



**LEITE UHT: FATORES DETERMINANTES  
PARA SEDIMENTAÇÃO E GELIFICAÇÃO**

**PAULO HENRIQUE FONSECA DA SILVA**

**2003**

56269  
047985

**PAULO HENRIQUE FONSECA DA SILVA**

**LEITE UHT: FATORES DETERMINANTES  
PARA SEDIMENTAÇÃO E GELIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação "Strictu Sensu" em Ciência dos  
Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

**Orientador**

**Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BR  
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Paulo Henrique Fonseca da  
Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação /  
Paulo Henrique Fonseca da Silva -- Lavras : UFLA, 2003.  
150 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

~~UFLA.~~

Bibliografia.

1. Leite UHT. 2. Sedimentação. 3. Gelificação. 4. Desnatação. 5. estabilidade  
ao etanol. 6. Citrato. 7. Cálcio. 8. Fósforo. 9. Microorganismo psicrotrófico. 10.  
Contagem de célula somática. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163  
-637.1

**PAULO HENRIQUE FONSECA DA SILVA**

**LEITE UHT: FATORES DETERMINANTES  
PARA SEDIMENTAÇÃO E GELIFICAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Strictu Sensu” em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

**APROVADA em 27 de junho de 2003**

<b>Profa. Dra. Maria de Fátima Piccolo Barcelos</b>	<b>UFLA</b>
<b>Dr. José Renaldi Feitosa Brito</b>	<b>EMBRAPA</b>
<b>Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado</b>	<b>UFJF</b>
<b>Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães</b>	<b>EPAMIG</b>

**Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria como da ciência de Deus!  
Quão insondáveis são os seus juízos e quão inescrutáveis os seus caminhos!  
Romanos 11:33.

À minha esposa, Késia,  
aos meus filhos, Tiago e Gabriel,  
à minha avó Helena (*in memoriam*),  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois “a Ele seja a glória pelos séculos dos séculos” (Gálatas 1:5).

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pela oportunidade concedida e pelo apoio ao projeto.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, por ser o berço e o referencial da minha vida laticinista.

À Universidade Federal de Lavras, pela acolhida e pelos ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Gado de Leite, pela atenção e parceria inestimável ao projeto.

À Tetra Pak, por ter acreditado no projeto e apoiado decisivamente, aplicando recursos humanos, logísticos, técnicos e financeiros.

Às fábricas de laticínios situadas nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, por terem concedido acesso às suas linhas de produção e contribuído com suas equipes técnicas e colaboradores.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, por ter me honrado com sua orientação e pelo privilégio de ser seu amigo.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Picollo Barcelos, pela atenção dedicada e pelas recomendações expressadas.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado, pelo acompanhamento do trabalho e pela amizade duradoura.

Ao Dr. José Renaldi Feitosa Brito, pelo interesse demonstrado, pelo apoio laboratorial e pelas sugestões apresentadas.

Ao Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães, pelo convívio como colega de curso e pelo apoio na discussão dos dados do projeto.

Ao Dr. Geraldo Alvim Dusi, pelo prazer que me concede de conviver e aprender com alguém tão competente e amigo.

Ao Dr. Duarte Vilela, pelo incentivo e decisivo suporte ao trabalho.

Ao Dr. Ricardo Penof, pela visão estratégica do setor laticinista e pela inestimável decisão de apoiar o projeto.

Ao Prof. Gerson Occhi, em nome do qual agradeço a todos os colegas do Instituto de Laticínios Cândido Tostes pelo suporte e pelo estímulo.

Aos pesquisadores da EPAMIG, Paulo de Oliveira e Toshiyuki Tanaka, pela cortesia, pelos ensinamentos transmitidos e pela colaboração essencial para a análise dos dados.

Ao José Roberto Ferreira, amigo de longa data, que colaborou durante toda a execução do projeto.

Ao Prof. José Alberto Bastos Portugal, um incentivador constante e por não ter medido esforços para apoiar o projeto.

A Maria Antonieta Hilst, pelo suporte e pela atenção de alto valor, desde a concepção da idéia inicial do trabalho.

A Cleusa Maria de Carvalho, por ter sempre uma forma de colaborar.

A Heloisa Rios, pelo interesse e pelo envio de informações de mercado.

A Daniella Grassitelli, pela dedicação e amizade sempre presentes.

Ao Antônio José Xavier, pela discussão do projeto e pelo estímulo.

Ao Dr. Pastor Ponce Ceballo, do CENSA-Cuba, por ter me recebido e me incentivado com seus estudos sobre qualidade do leite.

Aos professores e funcionários do DCA/UFLA, pelo convívio e apreço.

Aos diretores, gerentes, técnicos e colaboradores das fábricas de laticínios, que me receberam com afeto e profissionalismo.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Alimentos, do Laboratório de Qualidade do Leite e da Biblioteca da Embrapa-Gado de Leite, por resistirem junto comigo até o fim do trabalho.

Ao Eduardo e a Danielle, colegas de curso, de viagens e de sanduíches, pela amizade e tolerância.

A Vânia, pelo carinho e pela colaboração na primeira fase do projeto.

À minha mãe, à minha avó e ao meu irmão, pelo amor e pela dedicação.

À minha esposa, Késia, pois “Esta agora é osso dos meus ossos e carne da minha carne (Genesis 2:23). Como és formosa, amada minha! (Cantares 4:1)”.

Aos meus filhos, Tiago e Gabriel, pois “Os filhos são herança do Senhor (Salmos, 127:3)”.

Muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

Filho de Newton Baptista da Silva e Alacyr Fonseca da Silva, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 30 de outubro de 1966.

Em dezembro de 1983, formou-se Técnico em Laticínios pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes, onde passou a lecionar no ano seguinte.

Em janeiro de 1990, graduou-se Farmacêutico-Bioquímico pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em julho de 1995, recebeu o título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa.

Possui 25 artigos técnicos publicados. Apresentou 23 palestras em Congressos e Seminários. Publicou quatro livros e um capítulo de livro. Orientou duas monografias de pós-graduação. Realizou treinamento em Processamento de Leite UHT na Suécia e em Microbiologia em Cuba.

Em março de 2001, iniciou o “Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos” na Universidade Federal de Lavras, tendo defendido a Tese em 27 de junho de 2003.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Processamento do leite por UHT e aspectos mercadológicos.....	3
2.2 Efeitos do aquecimento sobre os constituintes do leite .....	5
2.3 Estabilidade térmica do leite .....	7
2.3.1 Aspectos gerais.....	7
2.3.2 Tratamento térmico .....	7
2.3.3 pH.....	9
2.3.4 Equilíbrio salino .....	10
2.3.5 Teor de uréia .....	13
2.3.6 Estabilidade das micelas de caseína.....	14
2.3.7 Período de lactação .....	18
2.3.8 Alimentação .....	18
2.3.9 Mastite.....	18
2.4 Atividade proteolítica.....	19
2.4.1 Proteases naturais do leite .....	19
2.4.2 Proteases produzidas por psicrotróficos.....	20
2.5 Alterações em leite UHT durante a estocagem .....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Padronização de metodologias analíticas.....	24
3.1.1 Determinação do teor de citrato .....	24
3.1.2 Avaliação da estabilidade do leite ao etanol .....	27
3.1.3 Determinação da massa de sedimentos .....	28

3.2	Visitas técnicas e processamentos.....	29
3.3	Amostragem .....	31
3.4	Análises realizadas .....	31
3.5	Métodos analíticos empregados .....	34
3.6	Visão geral da metodologia.....	35
3.7	Análises estatísticas.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1	Sedimentos .....	38
4.2	Viscosidade .....	45
4.3	Percentual de desnaturação de soroproteínas.....	51
4.4	Teores de HMF livre e total .....	55
4.5	Teor de cálcio.....	60
4.6	Teor de fósforo.....	66
4.7	Relação entre os teores de cálcio e fósforo .....	72
4.8	Teor de citrato .....	74
4.9	Teor de uréia .....	80
4.10	Teores de nitrogênio e proteínas .....	82
4.11	Teor de gordura .....	90
4.12	Teor de lactose .....	91
4.13	Teores de extrato seco total e desengordurado .....	93
4.14	Acidez e pH.....	98
4.15	Estabilidade ao etanol .....	101
4.16	Ponto de congelamento .....	108
4.17	Contagem de microrganismos mesófilos .....	112
4.18	Contagem de microrganismos psicrotróficos.....	114
4.19	Contagem de células somáticas.....	117
4.20	Estudo de caso.....	123
4.20.1	Caracterização do problema.....	123

4.20.2 Sedimentos .....	123
4.20.3 Viscosidade .....	126
4.20.4 Teor de extrato seco desengordurado.....	127
4.20.5 Teores de proteínas e nitrogênio .....	127
4.20.6 Teores de cálcio e fósforo .....	129
4.20.7 Teores de HMF livre e total .....	129
4.20.8 Percentual de desnaturação de soroproteínas.....	129
4.20.9 Considerações finais .....	131
5 CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	134
ANEXOS.....	142

## RESUMO

SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação.** Lavras: UFLA, 2003. 147p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).\*

Este trabalho teve como objetivo verificar quais são os fatores determinantes para a sedimentação e a gelificação em leite UHT. Foram avaliadas amostras provenientes de seis processamentos de leite UHT desnatado, em cada uma de três fábricas localizadas nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Três processamentos ocorreram na estação seca e três na estação chuvosa, em cada fábrica, no período entre julho de 2001 e janeiro de 2002. As análises laboratoriais foram conduzidas nas amostras de leite cru, leite desnatado pasteurizado e no leite UHT com 10, 30, 60 e 120 dias de estocagem a 20-25°C. Foi comprovado que os teores de cálcio, fósforo e citrato variam significativamente entre os estados. O maior teor de cálcio e a maior relação cálcio/fósforo reduziram a estabilidade do leite cru ao etanol, enquanto os teores de fósforo e uréia aumentaram a mesma. A estabilidade do leite UHT ao etanol apresentou aumento inicial, seguido de um decréscimo progressivo, resultando em menor resistência alcoólica no final da estocagem. Com a sedimentação, observou-se diminuição nos teores de extrato seco desengordurado, proteínas, nitrogênio, cálcio e fósforo no leite UHT e aumento nos teores de nitrogênio, cálcio e fósforo nos sedimentos. O pH do leite UHT decresceu ao longo da estocagem. A determinação de acidez não foi útil para acompanhamento da qualidade do leite UHT. Em casos em que ocorreu recirculação do leite durante o processamento UHT, detectou-se alta desnaturação protéica e aceleração do escurecimento não-enzimático, que resultaram em taxas de sedimentação muito elevadas. Observou-se elevação na viscosidade do leite UHT durante a estocagem, revelando tendência à gelificação. O ponto de congelamento não mostrou comportamento uniforme no leite UHT. Com o desnate do leite, houve considerável redução na contagem de células somáticas. Deste trabalho pôde-se concluir que houve gradual elevação na taxa de sedimentação nas amostras de leite UHT ao longo da validade, com diferenças significativas entre os estados

---

\*Comitê Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador), Maria de Fátima Piccolo Barcelos - UFLA, José Renaldi Feitosa Brito - EMBRAPA, Marco Antônio Moreira Furtado - UFJF, Fernando Antônio Resplande Magalhães - EPAMIG.

e as estações. Concluiu-se que os fatores determinantes para a formação de sedimentos, com correlação positiva foram a desnaturação de soroproteínas e a contagem de células somáticas no leite cru e os fatores com correlação negativa foram os teores de citrato no leite cru e no leite UHT e o teor de uréia no leite cru. Concluiu-se também que os fatores determinantes para a gelificação, com correlação positiva, foram a contagem de microrganismos psicrotóxicos e a contagem de células somáticas, ambas no leite cru.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** leite UHT, sedimentação, gelificação, desnaturação, estabilidade ao etanol, citrato, cálcio, fósforo, microrganismos psicrotóxicos, contagem de células somáticas.

## ABSTRACT

SILVA, Paulo Henrique Fonseca da. **Factors affecting sedimentation and gelation in UHT milk.** Lavras: UFLA, 2003. 147p. (Thesis – Doctorate in Food Science)\*

This work aimed to determine the main factors that contribute to the occurrence of sedimentation and gelation defects in UHT skimmed milk. Six productions in each one of three plants located at the states of São Paulo, Rio Grande do Sul and Goiás – Brazil were evaluated. The experiment was carried out from July 2001 to January 2002, being three processes in the drought season and three in the wet one. Analyses were conducted in samples of raw, pasteurized and UHT skim milk at 10, 30, 60 e 120 days of storage at 20-25 °C. It was observed that calcium, phosphorus and citrate contents had significant variation among states. Ethanol stability of raw milk decreased by increase in both calcium and calcium/phosphorus ratio, whereas stability increased with increased phosphorus and urea contents. The ethanol stability of UHT milk presented higher values initially, followed by a steady decreasing, resulting in a lower alcoholic resistance at the final storage period. As sedimentation occurred it was observed decreasing in solids-non-fat, total protein, nitrogen, calcium and phosphorus in the UHT milk phase and an increase in nitrogen, calcium and phosphorus contents in the sediments. The pH values of UHT milk constantly decreased along the storage period. Acidity determination was not useful for quality evaluation of UHT milk. In those situations in which recirculation occurred during UHT processing, it was detected higher proteic denaturation and accelerated non-enzymatic browning; those milks presented very high sedimentation rates. It was observed an elevation in viscosity of UHT milk during storage period, with trend to gelation. Freezing point did not follow a uniform trend in UHT milk. A remarkable reduction in somatic cell count was observed when milk was centrifuged. For gelation, the factors with positive correlation were psychrotrophic bacteria and somatic cell count, both in raw milk. It can be concluded from this work that there was a gradual elevation on sediment rates in all samples of UHT milk along the shelf-life period and with

---

\*Guidance Committee: Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Major Professor), Maria de Fátima Piccolo Barcelos – UFLA, José Renaldi Feitosa Brito – EMBRAPA, Marco Antônio Moreira Furtado – UFJF, Fernando Antônio Resplande Magalhães – EPAMIG.

significant differences among states and seasons. It can also be concluded that the determining factors for sediment build up, with positive correlation were: denaturation rate of whey proteins and somatic cell counts in raw milk; and the factors with negative correlation were: citrate content in both raw and UHT and the urea content in raw milk.

**INDEX TERMS:** UHT milk, sedimentation, gelation, denaturation, ethanol stability, citrate, calcium, phosphorus, psychrotrophic bacteria, somatic cell count.

# 1 INTRODUÇÃO

Leite UHT (“ultra high temperature”) ou UAT (ultra-alta temperatura) ou longa-vida, é definido como sendo o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 1997).

O leite UHT foi introduzido no Brasil em 1972, porém, sua expansão de vendas ocorreu a partir de 1990. De acordo com a Associação Brasileira de Leite Longa Vida (2003), a participação de mercado do produto, que era de 4,41% em 1990, alcançou 74% em 2002.

Entretanto, a qualidade da matéria-prima e os gargalos tecnológicos relacionados à falta de estabilidade térmica têm dificultado a elevação da qualidade dos produtos e o aumento da vida-de-prateleira.

Torna-se imperioso diagnosticar, estudar e priorizar os fatores intrínsecos e extrínsecos que exercem influência na resistência térmica do leite e apresentar mecanismos e procedimentos que contribuam, de forma efetiva, para seu melhor aproveitamento industrial, o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado e a satisfação do mercado consumidor.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar os fatores que influenciam a estabilidade do leite ao calor, com impactos nos processamentos tecnológicos e na qualidade do leite tratado termicamente, por meio do sistema UHT, com posterior envase asséptico. Os objetivos específicos foram:

- modificar e/ou padronizar os métodos analíticos para mensuração dos indicadores de estabilidade térmica do leite;
- estudar os processamentos em fábricas de leite UHT em Goiás, São

- Paulo e Rio Grande do Sul, para estudo dos processamentos tecnológicos empregados e conhecer os aspectos relacionados com a qualidade do leite cru que afetam a sedimentação e a gelificação do leite UHT, em dois períodos representativos das estações seca e chuvosa; e
- estudar e priorizar os principais fatores que afetam a sedimentação e a gelificação do leite e avaliar as alterações nestes fatores durante a estocagem do leite UHT.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Processamento do leite por UHT e aspectos mercadológicos**

Segundo Tetra Pak (1996), UHT é uma técnica para a preservação de alimentos líquidos por meio da sua exposição ao calor intenso por um rápido período de tempo, destruindo os microrganismos do produto. Isto só se aplica se o produto permanecer em condições assépticas, sendo necessário evitar a recontaminação por meio do envase asséptico, após o tratamento térmico, em materiais de embalagem previamente esterilizados. Qualquer armazenagem do produto entre o tratamento térmico e o envase asséptico deve ocorrer sob condições também assépticas.

Há dois tipos principais de sistemas UHT no mercado. No sistema direto, o produto entra em contato direto com o meio de aquecimento, seguido de um resfriamento instantâneo em câmara de vácuo e, eventualmente, o resfriamento adicional indireto até atingir a temperatura de envase. O sistema direto é dividido em sistema de injeção de vapor (vapor injetado no produto) e sistema de infusão de vapor (o produto é introduzido numa câmara de vapor). No sistema indireto, o calor é transferido de um meio de aquecimento para o produto por meio de uma parede divisória. O sistema indireto pode ser baseado em trocadores de calor a placas, tubulares ou com superfície raspada. Além disso, é possível combinar os trocadores de calor no processo indireto, de acordo com as exigências do produto e do processo (Tetra Pak, 1996).

Na Tabela 1 é demonstrado o consumo de leite fluido e a participação do leite UHT no mercado brasileiro, de 1990 a 2002 e a Figura 1 ilustra o aumento no consumo de leite UHT em relação ao leite pasteurizado, no período entre 1995 e 2002.

TABELA 1 Consumo brasileiro de leite fluido, em milhões de litros, de 1990 a 2002

Ano	Total de leite fluido	Leite longa vida
1990	4.241	187
1991	3.951	204
1992	3.693	355
1993	3.162	456
1994	3.615	730
1995	4.200	1.050
1996	4.535	1.700
1997	4.720	2.450
1998	5.080	3.100
1999	5.125	3.425
2000	5.230	3.600
2001	5.390	3.950
2002	5.700	4.220

Fonte: Associação Brasileira de Leite Longa Vida (2003)

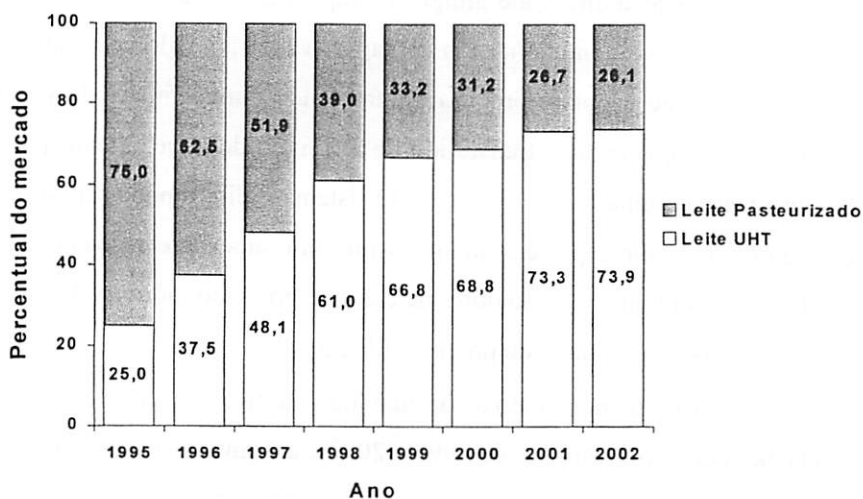


FIGURA 1 Percentual do mercado brasileiro de leite fluido de 1995 a 2002

Fonte: Rios (2003)

## 2.2 Efeitos do aquecimento sobre os constituintes do leite

O leite é submetido a tratamentos térmicos visando resguardar aspectos de saúde pública (patógenos potenciais) e de conservação (microorganismos deteriorantes e enzimas), ocasionando, entretanto, alterações químicas reversíveis e outras irreversíveis que afetam o produto final.

As reações químicas que ocorrem durante o tratamento térmico do leite são dependentes da temperatura e o valor  $Q_{10}$  expressa o aumento na velocidade das reações quando a temperatura é elevada em  $10^{\circ}\text{C}$  (Tabela 2). Quando a temperatura é elevada em  $10^{\circ}\text{C}$ , muitas reações químicas se aceleram até três vezes; por outro lado, a velocidade de desnaturação de uma proteína globular pode aumentar 100 vezes ou mais. Por isso, o estudo do binômio tempo e temperatura é muito importante para a definição do o tratamento térmico, a fim de que o mesmo modifique o mínimo as características físico-químicas e nutricionais do leite e, ao mesmo tempo, seja suficiente para destruição dos microorganismos potencialmente capazes de causar danos à saúde e para garantir a inativação de enzimas (Ferreira et al., 1994).

TABELA 2 Valores de  $Q_{10}$  para algumas reações que podem ocorrer durante o tratamento térmico do leite

Reação	Energia de ativação ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$Q_{10}$ a $100^{\circ}\text{C}$
Desfosforilação da caseína	110-120	2,6-2,8
Coagulação térmica do leite	150	3,7
Desnaturação das proteínas	200-600	6,0-175,0
Destruição dos esporos	250-330	9,0-17,0
Reação de Maillard	100-180	2,4-5,0

Fonte: Walstra e Jenness (1984)

Segundo Walstra & Jenness (1984), as principais mudanças ocorridas com o aquecimento do leite são:

- 1) perda de gases, inclusive o dióxido de carbono. Isto ocorre com qualquer aumento da temperatura, mas depende, em grande parte, da pressão exercida no leite durante o aquecimento. A perda de oxigênio, nitrogênio e grande parte do dióxido de carbono é reversível, mas, na prática, não ocorre assim, dado que o leite é muitas vezes mantido em grandes recipientes com espaços com ar;
- 2) deslocamento de parte do cálcio e do fosfato solúvel para a fase coloidal. Essas mudanças afetam o tamanho e as propriedades das micelas de caseína;
- 3) inativação de enzimas a temperaturas superiores a 50°C;
- 4) diminuição da solubilidade da maioria das proteínas do soro como consequência da desnaturação térmica, o que, em grande parte, está relacionado com sua compacta estrutura tridimensional. Isto é observado a temperaturas superiores a 60°C, com efeitos que diferem em razão das sensibilidades específicas das soroproteínas ao calor;
- 5) formação de grupos sulfidrílicos acessíveis e também pequenas quantidades de ácido sulfídrico, a temperaturas maiores que 60°C;
- 6) desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) a 80°C e formação do complexo  $\alpha$ -lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína, o qual é estabilizado a 90°C;
- 7) modificações da superfície micelar a 100°C, que irão comprometer a estabilidade térmica do leite; por isso, recomenda-se que o pré-aquecimento para produtos UHT não deve ultrapassar 90°C;
- 8) decomposição da lactose formando ácidos orgânicos, principalmente ácidos fórmico e láctico. Esta reação é observada a temperaturas acima de 100°C;
- 9) começo da agregação das micelas de caseína acima de 110°C e a estabilidade térmica do leite dependerá do pH; e
- 10) diminuição da estabilidade durante a estocagem após tratamento térmico acima de 140°C, devido à atividade de proteases termorresistentes e formação

incompleta dos complexos estabilizadores.

