVEIRA, L.F.C.; STEPHANI, R.. Estudo da temperatura de fusão e solubilidade dos cristais de lactose em leite condensado utilizando microscopia óptica e espectroscopia Raman. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 4, p. 222–231, 2020.
- ANEMA, S. G. Effect of milk solids concentration on the pH, soluble calcium and soluble phosphate levels of milk during heating. **Dairy Science and Technology**, v. 89, n. 5, p. 501–510, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADOS - ABRAS. **Super Hiper. CONSUMIDORES E CATEGORIAS**. Ano 46, número 527, jun/jul 2020. Disponível em: <<https://www.abras.com.br/>>. Acesso em: 03 dez 2021
- BAKER, J. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 875-879, jun. 1984. American Society for Microbiology.
- BANNERMAN, T. L.. New Staphylococcus Species. **Clinical Microbiology Newsletter**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 73-76, maio 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0196-4399\(96\)87294-1](http://dx.doi.org/10.1016/0196-4399(96)87294-1).
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 870-926, out. 2014.
- BEDIM, C. P.; FIOR, J. J.. Caracterização física de amostras de leite condensado comercializadas em jundiáí-sp. **Revista Engenho**, v. 6, n.9 , p. 89-102, jun. 2014. Disponível em: <https://revistas.anchieta.br/index.php/RevistaEngenho/article/view/839>. Acesso em: 8 maio 2023
- BRASIL. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, 30 de mar. 2017

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 47 de 26 de outubro de 2018. Fixa a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o leite condensado. **Diário Oficial da União**, 06 de nov. 2018a

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76 de 26 de novembro de 2018. Fixa a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, 30 de nov. 2018b

BRYKSA, B.C.; YADA, R.Y. Bioquímica de alimentos: carboidratos. In: CAMPBELL-PLATT, Geoffrey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2015. Cap. 4. p. 58-67. Tradução de: Sueli Rodrigues Coelho e Soraya Imon de Oliveira.

CARVALHO, A.; MARTINS, E.; RODRIGUES, R. C.; SHUCK, P.; PERRONE, I. T. Tecnologia de lácteos concentrados e desidratados : o estado da arte da microbiologia de processo. **Indústria de Laticínios**, n. 121, 2017.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Boletim do Leite**. 2022. Disponível em: <https://cepea.esalq.usp.br/br/categoria/boletim-do-leite.aspx>. Acesso em: 19 mai. 2023.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; NALEPA, B.; SIERPIŃSKA, M.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł.. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready- to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 46, p. 222-226, abr. 2015.

CODEX ALIMENTARIUS. Standard for Sweetened Condensed Milks Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual. FAO/WHO, 1ed-1971, Rev. 2010. 2018.

COIMBRA-E-SOUZA, V.; ROSSI, C. C.; FREITAS, L. J. J.; BRITO, M. A. V. P.; LAPORT, M. S.; MARVAL, M. G. Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, v.102, n. 6, 2019.

CONSTANTINO, S. M.; SOUSA, R. G.. '**Composto lácteo**' vendido como versão de leite condensado gera críticas. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/composto-lacteo-vendido-como-versao-de-leite-condensado-gera-criticas-de-consumidores-230029/>. Acesso em: 14 dez. 2022.

CORREA, K. P.; PACHECO, A. F. C; COELHO, F.; LEITE JUNIOR, B.R.C.; PAIVA, P. H. C. **Leite condensado**:: origem, legislação e tecnologia. origem, legislação e tecnologia. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/leite-condensado-origem-legislacao-e-tecnologia-230558/>. Acesso em: 14 dez. 2022.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENGO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados** . v, 1 , 1. e.d. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2016

DALGLEISH, D.G.; CORREDIG, M.. The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. **Annual Review Of Food Science And**

Technology, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 449-467, 10 abr. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. [Digite o Local da Editora]: Grupo A, 2019. *E-book*. ISBN 9788582715468. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715468/>. Acesso em: 08 mai. 2023.

DEVRIESE, L. A.; POUTREL, B.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H.. Staphylococcus gallinarum and Staphylococcus caprae, Two New Species from Animals. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 480-486, 1 jul. 1983. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-33-3-480>.

DOWNS, P. A. A Study of the Organisms Causing Thickening of Sweetened Condensed Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 8, n. 4, p. 344–369, 1925.