## **2.3 Estabilidade térmica do leite**

### **2.3.1 Aspectos gerais**

Por conceito, a estabilidade térmica do leite (ETL) é o tempo necessário para originar coagulação visível a uma dada temperatura e um dado pH, correspondendo à capacidade do leite em resistir à coagulação pelo calor, visando sua aptidão para o processamento.

A ETL exerce grande influência sobre o leite submetido a diferentes tratamentos térmicos. O importante para a ciência e tecnologia do leite é determinar quais reações influenciam a velocidade de coagulação térmica. É possível que alguma reação converta em instáveis as micelas e depois elas se agreguem tão logo se encontrem, independente de condições, como a temperatura. Neste caso, a velocidade da reação química poderia ser determinante. Talvez as micelas de caseína tenham de se aproximar muito antes que ocorra entre elas alguma reação cruzada. Neste caso, a energia de interação das micelas e os aspectos coloidais poderiam ser os fatores determinantes. As principais variáveis que influenciam a ETL são: tempo e temperatura, pH, equilíbrio salino, teor natural de uréia, estabilidade das micelas de caseína, período de lactação, alimentação deficiente do gado e mastite. Por essa complexidade, a discussão da estabilidade térmica para processamento é difícil e, eventualmente, enganosa (Silva & Almeida, 1998).

Fox & Hoynes (1975) mostraram que a habilidade do leite bovino em resistir a temperaturas relativamente altas de processamento é uma importante característica do ponto de vista tecnológico.

### **2.3.2 Tratamento térmico**

A ETL a ser requerida como indicador de qualidade da matéria-prima

dependerá da severidade do tratamento térmico a ser empregado no processamento, como:

- a) termização: 65°C/poucos segundos. A principal finalidade é a destruição da maioria das bactérias psicotróficas dado que algumas produzem lipases e proteases termorresistentes;
- b) pasteurização lenta: 63°C/30 minutos . É um tratamento térmico de tal intensidade que inativa a fosfatase alcalina. Destrói todos os microorganismos potencialmente patogênicos e a maioria das formas vegetativas;
- c) pasteurização HTST: 75°C/15s. É definida como o tratamento térmico capaz de inativar a fosfatase alcalina mas não a lactoperoxidase. Destrói todas as formas microbianas vegetativas, mas não as esporuladas. Algumas soroproteínas têm sua solubilidade diminuída e dão origem ao sabor de cozido;
- d) esterilização: 110-120°C/10 a 15 minutos. Destrói todos os microorganismos, inclusive esporos. Ocorrem grandes mudanças químicas; a cor e o sabor são afetados e diminui o valor nutritivo, particularmente devido à perda de vitaminas;
- e) fervura: A fervura doméstica do leite ocorre, usualmente, a 102-104°C;
- f) UHT: a ultra-pasteurização pelo sistema UHT pode se dar com aquecimento direto ou indireto. O sistema direto pode ser por infusão ou injeção de vapor, enquanto que o indireto pode ser tubular, de placas ou de superfície raspada. O tratamento térmico é feito, geralmente, a 135°C/4s. A formação de 5-(hidroximetil)-2-furaldeído ou HMF, como indicador de reações de escurecimento, é menor em leite UHT do que em leite esterilizado autoclavado.

A estimativa da estabilidade térmica do leite por meio do teste do álcool ou do alizarol é um procedimento muito empregado para a verificação da

aptidão do leite para tratamento térmico, pois, praticamente todos os fatores que afetam a estabilidade térmica afetam também a estabilidade frente ao etanol (Silva & Almeida, 1998).

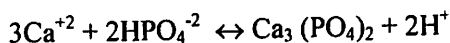
### 2.3.3 pH

O abaixamento do pH do leite ocorre por acidificação, concentração ou adição de sais solúveis, ocasionando a solubilização, particularmente, de fosfato de cálcio e a diminuição da estabilidade térmica do leite. O aquecimento do leite a 120°C por 10 minutos provoca um abaixamento no pH do leite em 0,09 unidades (Rose, 1961).

As alterações na acidez titulável do leite em razão do tratamento térmico variam de acordo com o tempo e com a temperatura empregados. São efeitos decorrentes do aquecimento:

- a) liberação de dióxido de carbono dissolvido, levando à redução na acidez;
- b) insolubilização do fosfato de cálcio, com conseqüente elevação da acidez;
- c) degradação térmica da lactose que ocorre a temperaturas acima de 100°C, com conseqüente elevação da acidez; e
- d) desnaturação de soroproteínas, expondo grupos com caráter ácido, com conseqüente elevação da acidez.

A concentração ocasiona elevação da acidez titulável, em razão da insolubilização do fosfato de cálcio, segundo a reação abaixo:



À temperatura alta, o pH será muito menor, fundamentalmente em conseqüência da maior dissociação da água, da precipitação de fosfato tricálcico

e da produção de ácido.

A acidez total desenvolvida se deve, principalmente, à decomposição da lactose, que corresponde a 50% da acidez, à desfosforilação da caseína, que contribui com 30% e à insolubilização dos fosfatos, com 20%.

A estabilidade térmica do leite varia em função do pH. Para se comparar a estabilidade ao calor de distintos lotes de leite, deve-se determiná-la aos seus vários valores de pH, incluindo o de máxima estabilidade.

A velocidade de alteração do pH depende também do pH inicial e da disponibilidade de oxigênio (necessário para a formação de ácido a partir da lactose). A velocidade da produção de ácido durante o aquecimento é o fator mais importante da coagulação pelo calor, pois o pH de coagulação é sempre baixo.

A energia de ativação da coagulação térmica, aparentemente, é igual à de produção de ácido. Se durante o aquecimento o pH original é mantido por meio da adição de álcali, evita-se a coagulação, inclusive depois de várias horas de tratamento térmico. A estabilidade coloidal das micelas de caseína é um importante fator, pois, mesmo com decréscimo do pH e elevação da atividade de  $\text{Ca}^{+2}$ , a estabilidade térmica do leite pode ser preservada, até certo ponto (Wasltra & Jenness, 1984).

#### **2.3.4 Equilíbrio salino**

A estabilidade térmica do leite pode diminuir devido a uma alta da atividade do cálcio, uma baixa atividade de fosfatos e citratos e sucessivos tratamentos térmicos. Pode ocorrer positividade no teste do álcool ou do alizarol, sem o leite estar ácido, como resultado de desequilíbrio salino.

Rose (1961) estudou a estabilidade térmica do leite e encontrou correlação desta com as relações cálcio iônico/fósforo inorgânico solúvel, cálcio

solúvel/fósforo inorgânico solúvel e cálcio solúvel mais magnésio solúvel/fósforo inorgânico solúvel mais citrato solúvel.

- Fox & Hoynes (1975) concluíram que o papel do fosfato de cálcio coloidal nas micelas de caseína parece ser, essencialmente, o de um agente de integração o qual serve para unir as subunidades micelares e também os componentes caseínicos dentro das subunidades.

Rose (1962) mostrou que uma extensiva dissolução de fosfato de cálcio coloidal pode romper a estrutura micelar da caseína nativa.

Morrissey (1969) concluiu que a mínima estabilidade térmica era observada em consequência de uma deposição, provocada pelo calor, de fosfato de cálcio sobre o complexo formado por caseinato e  $\beta$ -lactoglobulina, sensibilizando o complexo a precipitar-se na presença de íons cálcio.

Com a formação de mais fosfato de cálcio coloidal, eleva-se a concentração de  $H_3O^+$  na fase aquosa, diminuindo o pH e fazendo com que se tenha a positividade no teste do álcool. Com o aquecimento do leite, ocorre o deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal, com precipitação do fosfato tricálcico, pela pouca solubilidade a altas temperaturas (Tabela 3).

TABELA 3 Distribuição dos fosfatos no leite, à temperatura ambiente

Forma de ocorrência dos fosfatos	Distribuição (%)
Fosfato coloidal inorgânico	38
Sais inorgânicos solúveis	33
Fosfato coloidal orgânico	20
Ésteres orgânicos	7
Lípides	2

Fonte: Fox (1991)

O conteúdo de fosfato de cálcio e a atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  exercem pequena interferência sobre a  $\beta$ -lactoglobulina quando esta se encontra na sua forma nativa. Já a  $\beta$ -lactoglobulina desnaturada pelo calor é muito sensível aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , particularmente se estes estão presentes durante o aquecimento. A atividade do íon  $\text{Ca}^{2+}$  do leite não é suficiente para converter esta proteína em insolúvel. Porém, quando a  $\beta$ -lactoglobulina se encontra desnaturada e se une às micelas de caseína, a atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  se torna muito importante para a ETL (Fox, 1991).

Outras soroproteínas, depois do aquecimento, são sensíveis aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , como, por exemplo, a  $\alpha$ -lactoalbumina, que exerce efeito similar ao da  $\beta$ -lactoglobulina, podendo unir-se ao fosfato de cálcio durante o aquecimento.

Quando ocorre desequilíbrio salino como, por exemplo, aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , para que seja restaurado o equilíbrio, ocorre deslocamento dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  da fase solúvel para a fase coloidal, afetando a estabilidade térmica do leite.

A maior parte do citrato ocorre na fase solúvel, enquanto o fosfato e o cálcio se encontram, praticamente, nas mesmas proporções na fase solúvel e coloidal (Tabela 4).

TABELA 4 Concentração e distribuição de alguns sais no leite

Constituinte	Concentração (mg/L)	Solúvel (%)	Coloidal (%)
Cloreto	1200	100	0
Fosfato	750	43	57
Citrato	1750	94	6
Cálcio	1200	34	66

Fonte: Fox (1991)

Pode-se realizar um teste de balanceamento salino, seguindo-se o esquema abaixo (Silva & Almeida, 1998):

- preparar uma série de tubos de ensaio;
- adicionar 10 mL de leite;
- acrescentar  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  1% e acetato de cálcio 1%;
- acrescentar 2 mL de leite e 2 mL de álcool 76°GL;
- transferir para a placa de Petri com fundo escuro; e
- verificar tubo sem coagulação.

Dessa forma, poderá ser observado o comportamento da amostra quanto a um desequilíbrio por excesso de cálcio ou de fosfatos.

### **2.3.5 Teor de uréia**

A variação na composição protéica do leite é pequena para exercer um efeito considerável na estabilidade térmica do leite. O teor natural de uréia é o componente mais importante. Segundo Shalabi & Fox (1982), a uréia estabiliza o leite ao calor somente na presença de um composto carbonilado, como um açúcar redutor. Compostos carbonilados de baixa massa molar podem aumentar a estabilidade na ausência de uréia enquanto moléculas maiores como hexoses e dissacarídeos redutores não têm esta propriedade.

Wolfschoon-Pombo & Lima (1983) analisaram 185 amostras de leite de mistura na região de Juiz de Fora, MG e encontraram o valor médio de 28,9 mg/100mL com coeficiente de variação de 25%.

O tempo de coagulação térmica pode ser estimado pela fórmula abaixo (Walstra & Jenness, 1984), permitindo estimar que o tempo de coagulação do leite com 0,25g uréia/kg é de 14 minutos a 140°C e do leite com 0,5g uréia/kg é de 26 minutos na mesma temperatura.

$$\text{Tempo de coagulação térmica} = 0,45 \times (\text{uréia}) + 3,04$$

sendo:

- tempo de coagulação térmica: minutos a 140°C
- (uréia): concentração em mg/100 mL

### 2.3.6 Estabilidade das micelas de caseína

As caseínas são um grupo de fosfoproteínas específicas do leite que apresentam baixa solubilidade em pH 4,6. São constituídas de micelas com 40 a 300 nm de diâmetro. As micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de várias moléculas de caseína, com a seguinte relação: [ $\alpha_{s1}$ :  $\alpha_{s2}$ : ( $\beta + \gamma$ ):  $\kappa$  = 4: 1: 4: 1,3], mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. Fosfato de cálcio amorfo liga as submicelas entre si, com participação de ésteres fosfatos. Dessa forma, quase todas as regiões nas moléculas de caseína têm mobilidade restrita. A porção carboxi-terminal da  $\kappa$ -caseína está, predominantemente, presente como filamentos flexíveis, orientados para o meio externo. Nem todas as micelas possuem  $\kappa$ -caseína.

A  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) possui regiões de grande hidrofília, em sua molécula, orientando-se para o exterior, enquanto as demais se orientam para o interior. Assim, a  $\kappa$ -CN ocupa uma posição de destaque, atuando como estabilizadora da micela, graças à sua solubilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , independente da temperatura. É glicosilada, possuindo ácido N-acetil-neuramínico, ácido glutâmico e ácido piroglutâmico.

A estabilidade do complexo micelar caseínico é dada pelos fatores:

- repulsão espacial causada pelos filamentos de  $\kappa$ -caseína; e
- superfície: repulsão entre os grupos carboxila (cargas negativas), glicopeptídeos hidrófilos e camada de solvatação (hidratação).

O aumento do tamanho médio, a diminuição do volume e aumento do conteúdo de fosfato de cálcio da micela também reduzem a estabilidade térmica do leite. A temperaturas altas, a quantidade de fosfato de cálcio que passa a estar

associado à micela aumenta.

Segundo Sweetsur & White (1974), é possível que a coagulação térmica no leite ocorra em dois estágios. O primeiro estágio é causado pela adsorção de fosfato de cálcio sobre as micelas maiores e menos termoestáveis, envolvendo, aproximadamente, 50% da proteína. Esta proporção permanece constante, mesmo quando a concentração iônica no soro é aumentada em 50%. No segundo estágio, as micelas menores e mais termoestáveis podem agregar-se e presume-se que o fosfato de cálcio também seja adsorvido sobre estas micelas menores, porém, com menor efeito em sua estabilidade.

Dentre as proteínas do leite, as soroproteínas são as mais termolábeis e a ordem de instabilidade térmica é: imunoglobulinas > BSA >  $\beta$ -lactoglobulina >  $\alpha$ -lactoalbumina (Wolfschoon & Lima, 1982).

O comportamento térmico das proteínas do soro é governado, principalmente, pelas propriedades da  $\beta$ -lactoglobulina que, por sua vez, são afetadas pelo pH do meio, lactose, cloreto de sódio, íons cálcio e outros.

Segundo Enright et al. (1999), o tratamento UHT no leite resulta na associação da  $\beta$ -lactoglobulina desnaturada com as micelas de caseína.

Particularmente, a  $\beta$ -lactoglobulina e a BSA comandam a agregação de proteínas por meio da troca tiol-dissulfeto e reações de oxidação-redução durante o tratamento térmico.

As temperaturas às quais o leite é submetido durante o processamento conduzem a mudanças físico-químicas nas diferentes frações protéicas e, correspondentemente, na distribuição de nitrogênio nas mesmas (Tabela 5). Nesta Tabela, a somatória das porcentagens ultrapassa os 100%, devido aos parâmetros N-soroproteínas, N- $\beta$ -lactoglobulina e nitrogênio-não-protéico serem parte do N-não-caseínico, porém, estão expressados como porcentagens do N-total. Com o aumento da temperatura, há aumento do N-caseínico e diminuição do N-não caseínico (N-soroproteínas e N- $\beta$ -lactoglobulina).

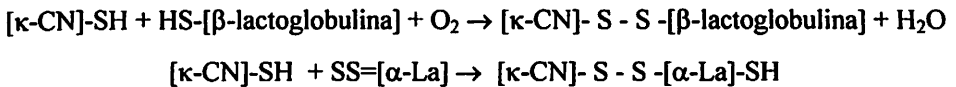
TABELA 5 Distribuição do nitrogênio nos leites cru, pasteurizado e fervido

Fração Nitrogenada	Distribuição das frações nitrogenadas (%)		
	Cru	Pasteurizado	Fervido
N-total	100,0	100,0	100,0
N-caseínico	78,3 ± 0,5	80,1 ± 0,1	90,5 ± 1,9
Nitrogênio-não-caseínico	21,7 ± 0,5	19,90 ± 0,6	9,5 ± 1,9
N-soroproteína	16,2 ± 0,9	14,3 ± 0,9	3,9 ± 1,8
N-β-lactoglobulina	8,4 ± 1,3	6,9 ± 1,2	0,2 ± 0,2
Nitrogênio-não-protéico	5,5 ± 0,7	5,6 ± 0,6	5,6 ± 0,6

Fonte: Wolfschoon-Pombo et al. (1982)

O aumento da porcentagem de N-caseínico de acordo com o aumento da temperatura não significa que o teor verdadeiro de caseína nesses leites aumente. Trata-se de um aumento aparente devido à formação de complexos entre as proteínas do soro e a caseína.

A κ-caseína, em especial, tem a capacidade de reagir com o grupamento sulfidrila das proteínas do soro desnaturadas, possivelmente da forma abaixo (Fox, 1991):



Estes complexos são co-precipitados com a caseína na determinação do N-não-caseínico, resultando em maior teor de N-caseínico nos leites pasteurizado e fervido.

A α-lactoalbumina não possui grupos SH e sim quatro grupos S-S/mol.

Para que a  $\alpha$ -lactoalbumina se ligue à  $\kappa$ -caseína, primeiro deve ocorrer a quebra do grupo S-S pelo oxigênio. Além de ser mais termorresistente, seu grupo funcional apresenta maior dificuldade para se ligar à  $\kappa$ -caseína, por isso é pouco relevante para a estabilidade térmica do leite.

A diminuição aparente no teor de soroproteína é resultado das características químicas e da estrutura globular dessas proteínas. Elas se encontram molecularmente dissolvidas e susceptíveis à desnaturação térmica (Fox, 1991).

A desnaturação das proteínas do soro afeta a conformação tridimensional e propriedades funcionais das mesmas. Assim, é de esperar-se um comportamento ligeiramente diferente da soroproteína do leite fervido, se comparado com o pasteurizado, por exemplo, no relativo à capacidade de absorver água, de gelificar, emulsificar, na viscosidade e outros.

O grau de desnaturação térmica das soroproteínas varia em função da intensidade do tratamento térmico aplicado ao leite no processamento de diferentes derivados (Tabela 6). Dessa forma, a desnaturação deve ser conduzida de forma a beneficiar as propriedades importantes para cada derivado.

TABELA 6 Desnaturação das soroproteínas

Tratamento térmico	Desnaturação das soroproteínas (%)
Leite pasteurizado	11
UHT direto	50
Fervido	75
UHT indireto	90
Esterilizado	100

Fonte: Compilado de Wolfschoon-Pombo et al. (1982)

### **2.3.7 Período de lactação**

No início e no final de lactação ocorre aumento na concentração de proteínas no leite, o que implicará numa maior formação de complexo  $\beta$ -lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína. As concentrações de cálcio e fósforo também se apresentarão aumentadas, podendo gerar desequilíbrio salino.

### **2.3.8 Alimentação**

Devido à homeostase (capacidade do organismo de manter uma composição constante de líquido e substâncias no organismo apesar de grandes diferenças nutritivas), a nutrição exerce um efeito comparativamente pequeno na maioria dos componentes do leite que afetam a estabilidade térmica do leite (Walstra & Jenness, 1984).

Os minerais contidos na ração não afetam de modo considerável a composição salina do leite. A deficiência de cálcio e fosfato na ração interfere na produção do leite, mas não altera as suas concentrações. A vaca retira esses minerais da reserva óssea para compensar a deficiência de ingestão. Ao contrário, uma suplementação exagerada de cálcio e fosfato na ração poderá não aumentar a concentração destes minerais no leite.

A alimentação pobre em forrageiras pode diminuir o teor de citrato, que é formado no ciclo de Krebs nas mitocôndrias. Isto ocasiona um desequilíbrio salino, diminuindo a estabilidade térmica do leite.

### **2.3.9 Mastite**

Em leites provenientes de animais com mastite, ocorre aumento da rota paracelular de secreção de constituintes do sangue no leite. Como consequência, tem-se aumento de frações do soro do sangue e desequilíbrio salino. Ocorre elevação no pH e diminuição da estabilidade das proteínas nativas do leite. Tais fatores contribuem para a redução da estabilidade térmica do leite (Walstra &

Jenness, 1984).

## **2.4 Atividade proteolítica**

### **2.4.1 Proteases naturais do leite**

No leite de vaca têm sido detectados, aproximadamente, 50 tipos de atividades enzimáticas. As principais enzimas são: xantina-oxidase, lactoperoxidase, catalase, lipase, fosfatase alcalina, lisozima e plasmina. O tratamento térmico influi na atividade destas enzimas, como no caso da fosfatase alcalina, que é inativada pela pasteurização. Entretanto, a fosfatase alcalina e a plasmina podem apresentar um certo grau de reativação posterior ao tratamento térmico (Walstra & Jenness, 1984). Outras enzimas endógenas do leite são mais sensíveis ao calor, a exemplo da  $\alpha$ -L-fucosidase, da fosfohexoseisomerase, da fosfodiesterase e da  $\alpha$ -manosidase, das quais nenhuma atividade foi detectada em 21 amostras de leite UHT (Zehetner et al., 1996).

Existem vários tipos de proteases presentes no leite bovino, sendo algumas originadas do desenvolvimento de microrganismos e outras derivadas do sangue do animal. A concentração destas enzimas é dependente da raça do animal, da alimentação, do estágio de lactação e de doenças como a mastite. As principais proteases são plasmina, plasminogênio, ativadores de plasminogênio, trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite, aminopeptidases e proteases derivadas de leucócitos (células somáticas). Há proteases que são secretadas na forma de um precursor inativo. Sob condições fisiológicas, estes precursores são convertidos nas formas ativas por autólise (auto-ativação) ou por uma limitada proteólise por outra protease. Por exemplo, a plasmina é a forma ativa que é produzida a partir do zimógeno denominado plasminogênio. A conversão do plasminogênio em plasmina ocorre pela ação específica de ativadores do plasminogênio, os quais são também proteases. O resultado da ativação da plasmina é a quebra de cadeias de algumas proteínas lácteas, especialmente a

caseína (Alslam & Huley, 1996).