EWINGS, K. N.; O'CONNOR, R. E.; MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. The Australian Journal of Dairy Technology, v. 39, n. 2, p. 65-68, 1984.

FALK, D; GUERING, S J. Differentiation of Staphylococcus and Micrococcus spp. with the Taxo A bacitracin disk. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 719-721, set. 1983. American Society for Microbiology.

FARIA, A.B.; COSTA, S. S.; SILVA, J. A. G.; OLIVEIRA, L. A.; LEÃO, P. V. T.; MEDEIROS, J. S.; SANTOS, G. O.; COSTA, A. C.; SILVA, M. A. P. influência do desnate nas características físico-químicas e sensoriais de leite condensado. In: KRAHAL, G. (org.). **Estudos em Zootecnia e Ciência Animal**3. Ponta Grossa: Atena, 2020. Cap. 9. p. 67-76. Disponível em: <<https://sistema.atenaeditora.com.br/index.php/admin/api/artigoPDF/32872>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

FELIPE, A. I. A.; MELCÓN, B.; ZAPICO, J. Structural changes in sweetened condensed milk during storage: An electron microscopy study. **Journal of Dairy Research**, v. 58, n. 3, p. 337–344, 1991.

FERREIRA, G.E.C. A.; BARBOSA, J.C; SANTOS, K.K; COSTA, S. P.; BARBOSA, I. C. C; SOUZA, E.C.; SILVA, A. S. Análises físico-químicas e quimiométrica de leites condensados. **56o Congresso Brasileiro de Química**. Belém. 2016. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2016/trabalhos/10/9603-23069.html>>. Acesso em: 26 jan. 2022.

FLAUZINO, R. D.. **Influência da temperatura e do teor de gordura nos parâmetros reológicos do leite condensado e creme de leite**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2007. Cap. 3. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90794/flauzino_rd_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 8 maio 2023.

FRANCISQUINI, J. D; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F. S.; SHUCK, P.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Reação De Maillard: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48–57, 2017.

- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, n.42, p.872-874,1989
- GEORGE, E.; OLSON, J.C.; JEZESKI, J.J.; COULTER, S.T.. The Growth of Staphylococci in Condensed Skimmilk. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 816-823, maio 1959. American Dairy Science Association
- GHYSELINCK, J.; VAN HOORDE, K.; HOSTE, B.; HEYLEN, K.; VOS, P.. Evaluation of MALDI-TOF MS as a tool for high-throughput dereplication. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 86, n. 3, p. 327-336, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.004>.
- GIRI, V.P.; SHUKLA, P.i; TRIPATHI, A.; KUMAR, N.; VERMA, P.; PANDEY, S.; MISHRA, A.. A Short Review on Advances in Nanosystems Emerging as an Effective Approaches to Control Pathogenesis of Staphylococcus spp. **Global Journal Of Infectious Diseases And Clinical Research**, [S.L.], p. 049-055, 19 ago. 2021. Peertechz Publications Private Limited. <http://dx.doi.org/10.17352/2455-5363.000046>.
- GOURDON, M.; MURA, E. Performance evaluation of falling film evaporators in the dairy industry. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 101, p. 22-31, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.004>.
- GUPTA, S.; INDRA, R.; MAURYA, P. K.; PARHI, J.; SHARMA, S.; CHANDRAVANSI, S.; MAJUMDAR, R. K.. Isolation and Characterization of Predominant Bacteria, Staphylococcus piscifermentans Associated with Traditional Fermented Fish Products of Northeast India. **International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 05, p. 1758-1771, 10 maio 2018. Excellent Publishers. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.205>.
- HARBOUL, K.; YAMANI, M.EI; HAMMANI, K.I; EL-KARKOURI, A.i. Study of potential capacity for Cr(VI) reduction by Staphylococcus gallinarum strain VIII1 immobilized, resting and permeabilized. **International Journal Of Environmental Studies**, [S.L.], p. 1-18, 8 mar. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00207233.2022.2044698>.
- HARTMANN, S.; WOLF, G.; HAMMES, W.P.. Reduction of Nitrite by Staphylococcus carnosus and Staphylococcus piscifermentans. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 323-328, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80422-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80422-4).
- HOUGH, G.; MARTINEZ, E.; CONTARINI, A. Sensory and Objective Measurement of Sandiness in Dulce de Leche, a Typical Argentine Dairy Product. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 604–611, 1990.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6734:2010**: Sweetened condensed milk — Determination of total solids content (Reference method). 2010.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 19662:2018**: Milk — Determination of fat content — Acido-butyrometric (Gerber method). 1 ed. 2018. 11 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (org.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. 1 edição digital.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2019**. 2020. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf. Acesso em: 6 fev. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção de leite**. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>. Acesso em: 31 jul. 2023.

IRLINGER, F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 126, n. 3, p. 302-310, 1 set. 2008.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health Jhalka. **BioMed Research International**, p. 9, 2014.

KEENEY, M.; BASSETTE, R. Detection of Intermediate Compounds in the Early Stages of Browning Reaction in Milk Products. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 6, p. 945–960, 1959.

KIEŁCZEWSKA, K.; AMBROZIAK, K.; KRZYKOWSKA, D.; ALJEWICZ, M. The effect of high-pressure homogenisation on the size of milk fat globules and MFGM composition in sweet buttermilk and milk. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 113, p. 104898, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104898>

KOLAWOLE, D. O.; SHITTU, A. O.. Unusual recovery of animal staphylococci from septic wounds of hospital patients in Ile-Ife, Nigeria. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 87-90, fev. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00337.x>.

LAROSA-RAMOS, M. A. de; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; SARMIENTO-SILVA, R. E.; AGUILERA-ARREOLA, M.G.; ALCÁNTAR-CURIEL, M.D.; BETANZOS-CABRERA, G.I; RODRÍGUEZ-MÁRTINEZ, S.; CANCINO-DÍAZ, M. E.; CANCINO-DÍAZ, J. C.. Non-epidermidis coagulase-negative Staphylococcus isolated from farm animals can inhibit the hemagglutinating activity of Newcastle disease virus and bovine parainfluenza virus type 3. **Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases**, [S.L.], v. 76, p. 101649, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101649>.

LÖFBLOM, J.; ROSENSTEIN, R.; NGUYEN, M.; STÅHL, S.; GÖTZ, F.. Staphylococcus carnosus: from starter culture to protein engineering platform. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 101, n. 23-24, p. 8293-8307, 2 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8528-6>

LOHMAN, M.; HARTEL, R. Effect of milk fat fractions on fat bloom in dark chocolate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 267-276, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D. A.; FONSECA, F. G.. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Rio: Artmed, 2016. p. 171.

MANJI, B.; KAKUDA, Y.. The Role of Protein Denaturation, Extent of Proteolysis, and Storage Temperature on the Mechanism of Age Gelation in a Model System. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 1455-1463, jun. 1988. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(88\)79708-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(88)79708-8).

MARIOTO, L. R. M.; DANIEL, G. C.; GONZAGA, N.; MAREZE, J.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrofica, termofílica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 21, 12 p., 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v21e-44034>.

MASSARI, M. R.. **Substituição de lactose em pó micronizada por permeado de soro em pó micronizado em leite condensado: efeito sobre a cristalização da lactose, características físico-químicas, reológicas e microbiológicas**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018..

MAURÍCIO, É. F.; TANGUY, G.; FLOCH-FOUÉRÉ, C. L.; BEAUCHER, E.; DOLIVET, A.; CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T. Comparison of experimental setups for the production of milk concentrates and subsequent characterization. **Lwt**, v. 151, n. July, 2021.

MCCMAHON, D. J.; BROWN, R. J.. Enzymic Coagulation of Casein Micelles: a review. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 67, n. 5, p. 919-929, maio 1984. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81390-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81390-9).

MENDES, P. N.; FURTADO, M. A. M.; PERRONE, Í. T. Osmose reversa na produção de leite condensado: uma possibilidade tecnológica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 388, p. 68–76, 2012.

MEIRELLES, M. “O mais popular dos doces brasileiros”: História crítica do brigadeiro. **Revista Aedos**, v. 11, n. 25, p. 330–354, 2019.

MING, T.; GENG, L.; FENG, Y.; LU, C.; ZHOU, J.; LI, Y.; ZHANG, D.; HE, S.; LI, Ye; CHEONG, L.. ITRAQ-Based Quantitative Proteomic Profiling of *Staphylococcus aureus* Under Different Osmotic Stress Conditions. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-16, 29 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01082>

Ministério da Saúde - MS. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília, 1997. 63 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em: 2 jun. 2021.