As concentrações de plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio no leite são baixas no início da lactação. A atividade da plasmina é elevada em leites de animais com muitas lactações e com a ocorrência de mastite que, pelo alto número de células somáticas, contribui para aumentar a ação dos ativadores de plasminogênio (Alslam & Huley, 1996).

O plasminogênio é mais facilmente convertido em plasmina à temperatura do corpo do animal do que à temperatura de refrigeração do leite. A pasteurização a 72°C por 15 segundos reduz a atividade da plasmina somente em 10 a 17%. A estocagem do leite pasteurizado leva ao aumento da atividade da plasmina devido à inativação dos inibidores dos ativadores de plasminogênio. Para uma completa inibição da plasmina durante a estocagem, é necessário aquecer o leite a 142°C por 18 segundos ou 120°C por 15 minutos (Alslam & Huley, 1996).

Kelly & Foley (1997) encontraram uma pequena atividade residual de plasmina em leite de alta e baixa contagem de células somáticas submetidas ao processamento UHT indireto a 138°C por 2,4 segundos e subseqüentemente estocados a 20°C.

#### **2.4.2 Proteases produzidas por psicrotróficos**

Segundo Law et al. (1977), a estocagem de leite cru por prolongados períodos antes do processamento aumenta a probabilidade do crescimento de bactérias psicrotróficas com produção de enzimas termoresistentes capazes de causar deterioração de produtos lácteos. Os autores concluíram que *Pseudomonas fluorescens* AR11 crescem em leite refrigerado e produzem uma protease que é resistente ao tratamento UHT e que provoca a gelificação em um período de tempo dependente da extensão do crescimento do microrganismo antes do tratamento térmico. Amostras de leite foram inoculadas com a bactéria e o crescimento foi mantido até contagens de  $5 \times 10^7$  e  $8 \times 10^6$  ufc/mL, antes do

tratamento UHT e a gelificação ocorreu em 10 a 14 dias e em 8 a 10 semanas, respectivamente, a 20°C. A protease causou extensiva quebra da  $\kappa$ -caseína em para- $\kappa$ -caseína de uma forma similar àquela associada com a ação da quimosina. A  $\beta$ -caseína foi também quebrada rapidamente, enquanto a  $\alpha$ -caseína foi degradada lentamente.

Sorhaug & Stepaniak (1997) também reportaram que a estocagem do leite a frio suprime o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido, mas seleciona microrganismos psicrotróficos produtores de proteases. Estas afetam, predominantemente, a  $\kappa$ -caseína, enquanto a  $\beta$ -caseína e a  $\alpha$ -s-caseína são menos susceptíveis (Alslam & Huley, 1996). A pasteurização e outros tratamentos subsequentes destroem ou removem estes microrganismos, mas proteinases e lipases exocelulares termorresistentes produzidas por eles representam um importante fator de deterioração do leite durante a estocagem.

Picard et al. (1996) estudaram a atividade enzimática residual de uma cultura pura de *Pseudomonas fluorescens* sobre a  $\kappa$ -caseína e seu efeito em leite UHT, demonstrando haver uma proteólise de, aproximadamente, 25% daquela proteína, após estocagens de dois dias a 37°C ou 14 dias a 20°C.

## **2.5 Alterações em leite UHT durante a estocagem**

A estabilidade das proteínas do leite UHT ao etanol, aos íons cálcio e à quimosina decrescem com o tempo de estocagem. Samuel et al. (1971) concluíram que estas proteínas experimentam diversas alterações com o tempo, as quais levam à coagulação do leite. Dentre estas alterações incluem-se a proteólise e uma progressiva perda de estabilidade que favorece a agregação das micelas de caseína.

A decomposição das moléculas de proteínas durante a estocagem pode explicar as alterações que ocorrem na estabilidade do leite UHT. Modificações na distribuição do nitrogênio no leite UHT estocado sugerem que a

decomposição das proteínas precede e pode ser a causa da gelificação (Samuel et al., 1971).

Law et al. (1977) concluíram que a gelificação de leite UHT é um fator que contribui para a limitação da vida de prateleira deste produto.

Corradini & Pecis (1979) examinaram a atividade proteolítica em leite UHT adicionado de uma proteinase e concluíram que houve influência na formação de gel durante a estocagem do leite UHT.

López-Fandiño et al. (1993) compararam a proteólise durante a estocagem de leites UHT integral e desnatado. Segundo os autores, houve maior degradação proteolítica e maior aumento das atividades de proteinases nativas e bacterianas no leite UHT desnatado do que no leite UHT integral.

Auld et al. (1996) estudaram os efeitos de altas contagens de células somáticas e do estágio de lactação sobre a qualidade do leite UHT. Sob estocagem a 20°C, leite de início de lactação gelificou antes do leite de final de lactação. Dentro de cada período de lactação, leite com alta contagem de células somáticas tendem a gelificar primeiro. Poucas diferenças nas propriedades sensoriais foram observadas no leite UHT. Ficou aparente que a ocorrência de gelificação não pode ser atribuída somente à proteólise, mas outros fatores, como a composição e as reações entre os constituintes do leite, podem causar efeitos relevantes.

Os teores de ácido siálico em leites pasteurizado e UHT foram medidos e comparados por Zalazar et al. (1996). O teor de ácido siálico do leite UHT foi 50% a 215% maior do que no leite pasteurizado. Uma amostra de leite UHT foi mantida por 17 meses após o final da validade, quando então apresentou um teor de ácido siálico aproximadamente três vezes maior do que no leite UHT fresco. Os autores sugeriram que plasmina residual e as proteases de bactérias psicrotróficas lentamente degradam a  $\kappa$ -caseína no leite UHT, liberando glicomacropéptido, que contém ácido siálico, o que, com o tempo, resulta na

gelificação.

Kelly & Foley (1997) observaram que o início da gelificação está associado à pequena ação proteolítica em leite submetido ao processamento UHT indireto a 138°C por 2,4 segundos e subseqüentemente estocado a 20°C.

Segundo Garcia-Risco et al. (1999), a alta atividade proteolítica contra a  $\kappa$ -caseína pode ser responsável pela hidrólise da  $\kappa$ -caseína liberada no soro, podendo também aumentar a liberação dos complexos entre  $\beta$ -lactoglobulina e  $\kappa$ -caseína, por meio da proteólise da  $\kappa$ -caseína micelar.

Enright et al. (1999) demonstraram que o leite cru é instável e apresenta extensiva proteólise durante a estocagem, com evidência de atividade proteolítica derivada de enzimas que não a plasmina. Os autores também sugerem que a atividade da plasmina tem a maior influência na proteólise que ocorre durante a estocagem de leite UHT.

Cauvin et al. (1999) indicaram que a plasmina é quase completamente inativada pelo processamento UHT, enquanto o plasminogênio mostra boa estabilidade ao calor. A atividade derivada do plasminogênio foi descrita pelos autores como uma proteólise da caseína com significativo decréscimo durante os dois primeiros meses de estocagem. A hidrólise da caseína foi confirmada pelo aumento no nível de proteose-peptona no leite UHT. Não foi observado efeito da temperatura de estocagem (4°C e ambiente) sobre a proteólise.

Segundo Lopez-Fandino & Olano (1999), enzimas termoestáveis residuais ou reativadas podem causar sérios defeitos de estocagem e as atividades lipolítica e proteolítica e o grau de degradação de proteínas e lípidos são parâmetros úteis na estimativa da vida-de-prateleira do leite UHT.

Silva (2001), avaliando 30 amostras de leite UHT durante três meses, notou que houve o surgimento e um aumento gradual de frações de caseína, as identificadas por meio de eletroforese, sugerindo ocorreu atividade proteolítica.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Para execução do projeto foi necessária a padronização de metodologias analíticas, o que foi levado a efeito nos meses de abril a junho de 2001. Os processamentos e as análises laboratoriais foram executadas no período compreendido entre julho de 2001 e maio de 2002.

#### **3.1 Padronização de metodologias analíticas**

##### **3.1.1 Determinação do teor de citrato**

Os trabalhos de padronização da metodologia para análise de citrato foram conduzidos no Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG. Como referencial, consultou-se o procedimento de Marrier & Boulet, citado por White & Davies (1963).

Para a determinação do teor de citrato no leite, expresso como ácido cítrico, foi padronizado o método espectrofotométrico empregando piridina acética, com construção de curva padrão lida a 428 nm.

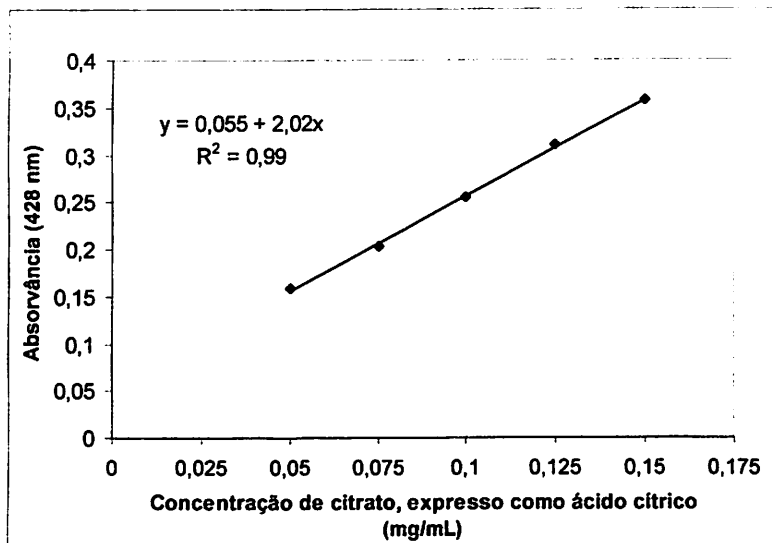
A construção da curva padrão para citrato seguiu as etapas abaixo:

- pesar 0,1913 g de citrato de sódio di-hidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ );
- dissolver com água destilada e fazer transferências quantitativas para um balão volumétrico de 200 mL;
- completar o volume do balão com água destilada;
- preparar uma série de seis tubos de ensaio de 25 mL com tampa de rosca de acordo com a Tabela 7;

TABELA 7 Esquema de preparação dos tubos para curva padrão de citrato

Tubo	Citrato de sódio (mL)	Água destilada (mL)	Ácido tricloroacético 24 % m/v (mL)	Volume total (mL)	Citrato, como ácido cítrico (mg/ml)
1	0	12,5	12,5	25	0,000
2	2	10,5	12,5	25	0,050
3	3	9,5	12,5	25	0,075
4	4	8,5	12,5	25	0,100
5	5	7,5	12,5	25	0,125
6	6	6,5	12,5	25	0,150

- transferir, para um tubo de ensaio com tampa de rosca, de aproximadamente 15 x 1,5 cm, 1 mL de cada solução, com auxílio de pipeta volumétrica;
- levar cada tubo de ensaio para uma capela de exaustão e acrescentar 1,3 mL de piridina P.A., com auxílio de dispositivo de sucção ou pipetador automático;
- agitar, cuidadosamente, com movimentos circulares no tubo;
- acrescentar 5,7 mL de anidrido acético P.A., com auxílio de dispositivo de sucção ou pipetador automático;
- agitar, cuidadosamente, com movimentos circulares no tubo;
- levar o tubo ao banho-maria 32°C por 30 minutos, retirar e secar o tubo;
- fazer a leitura da absorvância para cada solução a 428 nm, em temperatura ambiente não inferior a 20°C e dentro de 30 minutos após a retirada do banho-maria;
- elaborar a curva padrão (Figura 2).



**FIGURA 2** Curva padrão para citrato, expresso como ácido cítrico

O método de análise foi padronizado como descrito abaixo:

- transferir, para um balão volumétrico de 100 mL:
  - 5 mL da amostra, com auxílio de pipeta volumétrica e
  - 45 mL de água destilada;
- completar o volume do balão com solução de ácido tricloroacético a 24% m/v;
- tampar e inverter o balão três vezes;
- deixar em repouso por 30 minutos;
- filtrar através de papel-filtro Whatman 40;
- repetir os procedimentos acima, empregando água destilada em lugar da amostra, para a prova em branco;
- transferir, para um tubo de ensaio com tampa de rosca, de aproximadamente 15 x 1,5 cm, 1 mL do filtrado, com auxílio de pipeta volumétrica;

- levar o tubo de ensaio para uma capela de exaustão e acrescentar 1,3 mL de piridina P.A., com auxílio de dispositivo de sucção ou pipetador automático;
- agitar, cuidadosamente, com movimentos circulares no tubo;
- acrescentar 5,7 mL de anidrido acético P.A., com auxílio de dispositivo de sucção ou pipetador automático;
- agitar, cuidadosamente, com movimentos circulares no tubo;
- levar o tubo ao banho-maria a 32°C por 30 minutos;
- retirar e secar o tubo;
- fazer a leitura da absorvância para o filtrado da amostra e da prova em branco, a 428 nm, em temperatura ambiente não inferior a 20°C e dentro de 30 minutos após a retirada do banho-maria;
- converter a absorvância para concentração de citrato expresso como ácido cítrico, empregando a equação de regressão linear da curva padrão.

### **3.1.2 Avaliação da estabilidade do leite ao etanol**

Usualmente conhecido como “prova do álcool” ou “teste do álcool”, o método para avaliação da estabilidade do leite ao etanol foi padronizado no Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG. Como referenciais, foram consultados o trabalho de White & Davies (1958) e a Norma Internacional FIL-IDF 48:1969 (International Dairy Federation, 1969).

Inicialmente, foi padronizado o preparo das soluções de etanol de concentrações sequenciais, expressas em percentual volume/volume, empregando alcoômetro de Gay-Lussac.

As soluções foram preparadas a partir de etanol P.A., de forma a garantir a temperatura de 20°C e o pH de 6,8, na faixa de concentração de 68% a 88% (v/v), com intervalos de 2%(v/v).

O método de análise foi padronizado como descrito abaixo:

- pipetar, para uma placa de Petri, preferencialmente de fundo escuro, 5 mL da amostra a 20-25°C, com auxílio de pipeta graduada;
- acrescentar 5 mL de uma das soluções de etanol de concentração padronizada (68°GL a 88°GL), a 20-25°C;
- misturar, realizando movimentos circulares na placa de Petri;
- observar a ocorrência de grumos ao inclinar-se a placa de Petri. Caso a placa de Petri seja de fundo transparente, observar contra uma superfície escura;
- caso não haja ocorrência de grumos, repetir a técnica empregando solução de etanol de maior concentração até que ocorra a coagulação;
- expressar o resultado como a concentração de solução de etanol (em % v/v ou °GL) em que primeiro ocorreu formação de grumos.

### **3.1.3 Determinação da massa de sedimentos**

Os trabalhos de padronização da metodologia para quantificar os sedimentos no leite UHT foram conduzidos no Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG. Como referencial, consultou-se o procedimento de Ramsey & Swartzel (1984), citado por Neira (1986).

O método de análise foi padronizado como descrito abaixo:

- abrir completamente a embalagem do leite UHT pela parte superior, com auxílio de tesoura;
- escoar todo o leite, cuidadosamente;
- cortar a embalagem, com auxílio de tesoura, de modo a obter uma altura final de, aproximadamente, 4 cm, a partir da base;
- inverter a embalagem e manter em posição vertical por 10 minutos, a fim de permitir que o leite escoe das paredes internas e do fundo;

- cortar a embalagem pelas arestas e abrir completamente, de forma que a mesma fique plana;
- se necessário, lavar a embalagem, cuidadosamente, empregando pequeno volume de água com auxílio de pisseta, removendo algum eventual resíduo de leite nas paredes, sem retirar o sedimento do fundo da embalagem;
- manter a embalagem, com a face interna voltada para cima, a temperatura ambiente por 48 horas;
- pesar a embalagem e anotar o valor;
- remover, cuidadosa e completamente, o sedimento seco, com auxílio de espátula de ponta fina;
- se absolutamente necessário, lavar a embalagem, cuidadosamente, empregando pequeno volume de água com auxílio de pisseta;
- escoar a água, caso tenha sido empregada e deixar secar a temperatura ambiente, pelo tempo necessário;
- pesar a embalagem e anotar o valor;
- obter a massa de sedimentos pela diferença entre as duas pesagens.

### **3.2 Visitas técnicas e processamentos**

Foram conduzidas visitas técnicas em três fábricas de laticínios, situadas nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, em dois períodos representativos das estações seca e chuvosa em cada estado. Três processamentos de leite UHT desnatado foram realizados, em cada fábrica e em cada estação, totalizando seis processamentos por fábrica. O cronograma de visitas técnicas é apresentado na Tabela 8.

TABELA 8 Cronograma de visitas técnicas às fábricas de laticínios

Estado	Estação	Datas das visitas técnicas
São Paulo	Seca	01 a 07/jul/2001
Rio Grande do Sul	Chuva	22 a 28/jul/2001
Goiás	Seca	12 a 17/ago/2001
Goiás	Chuva	17 a 21/dez/2001
São Paulo	Chuva	07 a 11/jan/2002
Rio Grande do Sul	Seca	21 a 25/jan/2002

Os processamentos de leite UHT desnatado seguiram as etapas gerais apresentadas na Tabela 9.

TABELA 9 Etapas gerais do processamento do leite UHT

Etapas	Especificação
Recepção do leite cru	4 a 6°C
Resfriamento	2 a 4°C
Estocagem	2 a 4°C / 2 a 4 h
Tratamento térmico inicial	75 a 80°C / 16 a 20 s
Desnate	Teor de gordura 0,1 % (m/v)
Adição de citrato de sódio	0,03 a 0,06% (m/v)
Estocagem do leite pasteurizado	3 a 4°C / 2 a 5 h
Pré-aquecimento em trocador tubular	85 a 90°C / 45 s
Tratamento térmico UHT direto	150°C / 4 s
Resfriamento em câmara de vácuo	85 a 90°C
Homogeneização asséptica - um estágio	Pressão 11 a 15 MPa (110 a 115 bar)
Resfriamento em trocador tubular	20 a 25°C
Envase - máquinas Tetra Brik Aseptic 8	Embalagens Tetra Brik Aseptic 1 L

### **3.3 Amostragem**

Em cada processamento, foram coletadas uma amostra no silo de leite cru, uma amostra no silo de leite desnatado pasteurizado e quatro amostras após envase do leite UHT, com volume de um litro cada amostra.

As amostras de leite cru e pasteurizado desnatado foram divididas em duas partes, sendo a primeira destinada a análises imediatas e a segunda transferida para um frasco contendo conservante 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol). O volume de amostra e o emprego de conservante atenderam às recomendações da International Dairy Federation (1985). As porções amostrais contendo conservante foram mantidas em refrigeração e transportadas para o Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG.

As amostras de leite UHT foram acondicionadas em caixa de papelão, revestidas com película plástica e transportadas para o Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora – MG, no qual foram mantidas à temperatura de 20°C a 25°C até 120 dias após processamento.

### **3.4 Análises realizadas**

Para execução das análises, foram utilizados os laboratórios das fábricas de laticínios, o Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, o Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa/Gado de Leite e o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa/Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora, MG.

As análises foram conduzidas nas amostras de leite cru, leite desnatado pasteurizado e no leite UHT com 10, 30, 60 e 120 dias de estocagem (Tabela 10).

TABELA 10 Relação das análises realizadas por tipo de amostra e por laboratório

Análises	Leite					
	Cru	Pasteurizado	UHT 10 dias	UHT 30 dias	UHT 60 dias	UHT 120 dias
Teor de gordura	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Teor de proteínas	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Teor de lactose	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Teor de extrato seco total	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Teor de extrato seco desengordurado	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Teor de cálcio	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>
Teor de fósforo	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>
Teor de nitrogênio	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>
Teor de uréia	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>	X <sup>(2)</sup>
Teor de citrato	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>			
pH	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>
Acidez	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>
Ponto de congelamento	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>

“...continua...”

TABELA 10, Cont.”.

Análises	Leite					
	Cru	Pasteurizado	UHT 10 dias	UHT 30 dias	UHT 60 dias	UHT 120 dias
Estabilidade ao etanol	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(4)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>
Desnaturação de soroproteínas (%)				X <sup>(3)</sup>		
Valor de HMF total					X <sup>(3)</sup>	
Valor de HMF livre					X <sup>(3)</sup>	
Viscosidade			X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>
Massa de sedimentos			X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>	X <sup>(3)</sup>
Contagem de células somáticas	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>	X <sup>(1)</sup>
Contagem de microrganismos mesofílicos	X <sup>(4)</sup>					
Contagem de microrganismos psicrotróficos	X <sup>(4)</sup>					

(1) Análise realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa/Gado de Leite.

(2) Análise realizada no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa/Gado de Leite.

(3) Análise realizada no Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas da EPAMIG/CT/Instituto de Laticínios Cândido Tostes.

(4) Análise realizada nos laboratórios das fábricas de laticínios.

### 3.5 Métodos analíticos empregados

Os métodos abaixo foram empregados para as análises laboratoriais:

- gordura, proteína bruta, extrato seco total e lactose (International Dairy Federation 141B:1996), empregando análise automática por espectrofotometria infravermelho;
- extrato seco desengordurado, por diferença algébrica entre os teores de extrato seco total e gordura;
- teor de cálcio (Moraes & Rabelo, 1986; Salinas & Garcia, 1985 e Bataglia et al., 1983), empregando digestão nitro-perclórica e determinação por espectrofotometria de absorção atômica;
- teor de fósforo (Moraes & Rabelo, 1986; Salinas & Garcia, 1985 e Bataglia et al., 1983), sendo a separação de fases solúvel e coloidal feita por meio de precipitação alcoólica e salina, seguida de digestão nitroperclórica e determinação por espectrofotometria visível;
- teor de nitrogênio (Association of Official Analytical Chemists, 1997 - Method 991.20), empregando método micro-Kjeldahl;
- teor de uréia (Biodiagnóstica, 2001), empregando método enzimático colorimétrico;
- teor de citrato (conforme item 3.1.1, baseado em White & Davies, 1963), empregando método espectrofotométrico com piridina acética;
- pH (Pereira et al., 2000), empregando método potenciométrico;
- acidez (Association of Official Analytical Chemists, 1997 - Method 925.22), empregando método titrimétrico com solução alcalina;
- ponto de congelamento (International Dairy Federation 108A:1986), empregando crioscópio eletrônico;
- estabilidade ao etanol (conforme item 3.1.2, baseado em White & Davies, 1958), empregando soluções de etanol de concentração padronizada;

- desnaturação de soroproteínas (Harland & Ashworth, 1947), empregando precipitação salina;
- determinação de HMF livre e total (Keeney & Bassette, 1959), empregando método espectrofotométrico com ácido tiobarbitúrico;
- viscosidade (Pereira et al., 2000), empregando viscosímetro rotatório;
- sedimentos (conforme item 3.1.3, baseado em Ramsey & Swartzel, 1984, citados por Neira, 1986), empregando método gravimétrico;
- contagem de células somáticas (International Dairy Federation 148A:1995), empregando análise automática pelo método fluoro-óptico-eletrônico;
- contagem de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis mesofílicos (International Dairy Federation 100A:1987), empregando a técnica de contagem de colônias a 30°C;
- contagem de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis psicrotóxicos (International Dairy Federation 132A:1991), empregando a técnica de contagem rápida de colônias, 25 horas a 21°C.