MORISON, K. R.; BROOME, S. R.. Upward vapour flows in falling film evaporators and implications for distributor design. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 114, p. 1-8, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.04.015>.

- MORTIER, L.; BRAEKMAN, A.; CARTUYVELS, D.; RENTERGHEM, R. V.; BLOCK, J. D. Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 4, n. 4, p. 221–225, 2000.
- MÖRSCHBÄCHER, V.; REMPEL, C.; MACIEL, M.. Microbiological quality of refrigerated raw milk in the dairy farm and after transport to the processing dairy plant. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.L.], v. 84, p. 1-5, 1 fev. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000422016>.
- MOSTARO, L.. **Como é feito o leite condensado?** 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/como-e-feito-o-leite-condensado-223927/>. Acesso em: 19 maio 2023.
- NETO, R. O.; SIQUEIRA, K. B.. O leite condensado brasileiro. **Revista Indústria de Laticínios**, [S.L.], n. 148, p. 44-46, jan. 2021
- NICKERSON, T. A.; MOORE, E. E. Solubility Interrelations of Lactose and Sucrose. **Journal of Food Science**, v. 37, n. 1, p. 60–61, 1972.
- NIEUWENHUIJSE, H. **Concentrated Dairy Products: Sweetened Condensed Milk**. [s.l.] Elsevier, 2016.
- NUNES, R. S. C; SOUZA, C.P.; PEREIRA, K. S.; AGUILA, E. M.D.; PASCHOALIN, V. M. F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2641–2653, 2016.
- OHARA-NEMOTO, Y.; HARAGA, H.; KIMURA, S.; NEMOTO, T. K.. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal–oral trafficking of the bacteria. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 95-99, 1 jan. 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47561-0>.
- OLIVEIRA, R. P.; SILVA, J. G.a; ARAGÃO, B. B.; CARVALHO, R. G.; JULIANO, M. A.; FRAZZON, J.; FARIAS, M. P. O.; MOTA, R. A.. Diversity and emergence of multi-resistant Staphylococcus spp. isolated from subclinical mastitis in cows in of the state of Piauí, Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 2215-2222, 8 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-022-00822-1>.
- OLIVEIRA, S.D; SANTOS, L.R; SCHUCH, D.M.T; SILVA, A.B; SALLE, C.T.P; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 25-35, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00028-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00028-7).
- ONDA, T.; YANAGIDA, F.; TSUJI, M.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K.. Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 162-168, ago. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01371.x>.
- PANTŏček, R.; SEDLÁček, I.; DOŁKAř, J.; ROSYPAL, S.. Complex genomic and phenotypic characterization of the related species Staphylococcus carnosus and Staphylococcus piscifermentans. **International Journal Of Systematic And**

- Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 941-951, 1 jul. 1999. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-3-941>.
- PAULUS, W., Directory of microbicides for the protection of materials: a handbook, Springer, 2005.
- PEREIRA, J. P. F. *et al.* Water versus lactose solution as a dispersion medium for particle analysis in sweetened condensed milk by laser diffraction. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 928–931, 2019.
- PERRONE, I.T.; CARVALHO, A. F.; RENHE, I. T.; STEPHANI, R.; SILVA, P. H. F. Processamento do Leite Condensado. In: CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P.B.; OLIVEIRA, C.A. F.; CORASSIN, C. H.. **Processamento de Leites de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. Cap. 6. p. 134-172.
- PEXARA, A.; SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.. Occurrence, antibiotic resistance and enteroxigenicity of *Staphylococcus* spp. in tonsils of slaughtered pigs in Greece. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 453-472, 14 jul. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13342>.
- PIMENTA, R. L.; MELO, D. A.; BRONZATO, G. F.; SOUZA, V. R. S.; HOLMSTRÖM, T. C. N.; COELHO, S. M. O.; COELHO, I.S; SOUZA, M. M. S. Characterization of *Staphylococcus* spp. isolates and β -lactam resistance in broiler chicken production. **Brazilian Journal Of Veterinary Medicine**, [S.L.], v. 43, 2021. Revista Brasileira de Medicina Veterinaria. <http://dx.doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm000720>.
- PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotóxicas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado a produção de leite UHT**. 2004. 111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- RAJ, C.T. D. KANDASWAMY, S.i; SURYAVANSHI, M.V.; RAMASAMY, K.P.; RAJASABAPATHY, R.; JAMES, R. A. Genomic and metabolic properties of *Staphylococcus gallinarum* FCW1 MCC4687 isolated from naturally fermented coconut water towards GRAS assessment. **Gene**, [S.L.], v. 867, p. 147356, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2023.147356>.
- RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; DEUS, . F. R.; SOUSA, D. C.; CAMARGO, C. H.; GODINHO, N. C.; GALINDO, L. A.; SOARES, T. C. S; ARAËJO, J. P.. Polymerase Chain Reaction Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Brazilian Minas Cheese. **Foodborne Pathogens And Disease**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 1121-1123, set. 2010. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0478>.
- RENHE, I. R. T. ; PEREIRA, D. B. C.; SÁ, J. F. O.; SANTOS, M. C.; TEODORO, V. A. M.; MAGALHÃES, F. A. R.; PERRONE, I. T.; SILVA, P. H. F. Characterization of physicochemical composition, microbiology, sensory evaluation and microscopical attributes of sweetened condensed milk. v. 2061, n. June, p. 293–298, 2018.
- RENHE, I. R. T.; PEREIRA, D. B. C.; SÁ, J. F. O.; SANTOS, M. C.; TEODORO, V. A. M.; MAGALHÃES, F. A. R.; PERRONE, I. T.; SILVA, P. H. F. Characterization of physicochemical composition, microbiology, sensory evaluation and microscopical attributes of sweetened condensed milk. v. 2061, n. June, p. 293–298, 2018.

RENHE, I. R. T.; PERRONE, I. T.; SILVA, P. H. F.(org.). **Leite condensado: identidade, qualidade e tecnologia**. Juiz de Fora: Templo, 2011. 232 p

RENTERO, N.. Projeção de tendências para o leite aqui e lá fora. In: LEITE, Embrapa Gado do. **Anuário do Leite**. Juiz de Fora: Embrapa, 2023. p. 22-24. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuário-leite-2023-leite-baixo-carbono>. Acesso em: 31 jul. 23.

RICE, F. E; DOWNS, P. A. Sweetened Condensed Milk: I. Bacterial Thickening. **Journal of Dairy Science**, v. 6, n. 6, p. 532–548, 1923.

Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Brasília, 2017. Alimentos. Brasília, DF, 1952

ROGERS, L. A.; DAHLBERG, E. F.; EVANS, F. R. The cause and control of bottons in sweetened condensed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 3, n. 6, p. 468–485, 1920.

ROSA, L. N. S.; REZENDE, J. P.; PIRES, A. C. S.. **Quais as diferenças entre leite, misturas e compostos lácteos?** 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/thermaufv/as-diferencas-misturas-e-compostos-lacteos-230690/>. Acesso em: 14 dez. 2022.

ROSENSTEIN, R.; NERZ, C.; BISWAS, L.; RESCH, A.; RADDATZ, G.; SCHUSTER, S. C.; GÖTZ, F. Genome Analysis of the Meat Starter Culture Bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 811-822, fev. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01982-08>.

SAMEL, R.; MUERS, M. M. The age-thickening of sweetened condensed milk: effects of temperature and storage. **Journal of Dairy Research**, v. 29, p. 259–267, 1962a.

SAMEL, R.; MUERS, M. M. The age-thickening of sweetened condensed milk: the effect of íons. **Journal of Dairy Research**, v. 29, p. 269–277, 1962b.

SAMEL, R.; MUERS, M. M. The age-thickening of sweetened condensed milk: rheological properties. **Journal of Dairy Research**, v. 29, p. 249–258, 1962c

SANTOS, M. C.; OLIVEIRA, J. N.; SILVA, P. H. F.; PERRONE, I. T.; RENHE, I. T. Avaliação de aspectos normativos do leite condensado brasileiro e no mundo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 39–47, 2009a

SANTOS, M. C. **Caracterização e avaliação microscópica de leites condensados produzidos no brasil**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de goiânia,GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237–1245, 2009b.