### **3.6 Visão geral da metodologia**

Um resumo esquemático da metodologia é ilustrado na Figura 3.

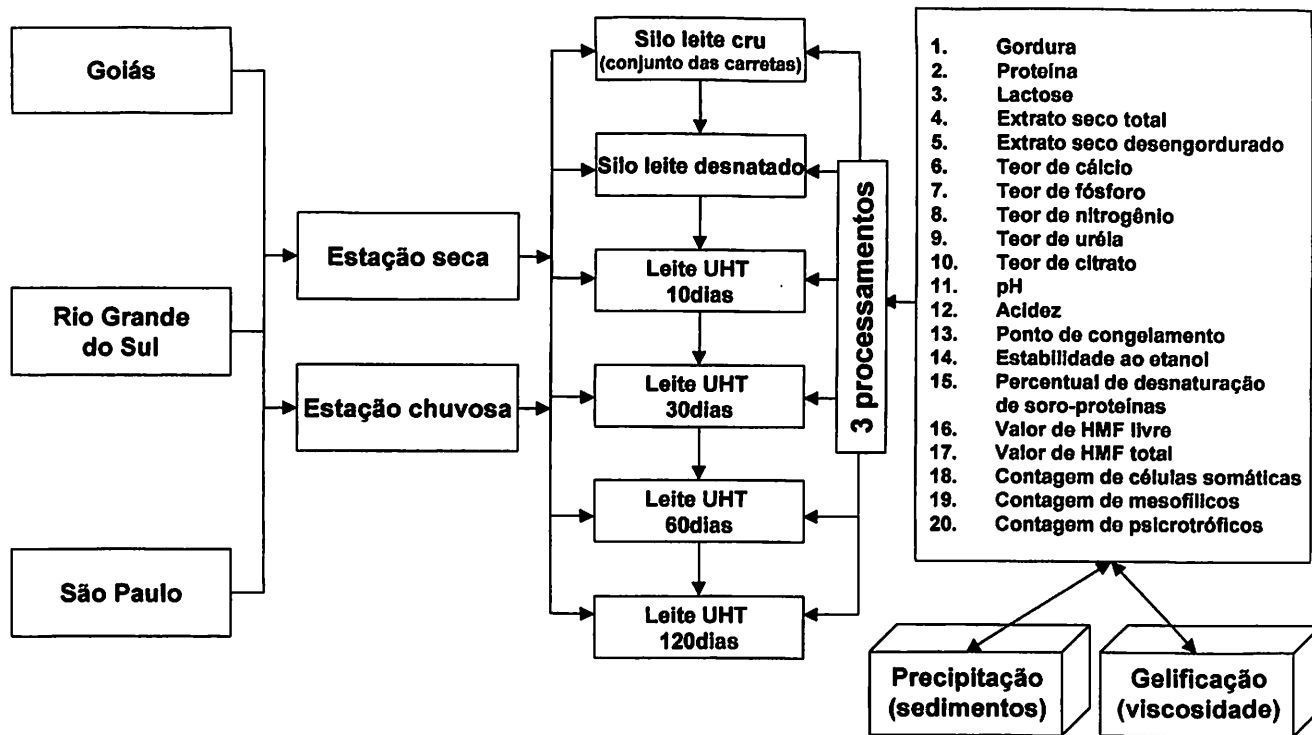


Figura 3 Fluxograma das etapas de coleta de amostras e análises

### **3.7 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram analisados por meio do coeficiente de correlação e da regressão, a fim de concluir sobre a definição dos fatores determinantes para a seleção do leite para processamento UHT e das alterações do leite UHT durante a estocagem. Também foram conduzidas análises de variância a fim de testar as diferenças nas variáveis estudadas entre os estados e as estações. Empregou-se o programa de análise estatística NTIA (EMBRAPA, 1996).

Para a análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor que 5% para modelo e para coeficientes linear e quadrático, quando for o caso.

Para a análise de correlação, foram aceitos coeficientes com nível de significância igual ou menor que 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da estabilidade térmica deve contemplar constituintes e propriedades físico-químicas que determinam o comportamento do leite durante os tratamentos térmicos. Para ser considerado apto ao processamento UHT, o leite deve reunir uma composição balanceada em proteínas e sais, ter bons indicadores de obtenção e conservação higiênico-sanitárias, além de apresentar boa resistência intrínseca ao calor.

Em adição ao estudo da estabilidade térmica, é necessário o entendimento das alterações experimentadas pelo leite UHT ao longo da estocagem e suas implicações na qualidade e na vida de prateleira do produto.

Neste trabalho, os resultados e a discussão dos mesmos são apresentados para cada indicador de qualidade, por estado e por estação. São ressaltadas as variações de composição do leite cru, as correlações entre propriedades e constituintes do leite UHT e suas modificações durante a estocagem.

No estado de Goiás, durante a estação seca, houve recirculação do leite UHT durante o tratamento térmico, em duas repetições. Isto provocou a manutenção do leite por um período prolongado de tempo a temperaturas elevadas, ocasionando alterações durante a estocagem que não puderam ser atribuídas aos efeitos de estado nem de estação. Dessa forma, as duas repetições citadas passaram a ser estudadas em separado (Item 4.20, Estudo de caso).

Nestes resultados e discussão, não foram aplicadas análises de regressão e correlação na estação seca do estado de Goiás, em razão de haver somente uma repetição restante.

### 4.1 Sedimentos

A ocorrência de sedimentos durante a estocagem é considerada como um

dos maiores problemas apontados pelas indústrias que processam leite UHT. O fenômeno de sedimentação, usualmente, é precedido pela deposição de complexos protéico-salinos nos trocadores de calor, gerando a necessidade de interrupções com maior frequência nas linhas de produção para que se efetue a limpeza dos equipamentos e tubulações. No produto final, a sedimentação reduz a vida de prateleira e pode ocasionar rejeição do leite UHT pelo consumidor.

A análise de variância para massa de sedimentos mostrou efeitos estatisticamente significativos para estado ( $P < 0,034$ ), para estação ( $P < 0,034$ ) e para o tempo de estocagem ( $P < 0,001$ ). Tais resultados demonstram que o fenômeno da sedimentação, embora com ampla ocorrência, tem que ser avaliado localmente pelas indústrias de laticínios e varia com a mudança das condições de clima. O efeito do tempo de estocagem vem corroborar a importância do controle da sedimentação sobre o aumento da competitividade industrial, por meio da busca da manutenção da qualidade ao longo da vida de prateleira do leite UHT.

A aplicação do teste de Tukey para comparação de médias entre estados forneceu os resultados expressos na Tabela 10.

TABELA 10 Teor médio da massa de sedimentos (g/L) do leite UHT coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Massa de sedimentos do leite UHT (g/L)
Rio Grande do Sul	1,0275 a b
São Paulo	1,0925 a
Goiás	0,7744 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Depreende-se que a sedimentação em São Paulo superou Goiás e que no Rio Grande do Sul a sedimentação apresentou valores intermediários entre os outros dois estados.

A magnitude do efeito de estação sobre os sedimentos manifestou-se claramente ( $P < 0,05$ ), sendo a estação chuvosa mais propensa a exibir o problema, o que indica a importância de ações de controle e prevenção ainda mais rigorosas naquela estação. As médias foram 1,0533 g/L na chuva ( $n=36$ ) e 0,9054 g/L na seca ( $n=28$ ).

Com auxílio da análise de regressão, foi possível descrever a ocorrência da sedimentação ao longo da estocagem por estado e por estação.

Nas Figuras 4, 5 e 6 são apresentados os resultados para massa de sedimentos nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

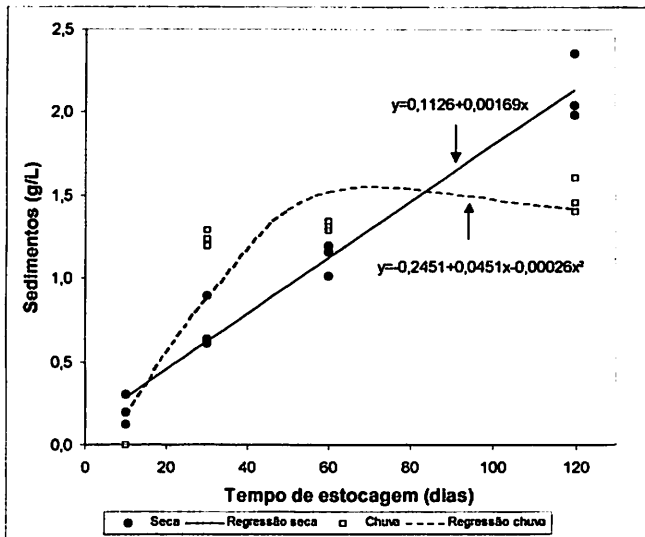


FIGURA 4 Evolução da massa de sedimentos durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

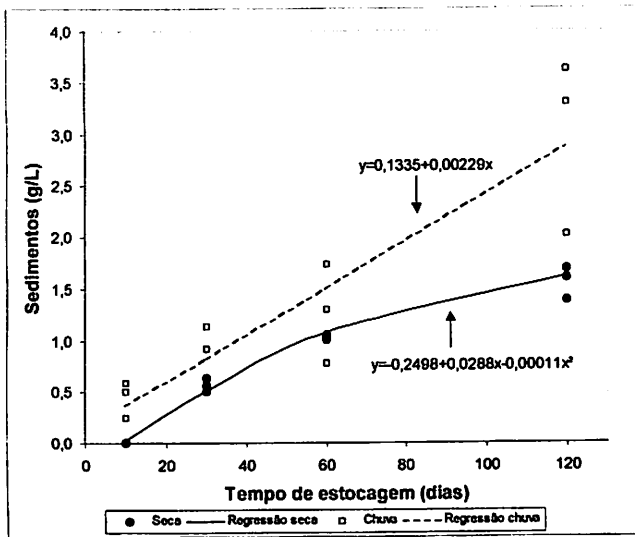


FIGURA 5 Evolução da massa de sedimentos durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

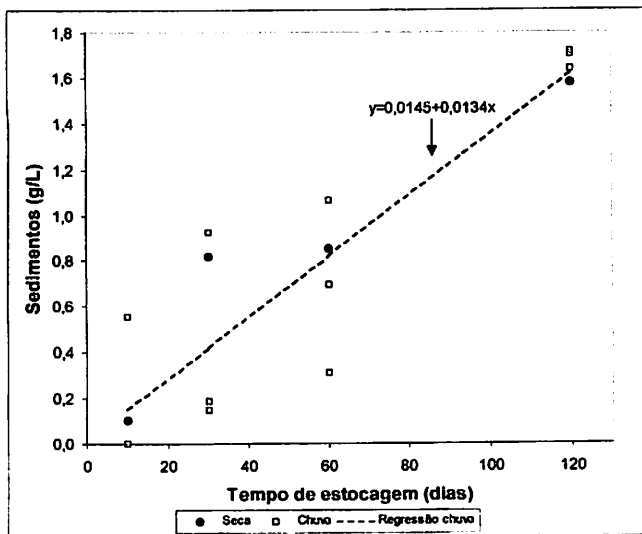


FIGURA 6 Evolução da massa de sedimentos durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

A sedimentação pode ser entendida como um efeito da perda progressiva de estabilidade protéica no leite submetido a tratamentos térmicos. Quando o leite é aquecido, as partículas coloidais estáveis são desestabilizadas por alterações que afetam as interações eletrostáticas e espaciais envolvidas na manutenção da integridade das micelas, como o abaixamento no pH, a deposição de fosfato de cálcio, a desfosforilação das caseínas e as reações de polimerização (Fox, 1991).

Com base no exposto nas Figuras 4, 5 e 6, pode-se perceber que a sedimentação ocorreu durante a estocagem em todos os estados e em todas as estações. As curvas e equações obtidas são úteis para o acompanhamento do fenômeno e permitem estimar o comportamento conjunto da sedimentação e da passagem do tempo de estocagem.

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com aqueles encontrados por Corradini (1967), citado por Blanc & Odet (1981), o qual afirmou que quando mais prolongada for a estocagem do leite UHT, maior será a quantidade de sedimentos.

De forma similar, Neira (1986) concluiu não ser constante a taxa de sedimentação em diferentes amostras de leite UHT, mas que sempre se observa aumento no transcurso do tempo.

Nas Tabelas 11 e 12 têm-se os coeficientes de correlação de fatores estudados com os sedimentos, por estado e por estação, respectivamente.

TABELA 11 Coeficientes de correlação para a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem, por estado

Variável testada para correlação com a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem	Coeficiente de correlação	
	RS	SP
Percentual de desnaturação de soroproteínas	0,9309 (**)	0,8242 (*)
Valor de HMF livre	0,9147 (**)	0,9812 (**)
Valor de HMF total	0,9709 (**)	0,9321 (**)
Teor de cálcio no leite UHT com 120 dias	-0,7923 (*)	-0,9568 (**)
Teor de fósforo no leite UHT com 120 dias	-0,9886 (**)	-0,7944 (*)
Teor de citrato no leite UHT	-0,8393 (*)	-0,8037 (*)
Teor de uréia no leite cru	-0,8159 (*)	-
Teor de proteínas no leite UHT com 120 dias	-0,9252 (**)	-0,9508 (*)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

(\*\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,01$ ).

TABELA 12 Coeficientes de correlação para a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem, por estação

Variável testada para correlação com a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem	Coeficiente de correlação	
	Seca	Chuva
Teor de cálcio no leite UHT com 120 dias de estocagem	-0,7179 (*)	-0,8985 (**)
Teor de fósforo no leite UHT com 120 dias de estocagem	-0,7385 (*)	-0,8437 (**)
Teor de citrato no leite cru	-0,8504 (*)	-
Teor de citrato no leite UHT	-0,9485 (**)	-
Contagem de células somáticas no leite cru	0,7643 (*)	-
Teor de proteínas no leite UHT com 120 dias de estocagem	-	-0,7946 (*)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

(\*\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,01$ ).

Ramsey & Swartzel, citados por Neira (1986), comprovaram que a formação de sedimentos como consequência do aumento da temperatura de processamento, se deve à maior quantidade de proteínas desnaturadas e à precipitação de sais minerais. Esta afirmação está de acordo com as correlações aqui apresentadas entre a sedimentação e o percentual de desnaturação de soroproteínas.

O efeito do processamento destaca-se neste contexto, em que se pode inferir sobre perdas econômicas e de qualidade resultantes de procedimentos inadequados de processamento, mesmo que se esteja trabalhando com leite de boa qualidade intrínseca.

Um dos primeiros compostos formados na reação de Maillard é o hidroximetilfurfural (HMF), cuja formação depende do tempo e da temperatura de aquecimento (Blanc & Odet, 1981). Este fato pode explicar as altas correlações obtidas entre os valores de HMF livre e total com a massa de sedimentos no leite UHT.

As determinações analíticas de desnaturação de soroproteínas e de HMF mostraram-se úteis para a avaliação da intensidade do tratamento térmico aplicado e com possibilidade de extrapolação para estimar a tendência à sedimentação.

Os teores de cálcio e fósforo no leite UHT com 120 dias correlacionaram-se negativamente com a sedimentação, indicando que houve deslocamento de minerais do leite para os sedimentos formados. Harwalkar (1997) contribuiu para a explicação deste efeito, mostrando que várias alterações ocorrem na distribuição de constituintes minerais durante a estocagem do leite UHT. O autor atestou que, em caso de estocagem prolongada, há precipitação de fosfato de cálcio, diminuindo a estabilidade das micelas de caseína.

A adição de citrato para a produção de leite UHT é usual no Brasil, a fim de diminuir o teor de cálcio disponível para formação de pontes salinas entre os

complexos protéicos.

A correlação negativa encontrada entre a massa de sedimentos e o teor de citrato no leite UHT está de acordo com os trabalhos de Parry (1974) e Hostettler (1981). Dessa forma, comprova-se que a adição de citrato contribui para a redução da taxa de sedimentação. O teor natural de citrato teve sua influência evidenciada na estação seca.

Conforme Walstra & Jenness (1984), o incremento no teor natural de uréia aumenta a estabilidade térmica do leite, o que também foi observado neste trabalho, visto que a massa de sedimentos foi menor em amostras do Rio Grande do Sul, as quais apresentaram maior teor de uréia.

A correlação positiva encontrada entre a sedimentação e a contagem de células somáticas na estação seca, pode ser explicada, em parte, pela desestabilização das caseínas provocada pela ação de enzimas presentes nas células somáticas, como a referida por Auld et al. (1996). Deve-se também levar em conta o desequilíbrio protéico e salino característicos do leite proveniente de animais com mastite, que proporcionam maior instabilidade ao aquecimento.

À medida que aumentou a sedimentação, o teor de proteínas no leite UHT diminuiu progressivamente, o que sugere a deposição de proteínas nos sedimentos. Blanc & Odet (1981) reportaram um marcante aumento no conteúdo de proteínas nos sedimentos em leite UHT em dois a cinco meses de estocagem, o que confirma os resultados aqui obtidos.

#### **4.2 Viscosidade**

A perda da estabilidade em leite UHT durante a estocagem pode ser manifestada pela separação de gordura, sedimentação ou gelificação. Nesta última, observa-se alteração na viscosidade, com espessamento do produto, podendo culminar na formação de gel, sem separação de soro, na maioria dos

casos (Harwalkar, 1997).

A análise de variância para a viscosidade do leite UHT mostrou serem significativos os efeitos de estação ( $P < 0,037$ ) e de tempo de estocagem ( $P < 0,001$ ), sendo este último posteriormente analisado por meio da regressão.

O resultado da aplicação do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparação de médias entre estações mostrou que a maior média referiu-se à estação chuvosa (1,83 mPa s,  $n=36$ ), ficando a estação seca com média 1,79 mPa s ( $n=28$ ).

Como a tendência à gelificação pode ser influenciada pela atividade de enzimas termorresistentes presentes, atribui-se à estação chuvosa a maior probabilidade de favorecer a ocorrência destas enzimas no leite, por esta estação ter apresentado maior contagem de microrganismos psicrotóxicos (item 4.18.1).

Empregando-se a análise de regressão, pôde-se acompanhar a evolução da viscosidade ao longo da estocagem do leite UHT por estado e por estação.

Nas Figuras 7, 8 e 9 são apresentados os resultados para viscosidade nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

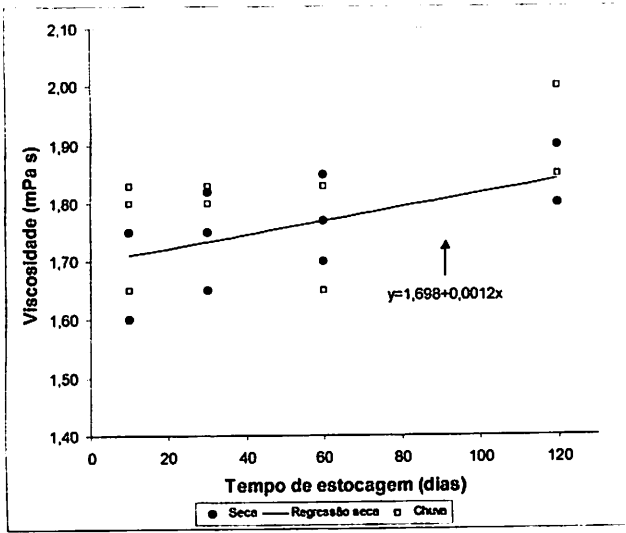


FIGURA 7 Evolução da viscosidade durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

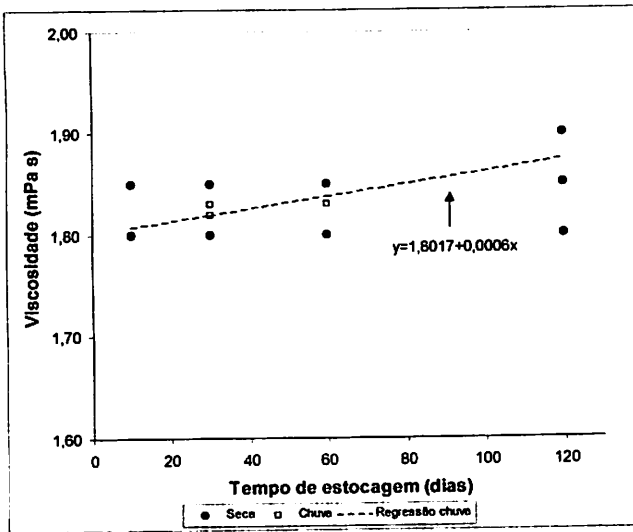


FIGURA 8 Evolução da viscosidade durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

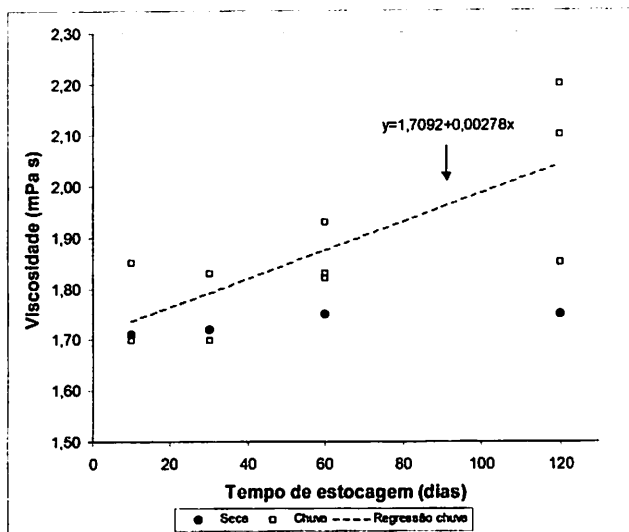


FIGURA 9 Evolução da viscosidade durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

As amostras dos três estados nas duas estações, invariavelmente, mostraram aumento na viscosidade ao longo da validade do leite UHT, revelando a ocorrência do processo de gelificação.

Embora as condições de processamento e de estocagem sejam reconhecidamente fatores que afetam a gelificação do leite UHT, o mecanismo exato ainda não é completamente entendido (Harwalkar, 1997).

Um mecanismo possível seria a degradação proteolítica da caseína, tornando as micelas sensíveis à agregação. A ação de enzimas de bactérias psicrotóricas desempenha importante papel. Se há plasmina ativa, pode-se observar mais a dissolução do que a gelificação da caseína. Outro mecanismo seria a formação de ligações químicas cruzadas entre proteínas, mas seguindo passos distintos da coagulação térmica (Walstra & Jenness, 1984).

Pande & Mathur (1992), citados por Silva (2001), sugeriram ainda que a

gelificação é um evento de dois estágios, no qual a proteólise é seguida por alterações físico-químicas não enzimáticas.

Bockelmann & Bockelmann (1998) consideraram que o fenômeno segue duas etapas: primeiro floculação, seguida de gelificação. Os mesmos autores citaram a decomposição proteolítica da caseína como uma das alterações implicadas.

A determinação de viscosidade empregada neste trabalho forneceu dados que vêm demonstrar como o espessamento do leite UHT pode ser analiticamente acompanhado ao longo da estocagem, contribuindo para o controle e a prevenção da gelificação no produto.

A análise de correlação foi realizada a partir da diferença entre os valores da viscosidade no final (120 dias) e no início (10 dias) da estocagem do leite UHT, representando a evolução observada.

Foram significativos ( $P < 0,05$ ,  $n=6$ ) os coeficientes de correlação entre o aumento da viscosidade e a contagem de microrganismos psicrotróficos no leite cru no Rio Grande do Sul e em São Paulo (0,8072 e 0,8367), respectivamente.

A análise de correlação entre as estações mostrou que há correlação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ,  $n=7$ ) entre o aumento da viscosidade e a contagem de microrganismos psicrotróficos no leite cru na estação chuvosa (coeficiente igual a 0,8229). Na estação seca, a correlação foi obtida com contagem de células somáticas no leite desnatado (coeficiente igual a 0,7318).

Os resultados apresentados comprovam a associação entre a contagem de psicrotróficos no leite cru e a elevação da viscosidade no leite UHT, permitindo inferir-se que o desenvolvimento destes microrganismos ocasionou a liberação de proteases que deram início ao processo de gelificação, que pôde ser observado pelo aumento na viscosidade do leite UHT.

Shew (1981) afirmou que os tipos de microrganismos presentes no leite

cru têm influência na qualidade de produtos UHT. Este autor asseverou que proteases extracelulares produzidas por psicrotróficos, não completamente destruídas entre 140°C e 150°C, podem produzir proteólise, sabor amargo e gelificação no leite UHT.

Gomes (1995), estudando a atividade proteolítica residual no leite UHT, concluiu que a mesma aumentou durante o armazenamento à temperatura ambiente, provavelmente em razão de uma intensificação da proteólise decorrente da resistência térmica de enzimas.

Segundo Garcia-Risco et al. (1999), extensiva degradação proteolítica das frações micelares foi observada em leite UHT durante a estocagem a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Alta proporção de soroproteínas desnaturadas não associadas à superfície das micelas de caseína foi encontrada em amostras de leite UHT desnatado em comparação com amostras de leite UHT integral, o que pode promover menor resistência à gelificação.

Com base nos resultados obtidos, demonstra-se que a qualidade microbiológica do leite cru, particularmente a contagem de microrganismos psicrotróficos, é fator preponderante para obter-se leite UHT com menor tendência à gelificação.

A correlação encontrada entre a contagem de células somáticas no leite desnatado empregado nos processamentos e o aumento na viscosidade ao longo da estocagem do leite UHT pode ser atribuída às enzimas proteolíticas presentes nas células somáticas, que contribuem para o aparecimento da gelificação. Dados semelhantes foram obtidos por Auld et al. (1996) que, avaliando leite UHT sob estocagem a 20°C, comprovaram que leites com alta contagem de células somáticas apresentaram gelificação mais rápida do que leites com baixa contagem de células somáticas.

### 4.3 Percentual de desnaturação de soroproteínas

Segundo Araújo (1995), a desnaturação altera várias propriedades importantes das proteínas, do ponto de vista da tecnologia de alimentos. A proteína desnaturada é, geralmente, menos solúvel ou até mesmo insolúvel, promove aumento na viscosidade do alimento e tem a reatividade de seus grupos laterais intensificada. O autor prossegue afirmando que a proteína desnaturada é mais sensível à hidrólise por enzimas proteolíticas.

Na Figura 10 são mostrados os resultados para os percentuais médios de desnaturação de soroproteínas por estado e por estação. Os valores mais elevados obtidos neste trabalho refletem a severidade do tratamento térmico empregado nos processamentos (150°C/4 s), capaz de provocar alta desnaturação de soroproteínas. Tal fato é relevante para uma melhor definição de ajustes de processo com respeito a tempo e temperatura de aquecimento.

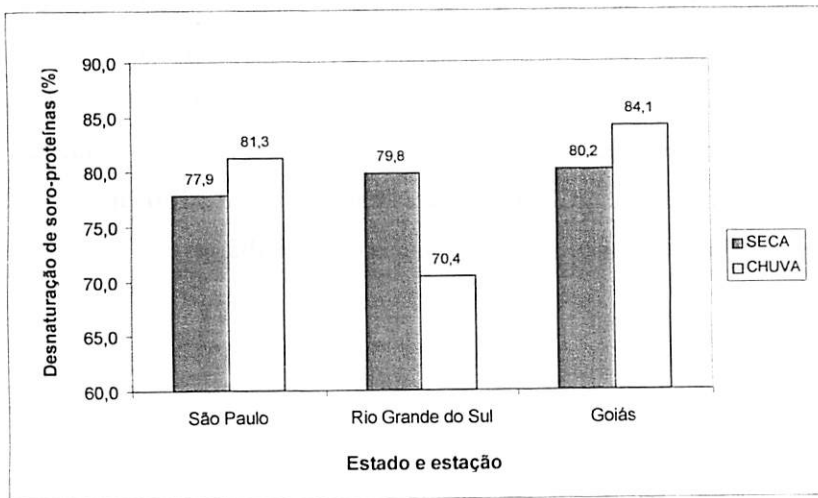


FIGURA 10 Percentuais médios de desnaturação de soroproteínas no leite UHT por estado e por estação

Singh e Creamer (1992) reafirmaram que temperaturas próximas a 90 °C promovem desnaturação das soroproteínas e que estas se associam com as micelas de caseína. A extensão e o tipo de associação dependem da severidade do tratamento térmico. A  $\kappa$ -caseína e interações dissulfeto estão envolvidas no processo de formação de complexos entre as soroproteínas e a caseína.

Wolfschoon-Pombo et al. (1982) relataram o valor de 50% para desnaturação de soroproteínas em leite UHT produzido pelo sistema direto, enquanto Bockelmann e Bockelmann (1998) citaram 68,4%.

Vale salientar o fato de que não apenas o aquecimento durante o tratamento UHT é responsável pela desnaturação protéica. Rose (1962) já demonstrava o efeito cumulativo das diversas etapas de aquecimento que o leite sofre ao ser processado. Em particular, o autor estudou a temperatura de pré-aquecimento e demonstrou que altas temperaturas promovem maiores alterações e menor estabilidade térmica, à medida que o somatório dos efeitos do pré-aquecimento com o aquecimento propriamente dito é elevado.

Os resultados da análise de variância indicaram diferença significativa ( $P < 0,003$ ) entre os percentuais de desnaturação de soroproteínas nos estados.

As médias, comparadas por meio do teste de Tukey, forneceram os resultados expressos na Tabela 13. O percentual de desnaturação de soroproteínas foi maior em Goiás, quando comparado com o Rio Grande do Sul, enquanto São Paulo exibiu um comportamento intermediário.

TABELA 13 Desnaturação média de soroproteínas (%) do leite UHT coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Desnaturação de soroproteínas (%) do leite UHT
Rio Grande do Sul	75,567 b
São Paulo	79,567 a b
Goiás	83,125 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Embora tenha sido relatado pelas fábricas que os tratamentos térmicos seguiram o mesmo binômio tempo/temperatura, pelos resultados acima supõe-se que variações de fluxo do leite no trocador de calor ou eventual aumento na recirculação do produto podem provocar diferenças na desnaturação protéica. Tais situações devem ser evitadas a fim de assegurar que as propriedades do leite sejam menos afetadas pelo tratamento térmico empregado.

Os coeficientes de correlação de fatores estudados com o percentual de desnaturação de soroproteínas, por estado estão descritos na Tabela 14. Não foram encontradas correlações significativas por estação.

TABELA 14 Coeficiente de correlação para o percentual de desnaturação de soroproteínas, por estado

Variável testada para correlação com o percentual de desnaturação de soroproteínas no leite UHT	Coeficiente de correlação	
	RS	SP
Massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias	0,9309 (**)	0,8242 (*)
Valor de HMF livre	0,8886 (*)	0,8268 (*)
Valor de HMF total	0,9048 (*)	0,8160 (*)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

(\*\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,01$ ).

De acordo com Renner & Schmidt (1981), a desnaturação das soroproteínas é acompanhada pela agregação das moléculas, a qual pode ser causada por pontes dissulfeto intermoleculares ou pela aglomeração das soroproteínas desnaturadas com partículas de caseína. Isto leva à formação de sedimentos no produto final.

Os trabalhos de Ramsey & Swartzel, citados por Neira (1986), reafirmaram a importância do aumento da temperatura de processamento na formação de sedimentos, por ocasionar maior desnaturação protéica e precipitação de sais minerais.

O aumento na desnaturação protéica resultou em maior taxa de sedimentação no leite UHT com 120 dias, de acordo com as correlações da Tabela 14. É relevante observar que os dados obtidos não apenas estão de acordo com os relatos da literatura, mas vêm demonstrar que, no Brasil, maior atenção deve ser dispensada ao correto estabelecimento dos binômios tempo/temperatura durante todo o processamento do leite UHT, visto que altas taxas de desnaturação foram encontradas, tendo forte associação com a sedimentação ao

longo da estocagem.

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é um intermediário da reação de escurecimento não-enzimático que tem o seu teor aumentado com a severidade do tratamento térmico (Fink & Kessler, 1986). As correlações positivas dos valores encontrados de HMF livre e total com a desnaturação de proteínas evidenciam que o tratamento térmico promove alterações físico-químicas e bioquímicas no leite que podem ser medidas analiticamente, a fim de favorecer uma melhor definição das relações entre tempo e temperatura de aquecimento.

#### **4.4 Teores de HMF livre e total**

As reações de escurecimento não-enzimático em alimentos estão associadas com o aquecimento. Um dos mecanismos envolve a reação de Maillard, que resulta na descoloração provocada pela reação entre a carbonila de açúcares redutores e os grupos amino livre de aminoácidos ou proteínas (Araújo, 1995).

O teor de 5-hidroximetilfurfural (HMF) é útil para detectar a ocorrência de reações de escurecimento não-enzimático e para avaliar a intensidade das alterações causadas no leite pelo aquecimento (Renner & Schmidt, 1981).

O teor de HMF livre é obtido pela reação com ácido tiobarbitúrico sem aquecimento enquanto a determinação do teor de HMF total envolve o aquecimento, com conversão de compostos intermediários para HMF livre (Ferreira et al, 1994).

Neste trabalho, é empregado o termo “teor de HMF”, embora Lechner (1982), citado por Pinto & Wolfschoon-Pombo (1984) recomende o emprego do termo “valor de HMF”, pois o ácido tiobarbitúrico empregado na análise não é um reagente específico.

Nas Figuras 11 e 12 são mostrados os resultados para os teores médios de HMF livre e total, respectivamente, por estado e por estação.

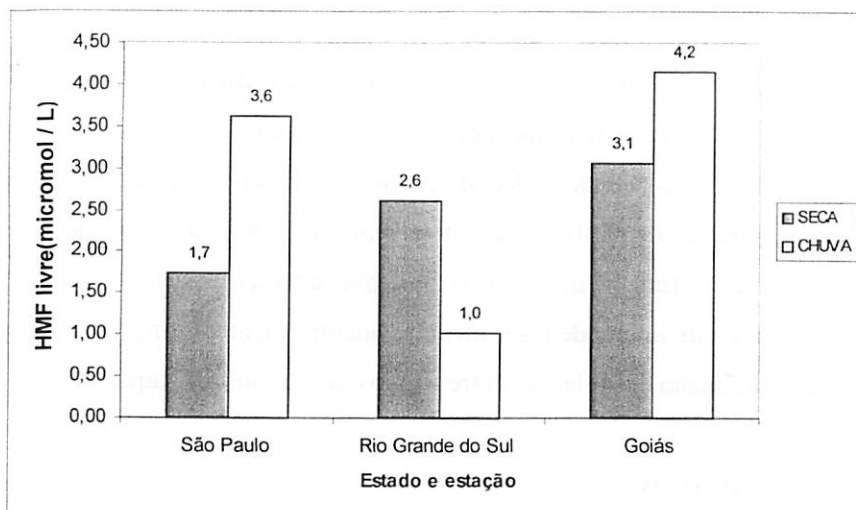


FIGURA 11 Teores médios de HMF livre no leite UHT por estado e por estação

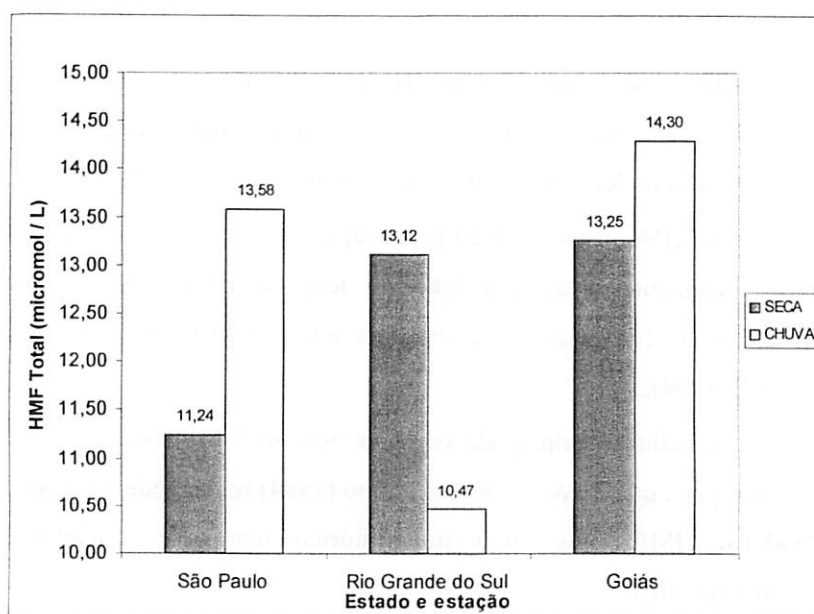


FIGURA 12 Teores médios de HMF total no leite UHT por estado e por estação

Ferreira et al. (1994), compilando dados de diversas fontes, citam o teor de 5,3  $\mu\text{mol/L}$  para HMF total em leite UHT obtido pelo sistema direto.

Rehman et al. (2000), estudando o emprego do HMF para detecção da adição de leite em pó em leite fluido, encontraram teores de HMF total de 10,52 a 16,00  $\mu\text{mol/L}$  em leite UHT obtido pelo sistema direto.

O trabalho de Morales et al. (2000) resultou na obtenção do teor médio de HMF total igual a 5,6  $\mu\text{mol/L}$  em leite UHT obtido pelo sistema direto.

Os valores de HMF livre representam o estágio de desenvolvimento da formação de HMF na ocasião da análise. Os valores de HMF total permitem estimar quanto a reação de formação de HMF pode prosseguir.

Os resultados, em todos os Estados e estações, demonstram que, embora a formação de HMF ainda estivesse fornecendo valores baixos para HMF livre, a estimativa de avanço da reação proporcionou altos valores para HMF total, em contraste com os dados da literatura. Este efeito vem confirmar os resultados de percentual de desnaturação de soroproteínas, ambos conduzindo à influência marcante do tratamento térmico sobre os constituintes e propriedades do leite UHT.

Os resultados da análise de variância indicaram diferença significativa entre os valores de HMF livre ( $P < 0,001$ ) e HMF total ( $P < 0,001$ ) nos estados. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as estações ( $P > 0,05$ ).

As médias, comparadas por meio do teste de Tukey, forneceram os resultados expressos na Tabela 15.

TABELA 15 Teores médios de HMF livre e total ( $\mu\text{mol/L}$ ) do leite UHT coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de HMF livre do leite UHT ( $\mu\text{mol/L}$ )	Teor de HMF total do leite UHT ( $\mu\text{mol/L}$ )
Rio Grande do Sul	1,817 b	11,790 b
São Paulo	2,688 b	12,408 b
Goiás	3,882 a	14,035 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Os teores de HMF livre e total em Goiás superaram os teores em São Paulo e Rio Grande do Sul, sendo os dois últimos considerados equivalentes.

No Brasil, Ferreira et al. (1994), estudando leite UHT desnatado com respeito aos teores de HMF livre e total, encontraram as médias 1,05 e 17,18  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

O comportamento dos dados nos estados mostra que podem ocorrer diferenças no tratamento térmico aplicado, como no caso de Goiás, em que os teores de HMF foram maiores, embora as fábricas possuam o mesmo sistema de processamento UHT direto. Duas prováveis causas são variações de fluxo do leite no trocador de calor ou eventual aumento na recirculação do leite processado, que podem intensificar os efeitos do aquecimento sobre o leite.

Os coeficientes de correlação de fatores estudados com os teores de HMF livre e total, por estado estão descritos na Tabela 16. Não foram encontradas correlações significativas por estação.

TABELA 16 Coeficientes de correlação para os teores de HMF livre e total, por estado

Variável testada para correlação com os valores de HMF livre e total no leite UHT	Coeficiente de correlação			
	RS		SP	
	HMF livre	HMF total	HMF livre	HMF total
Massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias	0,9147 (**)	0,9709 (**)	0,9812 (**)	0,9321 (**)
Desnaturação de soroproteínas	0,8886 (*)	0,9048 (*)	0,8268 (*)	0,8160 (*)
Valor de HMF total	0,9286 (**)	-	0,9278 (**)	-
Valor de HMF livre	-	0,9286 (**)	-	0,9278 (**)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

(\*\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,01$ ).

As correlações entre a massa de sedimentos e os teores de HMF evidenciam a relevância do efeito do tratamento térmico sobre a estabilidade do complexo sistema formado por proteínas e sais no leite.

É reconhecido que os sedimentos no leite UHT consistem do mesmo material que se deposita em superfícies aquecidas de trocadores de calor (Renner & Schmidt, 1981). A alta associação do HMF com a desnaturação protéica confirma esta afirmação, pois, quanto mais intenso for o tratamento térmico, maior será a formação de HMF, em paralelo à desnaturação protéica, sendo esta última fator que influencia na formação de sedimentos.

As correlações entre as determinações de HMF livre e total demonstram que a aplicação do método é viável, tanto para avaliação da taxa de reação de Maillard no momento da análise quanto para a estimativa futura de formação de HMF.

#### 4.5 Teor de cálcio

O cálcio está presente no leite distribuído em duas fases: solúvel e coloidal. Na fase solúvel, encontram-se 34% do cálcio do leite, sob as formas de cálcio iônico (35%), ligado ao citrato (55%) e ligado ao fosfato (10%). O cálcio coloidal ligado às caseínas representa 66% do cálcio total (Fox, 1991).

Na Figura 13 são mostrados os resultados para os teores médios de cálcio no leite cru por estado e por estação.

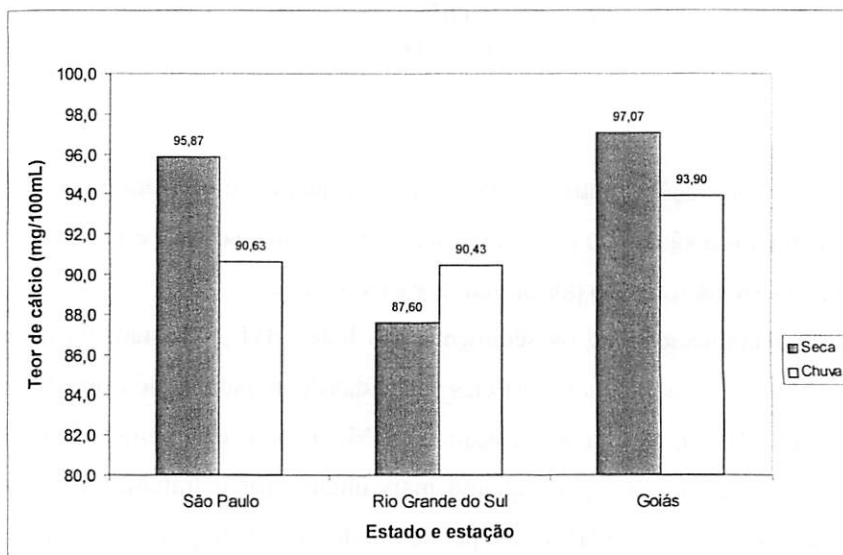


FIGURA 13 Teores médios de cálcio no leite cru por estado e por estação

Os leites analisados neste trabalho apresentaram teores de cálcio menores quando comparados com os resultados de White & Davies (1962), que encontraram o valor médio de 117,7 mg/100 mL para 20 amostras de leite e Walstra & Jenness (1984), que citam o valor de 117 mg/100 mL.

Estes valores mais baixos podem ser devido ao fato de serem provenientes de leite de conjunto, enquanto os dados de literatura usualmente tratam de leites de animais individuais. Ao mesmo tempo, mostram uma realidade que remete aos problemas amplamente notificados no Brasil com respeito a alterações de estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento, com provável causa ligada ao desequilíbrio salino.

Pelos resultados da análise de variância, observou-se diferença significativa ( $P < 0,014$ ) entre os teores de cálcio no leite cru entre os estados. Este comportamento está de acordo com os fatores que influenciam o teor de cálcio no leite, como diferenças entre raças, estágio de lactação e alimentação (Fox, 1991). Os estados estudados possuem, além de diferenças na condições climáticas (Anexo A), diferenças nos manejos alimentar nas raças (Anexo B).