SIAVOSHI, F.; SAHRAEE, M.; HEYDARI, S.; SARRAFNEJAD, A.; SANIEE, P.; TAVAKOLIAN, A.; HEIDARIAN, S. Sugar-Rich Foods Carry Osmotolerant Yeasts

with Intracellular Helicobacter Pylori and Staphylococcus spp. **Middle East Journal Of Digestive Diseases**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 182-193, 19 jul. 2020. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.34172/mejdd.2020.181>.

SILVA, C.V. **Desenvolvimento de uma mistura láctea a base de soro de leite em substituição ao leite condensado para emprego na produção de sobremesas industriais**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p

SINGH, S. S.; MANDAL, S.; MATHIPI, V.; GHATAK, S.; KUMAR, N.S. Traditional fermented fish harbors bacteria with potent probiotic and anticancer properties. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 15, p. 283-290, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.007>.

SOROUR, H.K.; SHALABY, A.G.; ABDELMAGID, M. A.; HOSNY, R.A. Characterization and pathogenicity of multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci isolates in chickens. **International Microbiology**, [S.L.], 13 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-023-00354-0>.

STEBNITZ, V. C.; SOMMER, H. . The age thickening of sweetened condensed milk iv. The effect of salts. **Journal of Dairy Science**, n. 8, p. 101–115, 1935c.

STEBNITZ, V. C.; SOMMER, H. H. The Age Thickening of Sweetened Condensed Milk: II. Effect of Forewarming Conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 18, n. 12, p. 805–810, 1935a.

STEBNITZ, V. C.; SOMMER, H. The age thickening sweetened condensed milk: seasonal variations. **Journal of Dairy Science**, p. 757–768, 1935b.

SUTEJO, S. V. H.; AMARANTINI, C.; BUDIARSO, T.Y. Molecular detection of Staphylococcus aureus resistant to temperature in milk and its products. **Aip Conference Proceedings**, [S.L.], 2017.

ŠVEC, P.; PANTŏČEK, R.; PETRÁŁ, P.; SEDLÁČEK, I.; NOVÁKOVÁ, D.. Identification of Staphylococcus spp. using (GTG)5-PCR fingerprinting. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 451-456, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.09.004>..

TANASUPAWAT, S.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; KOZAKI, M.; KOMAGATA, K.. Staphylococcus piscifermentans sp. nov., from Fermented Fish in Thailand. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, [S.L.], v. 42, n. 4, p. 577-581, 1 out. 1992. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-42-4-577>.

TIBRA, N. K.; JALALI, S.; REDDY, A. K.; NARAYANAN, R.; AGARWAL, R.. Traumatic endophthalmitis caused by Staphylococcus gallinarum. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 365-366, 1 mar. 2010. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.011551-0>.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Separation and

quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis: Detection of milk adulterations. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 2, p. 209–218, 2002.

VIDAL, A.M.C.; NETTO, A.S.. Obtenção e processamento do leite e derivados. --, Pirassununga, p. 1-229, 28 mar. 2018. Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. <http://dx.doi.org/10.11606/9788566404173>.

WALSTRA, P.; WALSTRA, Pieter; WOUTERS, Jan T. M.; GEURTS, Tom J.. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. Eru: Crc Press, 2005. 782 p. Disponível em: https://www.google.com.br/books/edition/Dairy_Science_and_Technology/ynHLBQAAQBAJ?hl=pt-BR&gbpv=1&dq=pieter+walstra&printsec=frontcover. Acesso em: 10 ago. 2023

WEBB, B. H.; HUFNAGEL, C. F. The Effect of Conditions of Storage on the Viscosity of Sweetened Condensed Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 31, n. 1, p. 21–30, 1948.

WHITTIER, E. O. Lactose and its Utilization: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 27, n. 7, p. 505–537, 1944.

YU, D.; CHEN, Y.; PAN, Y.; LI, H.; MCCORMAC, M. A.; TANG, Y. W.. Staphylococcus gallinarum Bacteremia in a Patient with Chronic Hepatitis B Virus Infection. **Annals Of Clinical e Laboratory Science**, [s. l], v. 38, n. 4, p. 401-404, 2008.

ZHANG, Yechun; MUNIR, Muhammad Tajammal; UDUGAMA, Isuru; YU, Wei; YOUNG, Brent R.. Modelling of a milk powder falling film evaporator for predicting process trends and comparison of energy consumption. **Journal Of Food Engineering**, [S.L.], v. 225, p. 26-33, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.01.016>.