As médias foram comparadas empregando-se o teste de Tukey, sendo os resultados expressos na Tabela 17. O teor de cálcio em Goiás teve maior média quando comparado ao teor no Rio Grande do Sul, sendo o teor em São Paulo intermediário entre os outros dois estados, provavelmente refletindo condições de solo, alimentação e de raças bovinas, que afetam a fração mineral do leite.

TABELA 17 Teor médio de cálcio (mg/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de cálcio do leite cru (mg/100 mL)
Rio Grande do Sul	89,017 b
São Paulo	93,400 a b
Goiás	95,483 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Bockelmann & Bockelmann (1998) declararam não haver informação disponível sobre o comportamento dos minerais do leite durante a estocagem. Isto vem ressaltar a importância dos resultados obtidos neste trabalho para a elucidação do comportamento de elementos da fração mineral do leite UHT ao longo da vida de prateleira do produto.

O comportamento do cálcio ao longo da estocagem do leite UHT foi monitorado e avaliado com auxílio da análise de regressão.

Nas Figuras 14, 15 e 16 são apresentados os resultados para teores de cálcio no leite UHT, nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

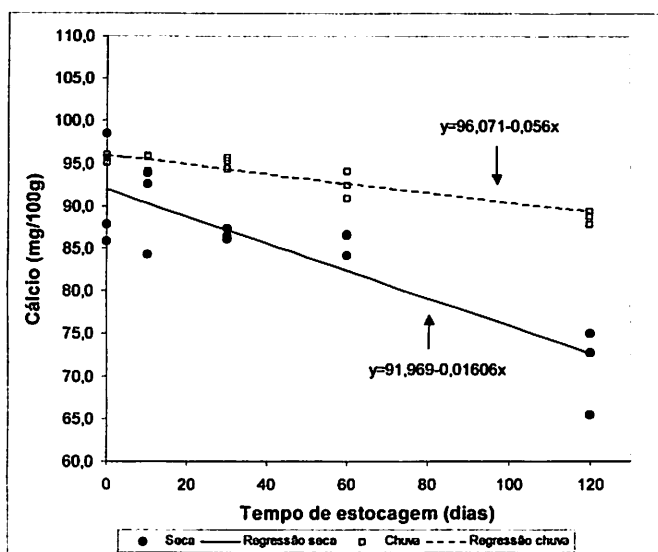


FIGURA 14 Evolução do teor de cálcio durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

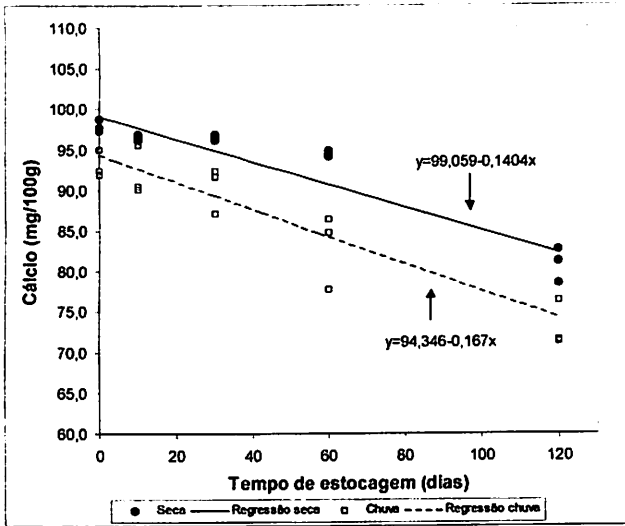


FIGURA 15 Evolução do teor de cálcio durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

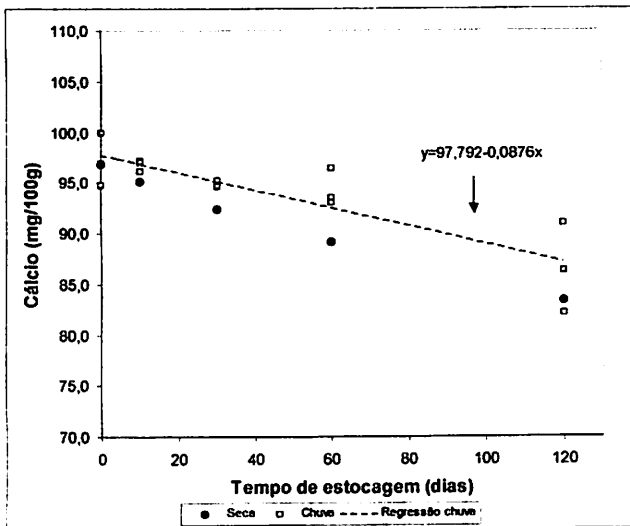


FIGURA 16 Evolução do teor de cálcio durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

Por meio das curvas e equações contidas nas Figuras 14, 15 e 16 foi demonstrado que houve um progressivo decréscimo no teor de cálcio durante a estocagem do leite UHT em todos os estados e em todas as estações.

Este fato está associado à taxa de sedimentação, a qual também se elevou ao longo do tempo. Isto permite a compreensão conjunta dos fenômenos, ou seja, à medida que há sedimentação no leite UHT, o cálcio tende a se deslocar para os sedimentos, com conseqüente redução no teor deste mineral na fração fluida do produto. Torna-se explícita a importância da prevenção e do controle da sedimentação, a fim de preservar as propriedades e características do leite UHT inalteradas durante a estocagem, com respeito ao teor de cálcio.

Na Tabela 18 têm-se os coeficientes de correlação de fatores estudados com o teor de cálcio no leite cru, por estado.

Não foram encontradas correlações significativas por estação ( $P > 0,05$ ).

A estabilidade ao etanol é um indicativo geral de estabilidade do leite, com respeito ao complexo coloidal entre cálcio, fosfato e caseinato, embora não seja capaz de representar, na sua totalidade, os diversos fatores que exercem influência sobre as propriedades do leite durante o aquecimento. Ao longo da

TABELA 18 Coeficientes de correlação para o teor de cálcio no leite cru, por estado

Variável testada para correlação com o teor de cálcio no leite cru	Coeficiente de correlação	
	RS	SP
Estabilidade do leite cru ao etanol	-0,8870 (*)	-0,8963 (*)
Estabilidade do leite UHT com 120 dias de estocagem ao etanol	-	-0,8572 (*)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

estocagem, o leite UHT mostra gradual perda de estabilidade ao etanol (Harwalkar, 1997).

De acordo com Silva & Almeida (1998), a estimativa da estabilidade térmica do leite por meio do teste do álcool é um procedimento útil para a verificação da aptidão do leite para processamento, pois, praticamente todos os fatores que afetam a estabilidade térmica, afetam também a estabilidade frente ao etanol.

As correlações negativas encontradas neste trabalho entre a estabilidade do leite cru e do leite UHT ao etanol e os teores de cálcio demonstram o papel preponderante do cálcio sobre a estabilidade do leite. Em leites com maiores teores de cálcio, a estabilidade coloidal é diminuída, com conseqüente perda na resistência ao etanol. Pode-se inferir que leites com tais comportamentos terão menor estabilidade térmica, com impactos prejudiciais nos processamentos tecnológicos e na manutenção da qualidade ao longo da vida de prateleira dos produtos.

Pela análise de correlação, foram obtidos coeficientes estatisticamente significativos entre o teor de cálcio e a massa de sedimentos, ambos os fatores analisados no leite UHT com 120 dias de estocagem.

No Rio Grande do Sul, o coeficiente de correlação foi  $-0,7923$  ( $P < 0,05$ ;  $n=6$ ), enquanto em São Paulo foi  $-0,9568$  ( $P < 0,01$ ;  $n=6$ ). Na estação seca, o coeficiente de correlação foi  $-0,7179$  ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ), sendo igual a  $-0,8985$  ( $P < 0,01$ ;  $n=7$ ), na estação chuvosa.

Harwalkar (1997) relata que, durante prolongada estocagem, há precipitação de algumas formas de fosfato de cálcio.

De acordo com Hostettler (1981), o aumento na concentração de cálcio incrementa a formação de complexos entre proteínas e gordura, levando à sedimentação do leite UHT.

Conforme demonstrado pelas correlações obtidas, a elevação na taxa de

sedimentação no leite UHT durante a estocagem é acompanhada pela redução no teor de cálcio. Assim, é comprovado o deslocamento de cálcio para os sedimentos e a sua influência nas propriedades de conservação do leite UHT.

#### 4.6 Teor de fósforo

O fósforo está presente no leite distribuído em duas fases: solúvel e coloidal. Na fase solúvel, encontram-se 43% do fósforo do leite, sob as formas de fosfato diácido (54%), fosfato monoácido (36%) e ligado ao cálcio e ao magnésio (10%). O fósforo coloidal ligado às caseínas representa 57% do fósforo total (Fox, 1991).

Na Figura 17 são mostrados os teores médios de fósforo no leite cru por estado e por estação.

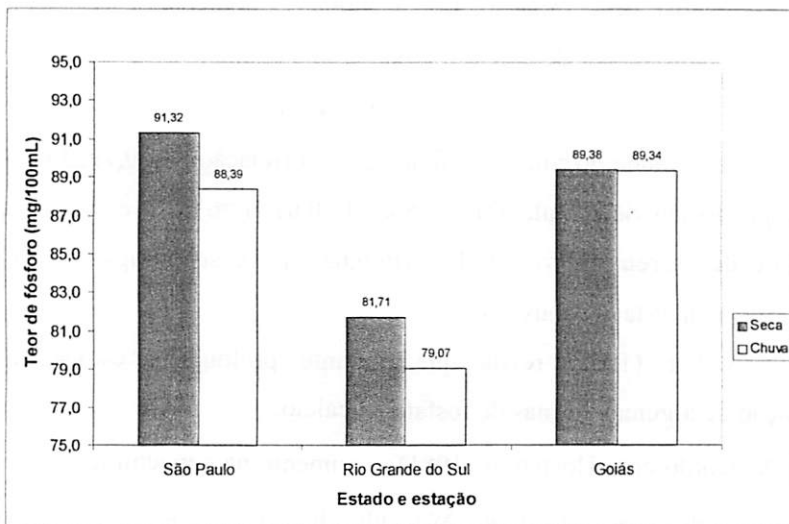


FIGURA 17 Teores médios de fósforo no leite cru por estado e por estação

Os leites analisados neste trabalho apresentaram teores de fósforo próximos ao citado por Fox (1991), igual a 84,8 mg/100 mL. Entretanto, White & Davies (1962) encontraram 95,1 mg/100 mL e a compilação de dados de Walstra & Jenness (1984) mostra o valor de 98,1 mg/100 mL, pouco superiores aos aqui relatados.

Estes valores, com razoável aproximação com os dados de literatura, ainda encerram a questão relacionada ao equilíbrio salino do leite. Mesmo que o teor de fósforo encontrado seja considerado normal, não se pode descartar a ocorrência de desequilíbrio salino entre as frações que compõem o fósforo total no leite. A partição do fósforo entre as fases solúvel (inorgânico) e coloidal (orgânico e inorgânico) pode afetar a estabilidade do leite, ainda que o somatório de seus teores seja aceitável.

Pelos resultados da análise de variância, observou-se diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre os teores de fósforo no leite cru entre os estados. Este comportamento está de acordo com os fatores que influenciam o teor de fósforo no leite, como diferenças entre raças, estágio de lactação e alimentação (Fox, 1991). Os estados estudados possuem, além de diferenças na condições climáticas (Anexo A), diferenças nos manejos alimentar e reprodutivo dos rebanhos, os quais se compõem de diferentes raças (Anexo B).

As médias foram comparadas empregando-se o teste de Tukey, sendo os resultados expressos na Tabela 19. Os teores de fósforo em São Paulo e Goiás foram equivalentes e ambos tiveram maiores médias quando comparados ao teor no Rio Grande do Sul, provavelmente refletindo condições de solo, alimentação e de raças bovinas, que afetam a fração mineral do leite.

TABELA 19 Teor médio de fósforo (mg/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de fósforo do leite cru (mg/100 mL)
Rio Grande do Sul	80,387 b
São Paulo	89,853 a
Goiás	89,362 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

O comportamento do fósforo ao longo da estocagem do leite UHT foi monitorado e avaliado com auxílio da análise de regressão.

Os resultados obtidos são úteis para a compreensão do comportamento do fósforo durante o armazenamento do leite UHT, visto que tal informação não foi encontrada por Bockelmann & Bockelmann (1998) ao revisarem os efeitos do tempo sobre os constituintes do leite UHT.

Nas Figuras 18, 19 e 20 são apresentados os resultados para teores de fósforo no leite UHT, nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

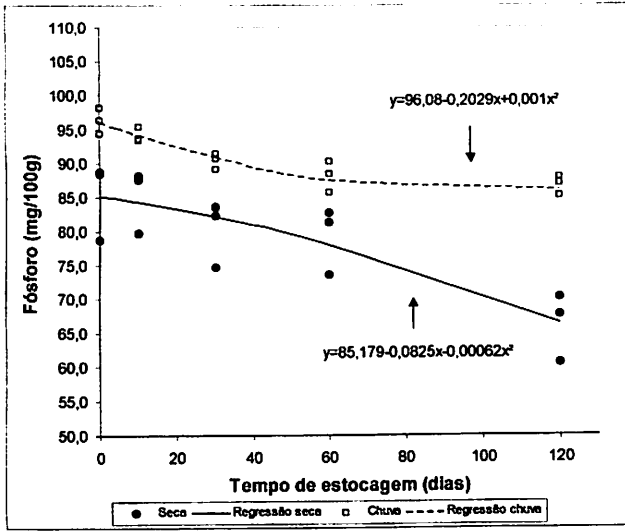


FIGURA 18 Evolução do teor de fósforo durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

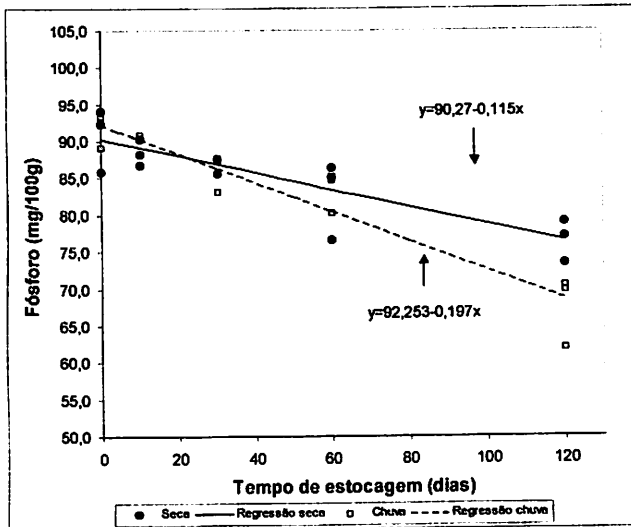


FIGURA 19 Evolução do teor de fósforo durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

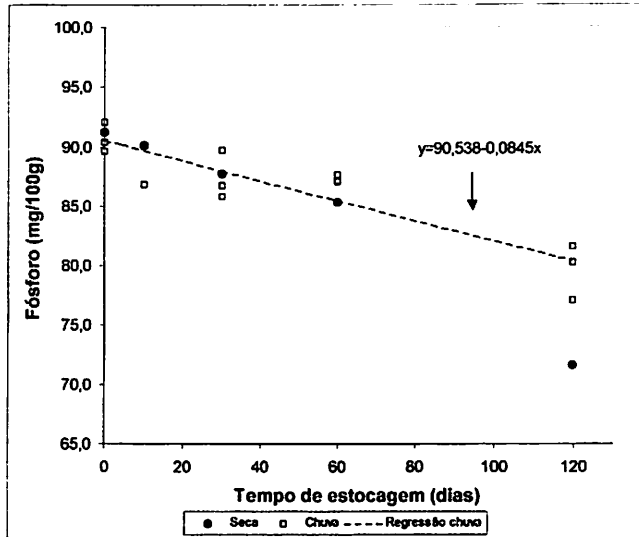


FIGURA 20 Evolução do teor de fósforo durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

Fica demonstrado, ao se observar as curvas e equações das Figuras 18, 19 e 20, que o teor de fósforo sofre queda gradual ao longo do tempo de estocagem do leite UHT, em todos os estados e em todas as estações, caso haja a formação de sedimentos.

Em razão da grande associação entre o fósforo e o cálcio no leite, a progressiva elevação na taxa de sedimentação no leite UHT promove o deslocamento não apenas do cálcio, mas também do fósforo em direção aos sedimentos formados.

Como o fósforo tem grande influência na estabilização do complexo micelar caseínico, devem ser conduzidas ações que evitem modificações em seu equilíbrio, como o controle e a prevenção da sedimentação no leite UHT.

O teor de fósforo no leite cru apresentou correlação positiva, na análise

por estados ( $P < 0,05$ ;  $n=6$ ), estatisticamente significativa, com a estabilidade do leite cru ao etanol (coeficiente igual a 0,8240).

A análise de correlação por estações confirmou a associação do teor de fósforo com a estabilidade ao etanol, na estação chuvosa, tanto no leite cru quanto no leite UHT, com coeficientes iguais a 0,7964 ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ) e 0,7989 ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ), respectivamente.

O fato observado do aumento da estabilidade ao etanol em razão do teor mais alto de fósforo no leite cru confirmou a importância do equilíbrio salino sobre a estabilidade do leite, em consonância com dados da literatura (Harwalkar, 1997 e Silva & Almeida 1998).

O aumento no teor de fósforo fornece maior número de cargas elétricas negativas ao complexo sistema iônico do leite e proporciona melhor estabilização das caseínas. Isto porque, no pH normal do leite, as caseínas apresentam predominância de cargas elétricas negativas, as quais geram um impedimento eletrostático à agregação, resultando em maior estabilidade.

Ao mesmo tempo, o maior teor de fósforo no leite contribui para a diminuição do teor de cálcio solúvel disponível para atuar na formação de ligações intermoleculares, que são um passo importante na desestabilização das caseínas.

Pela análise de correlação, foram obtidos coeficientes estatisticamente significativos entre o teor de fósforo e a massa de sedimentos, ambos os fatores analisados no leite UHT com 120 dias de estocagem.

No Rio Grande do Sul, o coeficiente de correlação foi -0,9886 ( $P < 0,01$ ;  $n=6$ ), enquanto em São Paulo foi -0,7944 ( $P < 0,05$ ;  $n=6$ ). Na estação seca, o coeficiente de correlação foi -0,7385 ( $P < 0,05$ ;  $n=7$ ), sendo igual a -0,8437 ( $P < 0,01$ ;  $n=7$ ), na estação chuvosa.

Ramsey & Swartzel (1984), citados por Neira (1986), afirmaram que a precipitação de sais minerais provocada pela temperatura de processamento

UHT, em conjunto com a desnaturação protéica, é determinante para a formação dos sedimentos. A precipitação de fosfato de cálcio no leite UHT durante o armazenamento também foi relatada por Harwalkar (1997).

Com base nas correlações encontradas, fica evidente que o teor de fósforo apresenta relação inversa com a taxa de sedimentação, ou seja, à medida que a formação de sedimentos é maior, o teor de fósforo no leite decresce. Isto em razão da migração do fósforo para os sedimentos, impactando de forma negativa sobre a qualidade e a conservação do produto.

#### **4.7 Relação entre os teores de cálcio e fósforo**

O trabalho de Rose (1962) indicou que uma extensiva dissolução de fosfato de cálcio coloidal causa uma desintegração da estrutura micelar da caseína nativa.

A desagregação das micelas pela remoção de fosfato de cálcio coloidal resulta no aumento da área superficial das micelas, com redução na concentração de  $\kappa$ -caseína por unidade de área e diminuição na estabilidade do sistema (Fox & Hoynes, 1975).

Na Figura 21 são mostrados os resultados para as relações cálcio/fósforo no leite cru por estado e por estação.

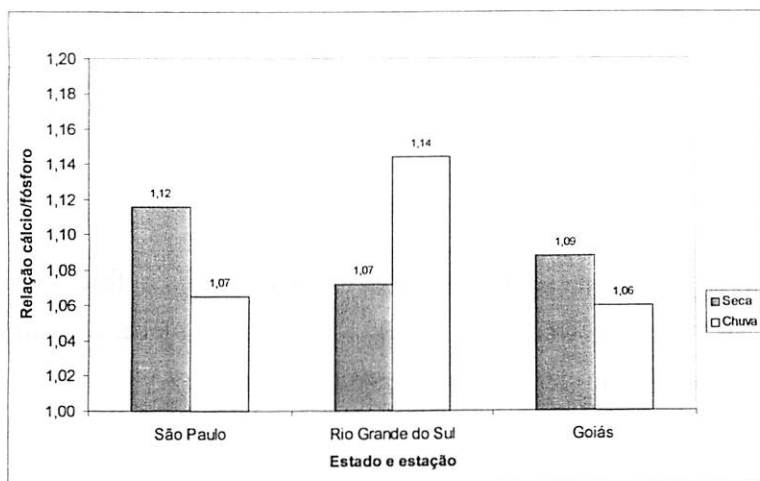


FIGURA 21 Relações cálcio/fósforo por estado e por estação

Os leites analisados neste trabalho apresentaram relações cálcio/fósforo inferiores à relação obtida a partir dos dados de White & Davies (1958), que foi igual a 1,24 e também à encontrada pela compilação de dados de Walstra & Jenness (1984) que mostrou o valor de 1,19. Este comportamento confirma que os leites analisados no Brasil apresentam teores mais baixos de cálcio do que aqueles citados na literatura.

A análise de variância para as relações cálcio/fósforo mostrou não haver diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre os estados nem entre as estações.

Nas amostras de leite coletadas no Rio Grande do Sul houve correlação negativa ( $P < 0,05$ ) entre a relação cálcio/fósforo e a estabilidade do leite cru ao etanol, com coeficiente igual a  $-0,8574$ , atestando que quanto maior for o teor de cálcio em relação ao teor de fósforo, menor será a estabilidade protéica do leite frente ao etanol.

Tal afirmativa permite comprovar a citação de Davies & White (1958) de que a alta concentração de íons cálcio é a principal causa da instabilidade do leite ao etanol.

#### 4.8 Teor de citrato

O citrato está presente no leite distribuído em duas fases: solúvel e coloidal. Na fase solúvel, encontram-se 94% do citrato do leite, estando ligado ao cálcio e ao magnésio (85%), como citrato trivalente (14%) e citrato divalente (1%). O citrato coloidal ligado às caseínas representa 6% do citrato total (Fox, 1991).

Na Figura 22 são mostrados os resultados para os teores médios de citrato no leite cru por estado e por estação.

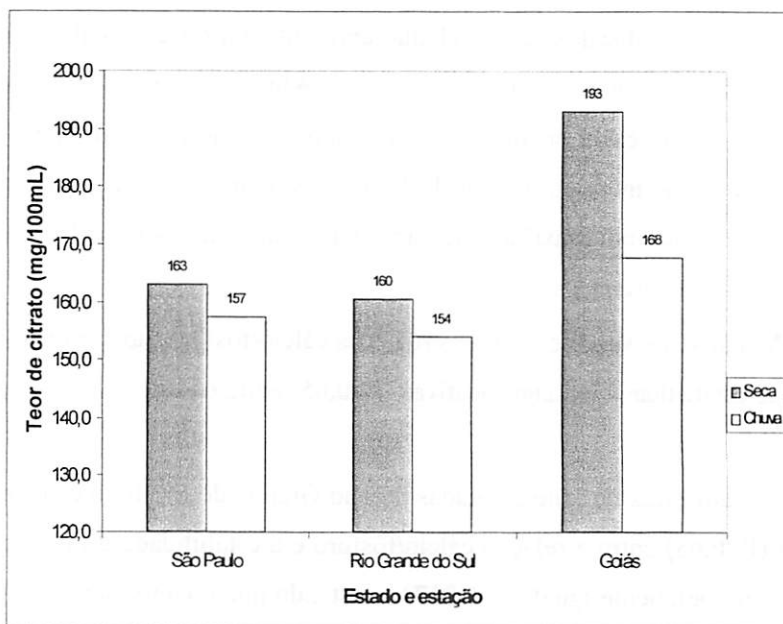


FIGURA 22 Teores médios de citrato no leite cru por estado e por estação

Os leites analisados neste trabalho, com exceção da estação seca em Goiás, apresentaram teores de citrato menores quando comparados com os resultados de Walstra & Jenness (1984), que citam o valor de 175 mg/100 mL.

White & Davies (1958) reportaram o valor médio de 176 mg/100 mL, com faixa de variação de 166 a 192 mg/100 mL, dentro da qual apenas se enquadram os leites de Goiás, nas duas estações. Os leites de São Paulo e do Rio Grande do Sul mostraram teores médios abaixo do limite inferior da faixa de variação observada pelos autores.

Fox (1991) afirmou que as adições de citrato e fosfato ao leite promovem aumento da estabilidade térmica do leite, pelo efeito seqüestrador sobre o cálcio iônico e, principalmente no caso do citrato, pela redução do fosfato de cálcio coloidal por meio da conversão a citrato solúvel não-ionizado.

Fosfato de sódio e citrato têm seus efeitos reconhecidos no aumento da estabilidade térmica do leite (Harwalkar, 1997).

No Brasil, a ocorrência de alterações de estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento tem sido objeto de preocupação para os laticínios. Os baixos teores de citrato encontrados neste trabalho contribuem para elucidar a questão, demonstrando que a causa provável está ligada ao desequilíbrio salino.

A análise de variância dos dados mostrou haver diferenças significativas entre os teores de citrato no leite cru entre os estados ( $P < 0,003$ ) e entre as estações ( $P < 0,022$ ). Este comportamento está de acordo com os fatores que influenciam os teores de sais no leite, como diferenças entre raças, estágio de lactação e alimentação, sendo a alimentação o fator que desempenha papel preponderante na variação do teor de citrato (Fox, 1991). Os estados estudados possuem, além de diferenças nas condições climáticas (Anexo A), diferenças nos manejos alimentar e reprodutivo dos rebanhos, os quais se compõem de diferentes raças (Anexo B).

Ao compararem-se as médias obtidas empregando-se o teste de Tukey

(Tabela 20), verificou-se que o teor de citrato em Goiás superou os outros dois estados. Ao mesmo tempo, a estação seca superou a chuvosa, com médias 172,04 mg/100 mL (n=9) e 159,81 mg/100 mL (n=9), respectivamente. Tais aspectos revelam as diferentes condições de solo, de alimentação e de raças bovinas que afetam composição salina do leite.

**TABELA 20** Teor médio de citrato (mg/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de citrato do leite cru (mg/100mL)
Rio Grande do Sul	157,40 b
São Paulo	160,19 b
Goiás	180,20 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O citrato de sódio teve sua inclusão aprovada no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT por meio da Portaria 370/97 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997).

Na Figura 23 são mostrados os teores médios de citrato no leite UHT por estado e por estação.

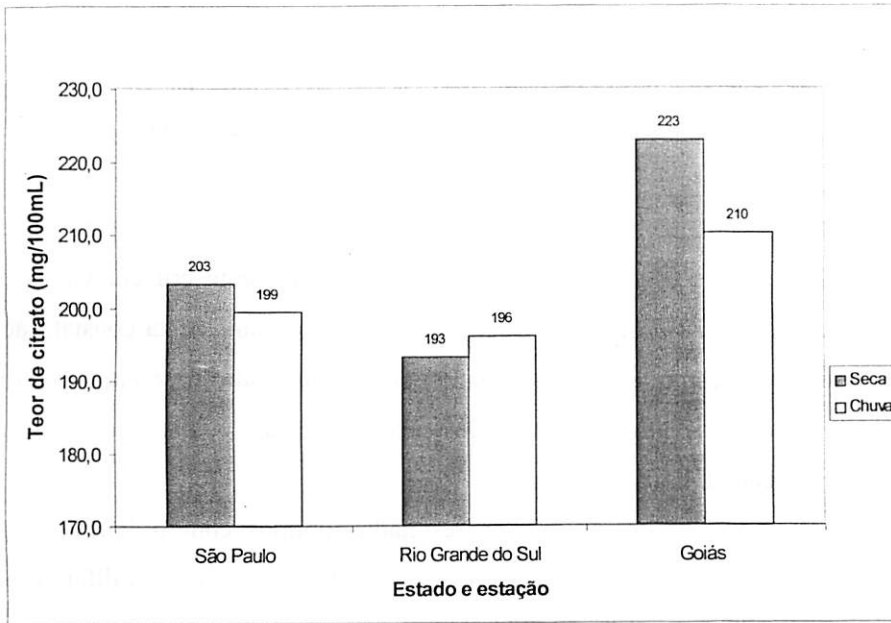


FIGURA 23 Teores médios de citrato no leite UHT por estado e por estação

Comparando-se os dados das Figuras 22 e 23, revela-se que as diferenças entre os teores de citrato no leite cru e no leite UHT estão compreendidas na faixa de 30 a 42 mg/100 mL. No acompanhamento dos processamentos, foi observado que se buscava uma adição de 40 mg/100 mL, portanto, é lícito considerar que são necessárias melhorias no processo de adição do citrato ao leite.

Fox (1991) afirmou que as adições de citrato e fosfato promovem aumento da estabilidade térmica do leite, pelo efeito seqüestrador sobre o cálcio iônico e, no caso do citrato, pela redução do fosfato de cálcio coloidal por meio da conversão a citrato solúvel não-ionizado. Este fundamento serve como justificador do emprego disseminado do citrato para a estabilização do leite destinado ao processamento UHT no Brasil.

Em que pese o efeito favorável da adição do citrato, neste trabalho tornou-se claro que os teores naturais de citrato variam entre regiões do Brasil e estações do ano, o que repercute no teor final de citrato no leite UHT, quando se emprega um percentual fixo de adição.

De modo mais visível, ainda reportando-se aos valores das Figuras 22 e 23, nota-se que, na estação seca, o teor de citrato no leite cru em Goiás é idêntico ao teor final de citrato no leite UHT em São Paulo. Esta constatação permite a proposição que não é adequado uniformizar a adição de citrato, pelo contrário, ajustes devem ser conduzidos nos percentuais empregados a cada estação e em cada fábrica.

Ampliando e confirmando os resultados obtidos com o leite cru, a análise de variância dos teores de citrato no leite UHT mostrou haver diferenças significativas entre os estados ( $P < 0,001$ ) e entre as estações ( $P < 0,05$ ).

A comparação das médias por estado, com auxílio do Teste de Tukey (Tabela 21), comprovou que o teor de citrato no leite UHT em Goiás foi significativamente maior do que em São Paulo e no Rio Grande do Sul. No que se refere às estações, evidenciou-se que na seca o teor de citrato foi superior ao encontrado na chuva, com médias 207,39 mg/100 mL ( $n=9$ ) e 201,87 mg/100 mL ( $n=9$ ), respectivamente. A coerência destes dados com aqueles do leite cru é evidente e contribui para mostrar a importância do estudo individualizado para a correta definição do percentual de citrato a ser empregado pelas indústrias no processamento de leite UHT.

TABELA 21 Teor médio de citrato (mg/100 mL) do leite UHT coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de citrato do leite UHT (mg/100mL)
Rio Grande do Sul	194,60 b
São Paulo	201,32 b
Goiás	217,96 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A análise de correlação para os teores de citrato, tanto no leite cru quanto no leite UHT, mostrou que a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem comportou-se com coeficientes negativos. Os coeficientes calculados ( $P < 0,05$ ,  $n=7$ ) foram  $-0,8504$  e  $-0,9485$  para leite cru e UHT, respectivamente, na estação seca. O efeito nos estados ( $P < 0,05$ ,  $n=6$ ) foi comprovado pelos coeficientes  $-0,8393$  e  $-0,8037$ , para Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente.

Disto deduz-se que teores mais elevados de citrato no leite cru e no leite UHT contribuem para o controle da taxa de sedimentação. Não se deve, no entanto, fazer adições excessivas e desnecessárias de citrato ao leite cru, visto que é recomendável o conhecimento prévio do teor natural de citrato e de suas variações ao longo das estações do ano.

Os trabalhos consultados a respeito do emprego do citrato (Parry, 1974 e Hostettler, 1981) vêm reforçar os resultados aqui descritos, por também atribuírem ao citrato um relevante efeito para a redução na formação de sedimentos no leite UHT.

#### 4.9 Teor de uréia

Os compostos nitrogenados não-protéicos do leite, dos quais a uréia representa aproximadamente 50%, são aqueles de baixa massa molar e que não se precipitam com as proteínas na presença de ácido tricloroacético (Walstra & Jenness, 1984).

Os resultados obtidos neste trabalho estão dentro da faixa de variação (18 a 28,0 mg/100 mL) considerada normal por Wolfschoon-Pombo & Lima (1983), que estudaram o teor de uréia em 185 amostras de leite na região de Juiz de Fora, MG.

Na Figura 24 são mostrados os resultados para os teores médios de uréia no leite cru por estado e por estação.

Dados relatados por Walstra & Jenness (1984) mostram uma faixa de variação de 8,4 a 28,0 mg/100 mL para o teor de uréia.

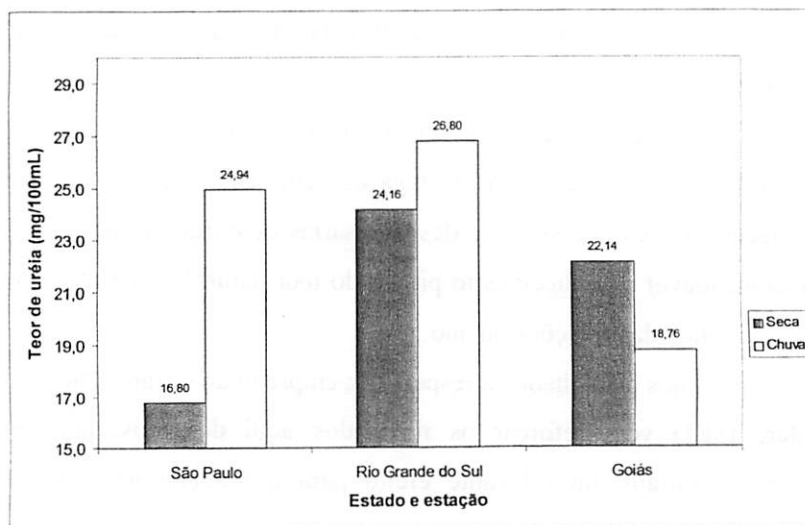


FIGURA 24 Teores médios de uréia no leite cru por estado e por estação

Houve efeito significativo de estados pela aplicação da análise de variância ( $P<0,01$ ). O maior teor de uréia foi detectado no leite cru do Rio Grande do Sul ( $P<0,05$ ), a partir dos resultados do teste de Tukey (Tabela 22).

TABELA 22 Teor médio de uréia (mg/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de uréia do leite cru (mg/100mL)
Rio Grande do Sul	25,48 a
São Paulo	20,87 b
Goiás	20,44 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A diferença encontrada entre os teores médios de uréia nos estados pode ser imputada, principalmente, às práticas alimentares e às características do gado próprias de cada região.

Em estudos realizados por diversos autores citados por Wolfschoon-Pombo & Lima (1983), o fornecimento de maior teor de proteínas na alimentação pode levar ao incremento na uréia no leite. Foi também demonstrada a influência positiva da mudança do regime de confinamento para pastagem livre sobre a uréia. Outro efeito, no sentido inverso, é a administração de alimentos com baixo conteúdo energético.

A massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem mostrou ter correlação negativa ( $-0,8159$ ,  $P<0,005$ ,  $n=6$ ) com o teor de uréia do leite cru no Rio Grande do Sul. Por este estado ter apresentado o maior teor de

uréia, o efeito sobre a taxa de sedimentação pôde ser observado.

Segundo Shalabi & Fox (1982), a uréia estabiliza o leite ao calor na presença de um composto carbonilado, como um açúcar redutor e esta estabilização contribui para a redução na sedimentação.

A análise de correlação por estações indicou que, na estação seca, o teor de uréia no leite cru contribuiu para o aumento da estabilidade ao etanol, tanto do leite cru quanto do leite UHT, com coeficientes 0,8237 e 0,7742 ( $P < 0,05$ ,  $n=7$ ), respectivamente. Este efeito estabilizador se deveu, em parte, à ação da uréia inibindo a formação de ácido, podendo também ser parcialmente convertida em cianureto de amônio, bloqueando os grupos  $\epsilon$ -amino e atuando sobre os grupos tiol das proteínas (Walstra & Jenness, 1984).

#### **4.10 Teores de nitrogênio e proteínas**

O leite bovino contém vários compostos nitrogenados, dos quais aproximadamente 95% ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não protéicos. Em torno de 80% do nitrogênio protéico do leite constitui-se de nitrogênio caseínico e 20% de nitrogênio não caseínico (Walstra e Jenness, 1984).

Nas Figuras 25 e 26 são mostrados os resultados para os teores médios de nitrogênio e proteínas, respectivamente, no leite cru por estado e por estação.

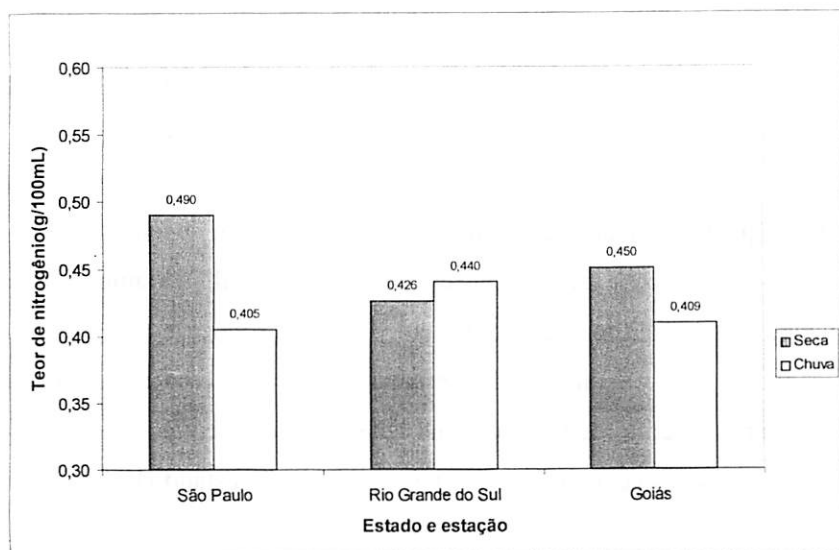


FIGURA 25 Teores médios de nitrogênio no leite cru por estado e por estação

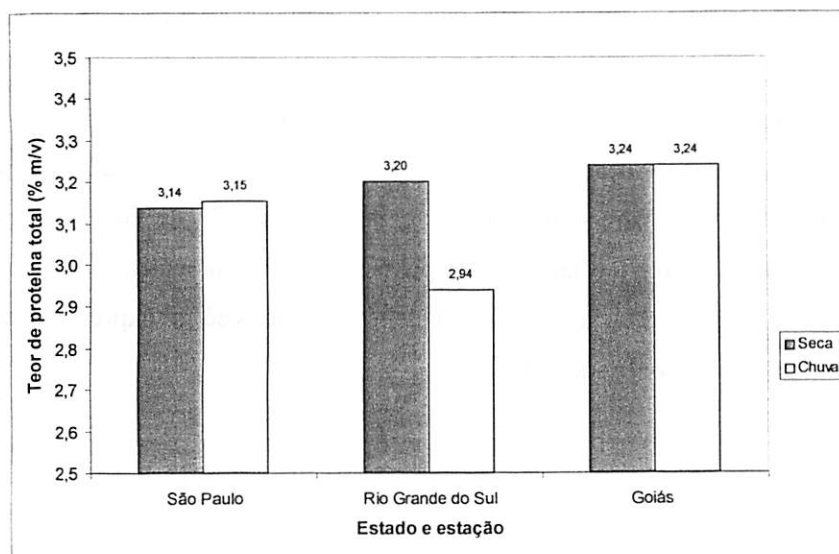


FIGURA 26 Teores médios de proteínas no leite cru por estado e por estação

Os leites analisados neste trabalho apresentaram teores de nitrogênio e proteínas menores quando comparados com Walstra & Jenness (1984), que citam os valores de 0,53 g/100 mL e 3,3 g/100 mL, respectivamente.

Este fato pode ser atribuído às análises serem provenientes de leite de conjunto, enquanto os dados de literatura usualmente tratam de leites de animais individuais, mas também leva a uma reflexão sobre a qualidade nutricional da alimentação do gado nas regiões estudadas.

Com auxílio da análise de variância, houve diferença significativa ( $P<0,014$ ) entre os teores de nitrogênio no leite cru apenas entre as estações. Os resultados para proteínas mostram que houve efeitos de estado ( $P<0,014$ ) e de estação ( $P<0,025$ ).

Segundo De Peters e Cant (1992), diversos fatores influenciam a composição e a distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como: temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça, alimentação e teor energético da alimentação. As raças e o regime de criação, detalhados no anexo C, podem ter contribuído para as diferenças verificadas.

A maior média ( $P<0,05$ ) para o teor de nitrogênio no leite cru foi encontrada na estação seca, após aplicação do teste de Tukey (Tabela 23), sendo o mesmo observado para o teor de proteínas. O emprego de concentrado e silagem nesta estação é um fator com papel destacado no incremento dos teores notados em relação à estação chuvosa. O efeito de estados só foi expressivo para o teor de proteínas, conforme Tabela 24.

TABELA 23 Teores médios de nitrogênio e de proteínas (g/100 mL) no leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo, nas estações seca e chuvosa

Estação	Teor de nitrogênio do leite cru (g/100 mL)	Teor de proteínas do leite cru (g/100 mL)
Seca	0,456	3,20
Chuvosa	0,418	3,10

TABELA 24 Teor médio de proteínas (g/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de proteínas do leite cru (g/100 mL)
Rio Grande do Sul	3,07 b
São Paulo	3,15 a b
Goiás	3,24 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

O maior teor de proteínas encontrado no leite coletado no estado de Goiás parece revelar influências de condições de alimentação e de raças bovinas sobre o teor de proteínas no leite.

Há que se levar em consideração uma possível participação do teor de nitrogênio não protéico nos dados acima, pois os resultados do teor de proteína se referem à proteína bruta, a qual abrange os nitrogênios protéico e não-protéico. Conforme Grappin & Ribadeaus-Duma (1992), como a fração não

protéica não é medida pelo infravermelho, qualquer variação na proporção do nitrogênio não-protéico pode influenciar a exatidão dos resultados obtidos em equipamentos calibrados para expressão em proteína bruta, como foi o caso deste trabalho.

Nas Figuras 27, 28 e 29 são apresentados os resultados para teores de nitrogênio no leite UHT, nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

Nas Figuras 30, 31 e 32 são apresentados os resultados para teores de proteínas no leite UHT, nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

O comportamento similar encontrado para os teores de nitrogênio e proteínas reforça a demonstração do comportamento ao longo da estocagem.

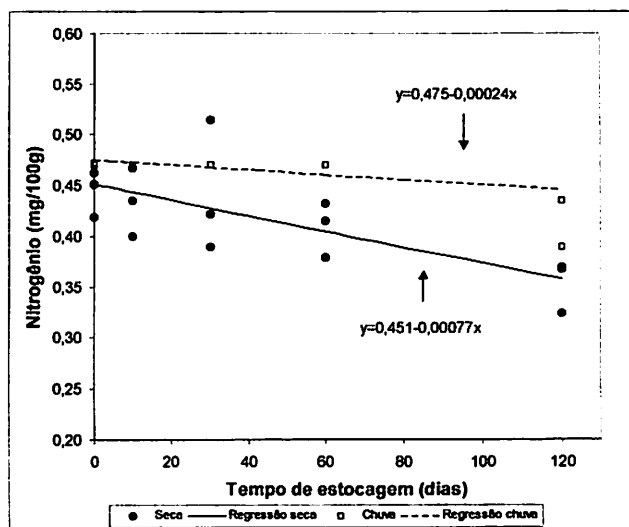


FIGURA 27 Evolução do teor de nitrogênio durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

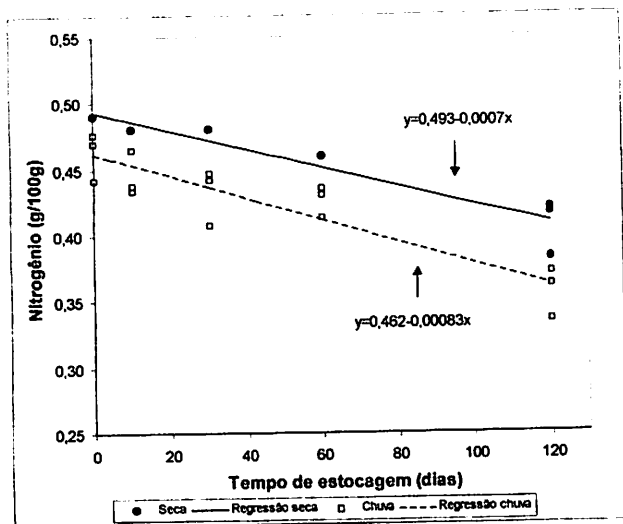


FIGURA 28 Evolução do teor de nitrogênio durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

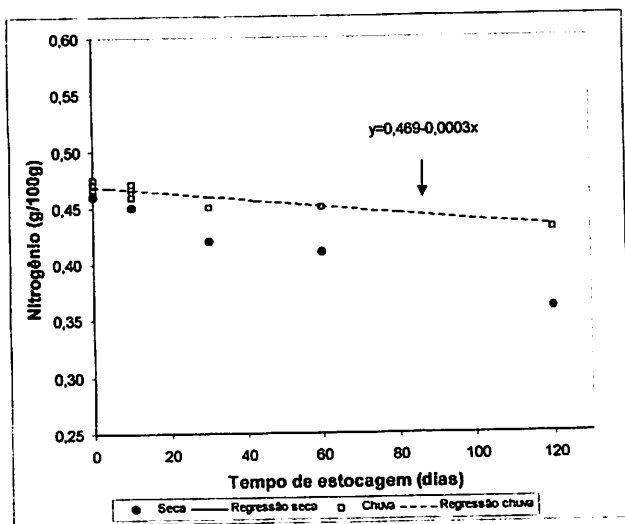


FIGURA 29 Evolução do teor de nitrogênio durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

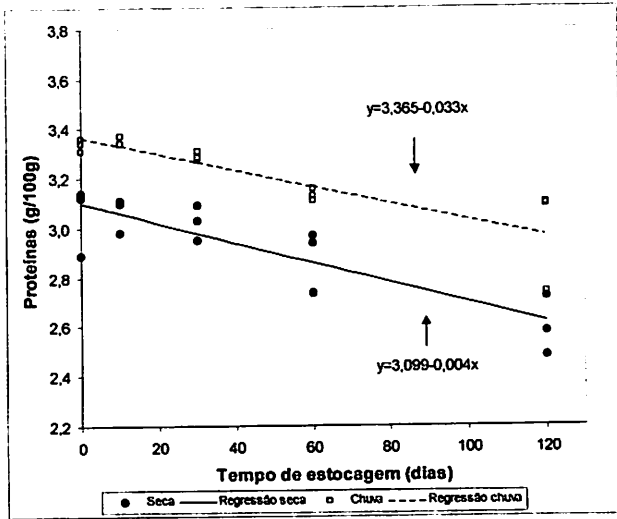


FIGURA 30 Evolução do teor de proteínas durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

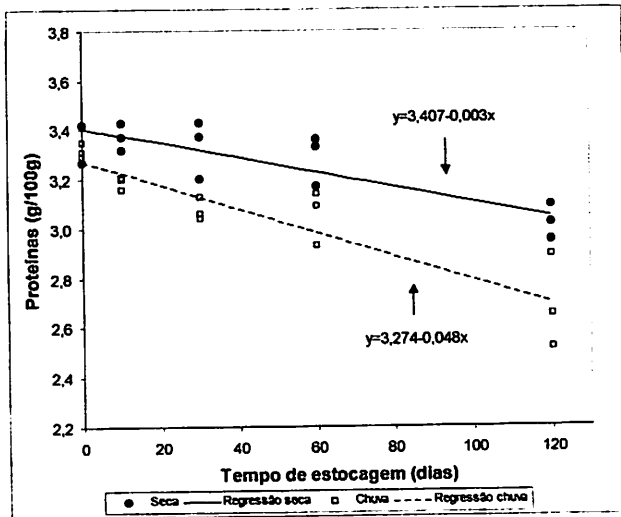


FIGURA 31 Evolução do teor de proteínas durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

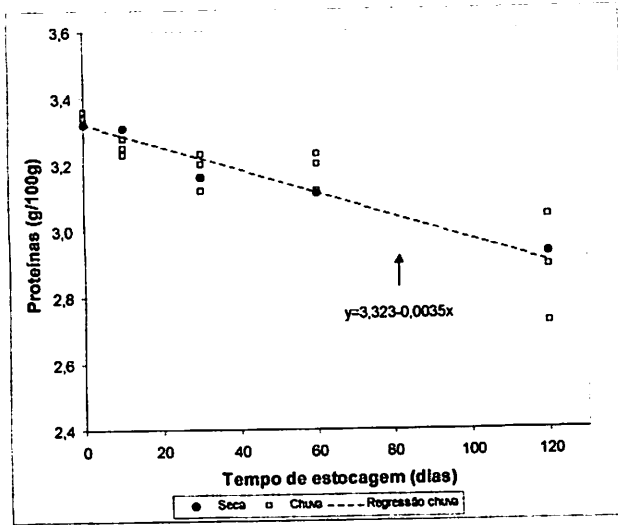


FIGURA 32 Evolução do teor de proteínas durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

Com base nos gráficos das Figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32, depreende-se que os teores nitrogênio e de proteínas tendem a sofrer redução à medida que se prolonga a estocagem do leite UHT, caso seja observada a formação de sedimentos.

Na formação de sedimentos, há depósito de proteínas (Renner & Schmidt, 1981), o que pode ter concorrido para o comportamento observado para o nitrogênio, embora não se tenha obtido correlação significativa ( $P > 0,176$ ) com a taxa de sedimentação.

No entanto, a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem correlacionou-se negativamente com o teor de proteínas do mesmo leite ( $P < 0,01$ ,  $n=6$ ). Os coeficientes de correlação obtidos foram  $-0,9252$  no Rio Grande do Sul e  $-0,9508$  em São Paulo. Isto vem a confirmar a migração de proteínas para os sedimentos ao longo do tempo de estocagem.

#### 4.11 Teor de gordura

A gordura do leite é constituída por mais de 98% de triacilgliceróis. Outros lípides presentes são colesterol, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e fosfolípides. Os ácidos graxos que ocorrem no leite variam de quatro a vinte átomos de carbono e de zero a quatro ligações duplas (Walstra e Jenness, 1984).

Na Figura 33 são mostrados os resultados para os teores médios de gordura no leite cru por estado e por estação.

Não houve efeitos de estado ( $P > 0,315$ ) nem de estação ( $P > 0,549$ ) sobre o teor de gordura no leite cru. Não obstante, os teores médios de gordura encontram-se abaixo dos relatos da literatura, porém dentro das faixas de variação reportadas. Podem ser citados Walstra e Jenness (1984), que se referem

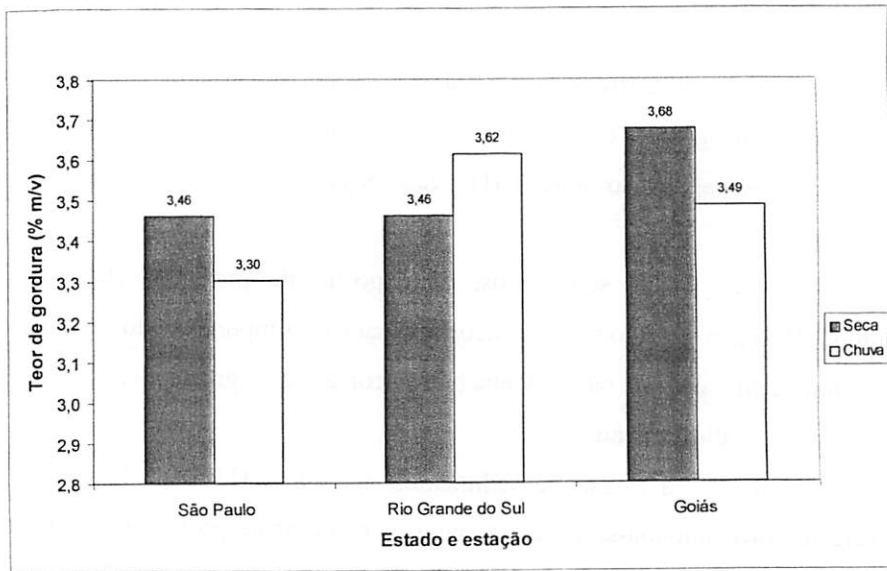


FIGURA 33 Teores médios de gordura no leite cru por estado e por estação

ao teor médio de gordura no leite bovino como 3,9% (m/m), com faixa de variação compreendida entre 2,4% e 5,5% (m/m). Em estudo realizado por Ponce et al. (1999), em mais de 800 mil amostras de leites cru em Cuba, obtiveram o teor médio de gordura igual a 3,73% (m/v), variando de 2,7% a 5,9% (m/v).

Na Tabela 25 são listados os teores de gordura no leite UHT, por estado e por estação.

TABELA 25 Teor médio de gordura (g/100 mL) do leite UHT coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo, nas estações seca e chuvosa

Estado Estação	Rio Grande do Sul		São Paulo		Goiás	
	Seca	Chuva	Seca	Chuva	Seca	Chuva
Teor de gordura do leite UHT (g/100 mL)	0,19	0,06	0,08	0,14	0,14	0,10

Todas as amostras analisadas estão em conformidade com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (Brasil, 1997), o qual prescreve o teor máximo de gordura igual a 0,5% para leite UHT desnatado.

#### 4.12 Teor de lactose

A lactose é um glicídeo formado por um radical de D-glicose unido a um radical de D-galactose por meio de ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. É um glúcido redutor e o aquecimento do leite leva à reação de Maillard, com condensação do

grupamento aldeídico da lactose com o grupo amino de proteínas e peptídeos (Walstra e Jenness, 1984).

Os teores médios de lactose no leite cru por estado e por estação são expostos na Figura 34. Com auxílio da análise de variância, foi possível constatar que o teor médio de lactose das amostras de leite coletadas em São Paulo foi significativamente ( $P < 0,001$ ) superior ao do Rio Grande do Sul. Em Goiás, o teor de lactose posicionou-se entre os outros dois estados. Comparando-se as estações, também foi identificada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ).

As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, conforme Tabela 26, para os estados. Nas estações, o maior teor de lactose ( $P < 0,05$ ) ocorreu na estação seca (4,66 g/100 mL,  $n=9$ ) em relação à estação chuvosa (4,48 g/100 mL,  $n=9$ ).

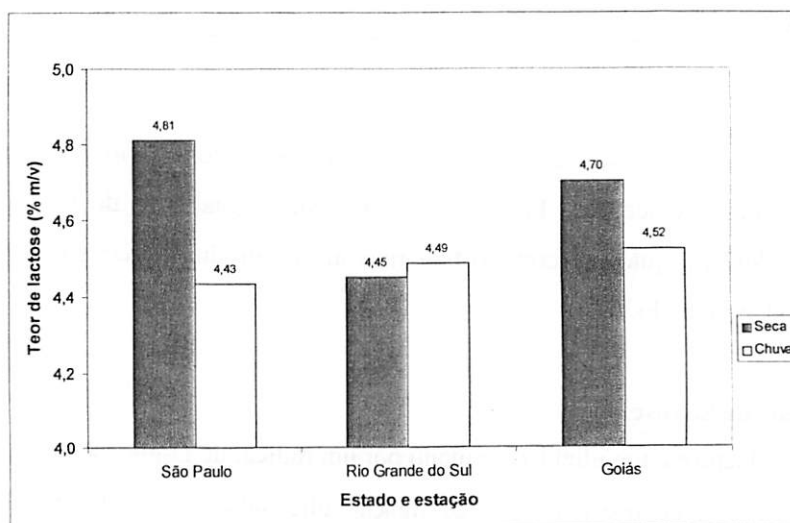


FIGURA 34 Teores médios de lactose no leite cru por estado e por estação

TABELA 26 Teor médio de lactose (g/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Teor de lactose do leite cru (g/100mL)
Rio Grande do Sul	4,47 b
São Paulo	4,62 a
Goiás	4,61 a b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

De acordo com Walstra e Jenness (1984), a variação do percentual de lactose no leite bovino situa-se entre 4,5% e 5,0%. O trabalho de Ponce et al. (1999), realizado em Cuba com mais de 800 mil amostras de leites cru, indicou o teor médio de lactose igual a 4,75% (m/v), variando de 3,8% a 5,2% (m/v).

As diferenças de temperatura entre as estações provocaram impacto decisivo sobre a lactose, pois em todas as estações mais quentes (seca no Rio Grande do Sul e chuva em São Paulo e Goiás), os teores de lactose foram mais baixos do que nas estações mais frias (chuva no Rio Grande do Sul e seca em São Paulo e Goiás). Efeito semelhante foi descrito por Walstra e Jenness (1984), que demonstraram a influência de temperaturas ambientais altas sobre a composição do leite, tendo sido encontrados teores mais baixos de lactose, nestas condições.

#### 4.13 Teores de extrato seco total e desengordurado

Ao apresentar a composição aproximada do leite, Walstra & Jenness (1994) forneceram dados que permitem calcular o valor médio de 12,7% (m/m) para o extrato seco total, variando de 11,3% a 14,5% (m/m).

#### **4.13.1 Teores de extrato seco total e desengordurado no leite cru**

Nos leites analisados neste trabalho foram detectados teores de extrato seco total dentro da faixa de variação citada anteriormente. Os resultados médios por estado e por estação podem ser observados na Figura 35. Os valores para extrato seco desengordurado são apresentados na Figura 36.

Há diversos fatores que promovem variações quantitativas e qualitativas na composição do leite, como os genéticos (raças e indivíduos), fisiológicos e ambientais (alimentação, clima e manejo), conforme relataram Walstra & Jenness (1984).

Tais fatores foram particularmente verificáveis pelas diferenças significativas encontradas entre os teores de extrato seco total no leite cru entre os estados ( $P < 0,023$ ) e entre as estações ( $P < 0,002$ ). No caso do extrato seco desengordurado, o efeito de estado foi significativo ( $P < 0,032$ ).

Os estados estudados possuem, além de diferenças na condições climáticas nas estações (Anexo B), diferenças nos manejos alimentar e reprodutivo dos rebanhos, os quais se compõem de diferentes raças (Anexo C).

Comparando-se as médias entre estados, empregando-se o teste de Tukey (Tabela 27), verificou-se que o teor de extrato seco total das amostras de leite coletado em Goiás superou o Rio Grande do Sul, com São Paulo apresentando-se com teor interposto aos demais.

Em se tratando do extrato seco desengordurado, os leites coletados no estado do Rio Grandes do Sul permaneceram com as menores médias. No estado de Goiás, encontraram-se as médias com valores intermediários e as maiores médias foram verificadas em São Paulo.

A maior média ( $P < 0,05$ ) foi encontrada na estação seca (12,30 g/100 mL,  $n=9$ ) em relação à chuvosa (12,08 g/100 mL,  $n=9$ ). Tais aspectos revelam as diferentes condições de manejo, alimentação e de raças bovinas que afetam os sólidos do leite.

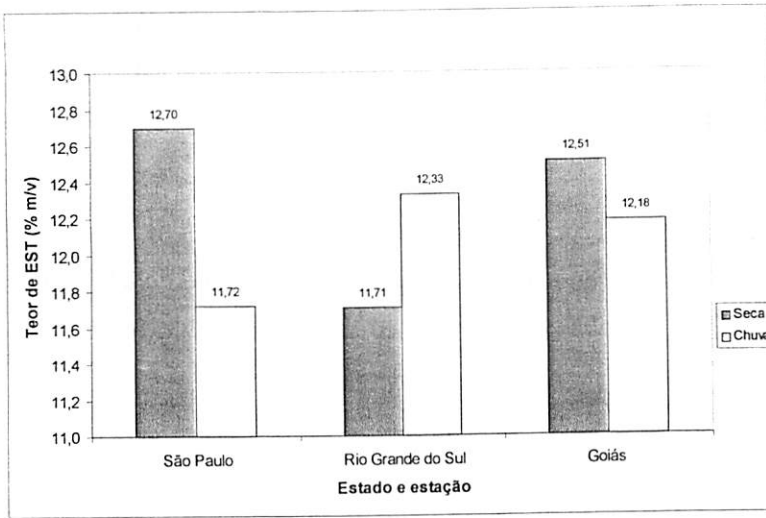


FIGURA 35 Teores médios de extrato seco total no leite cru por estado e por estação

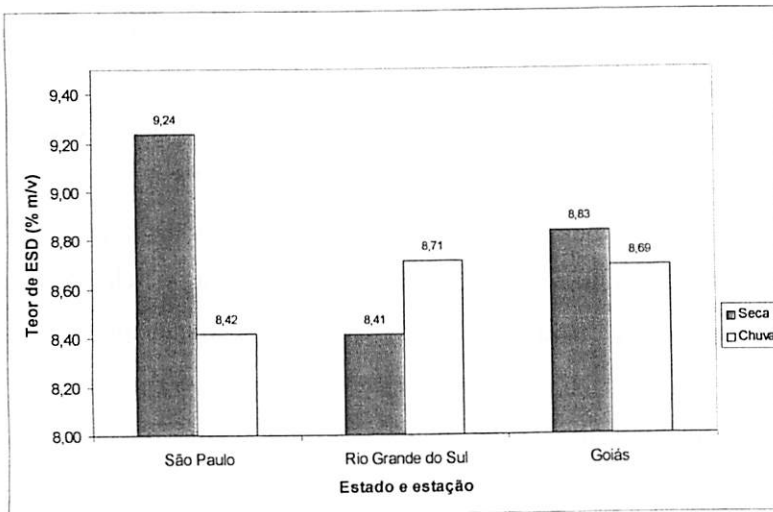


FIGURA 36 Teores médios de extrato seco desengordurado no leite cru por estado e por estação

**TABELA 27 Teores médios de extrato seco total e desengordurado (g/100 mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo**

Estado	Teor de extrato seco total do leite cru (g/100 mL)	Teor de extrato seco desengordurado do leite cru (g/100 mL)
Rio Grande do Sul	12,02 b	8,48 b
São Paulo	12,21 a b	8,83 a
Goiás	12,34 a	8,76 a b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A maior média ( $P < 0,05$ ) foi encontrada na estação seca (12,30 g/100 mL, n=9) em relação à chuvosa (12,08 g/100 mL, n=9). Tais aspectos revelam as diferentes condições de manejo, alimentação e de raças bovinas que afetam os sólidos do leite.

Empregando a análise de regressão foi possível verificar a evolução do extrato seco desengordurado durante a estocagem do leite UHT.

Nas Figuras 37, 38 e 39 são apresentados os resultados para teores de extrato seco desengordurado no leite UHT, nas estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

A exemplo dos teores de proteínas e minerais, ficou demonstrado, ao se observar as curvas e equações das Figuras 37, 38 e 39, que o teor extrato seco desengordurado sofre queda gradual ao longo do tempo de estocagem do leite UHT, em todos os estados e em todas as estações, acompanhando a formação de sedimentos no produto.

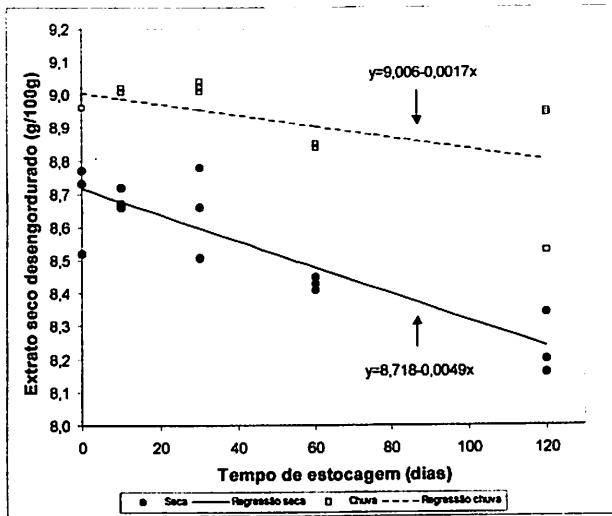


FIGURA 37 Evolução do teor de extrato seco desengordurado durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

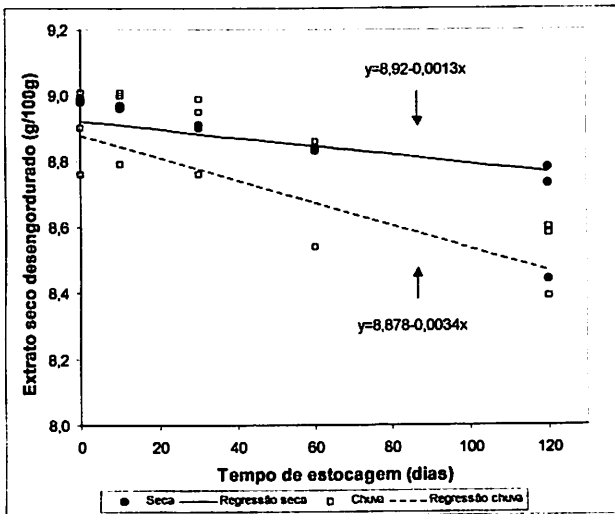


FIGURA 38 Evolução do teor de extrato seco desengordurado durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

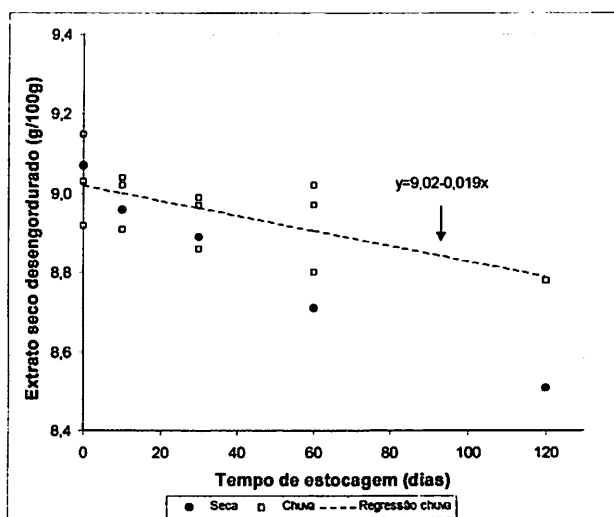


FIGURA 39. Evolução do teor de extrato seco desengordurado durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

#### 4.14 pH e acidez

Os valores de pH e acidez do leite não são proporcionais, embora haja uma relação inversa; ou seja, à medida que a acidez se eleva, ocorre abaixamento do pH. A dificuldade na obtenção de uma boa correlação está ligada no fato que na determinação da acidez são quantificados os prótons hidrogênio livres (íons) e acessíveis (ionizáveis/dissociáveis); por outro lado, apenas os prótons hidrogênio livres (íons) são quantificados na determinação do pH (Silva & Torres, 1995).

Os valores de pH do leite cru variaram entre 6,60 e 6,77, considerando-se os três estados e as duas estações e não foi detectada diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,492$  e  $P > 0,374$ , respectivamente). A acidez apresentou baixa amplitude de variação, entre 0,14 e 0,18 g ácido láctico/litro, tanto para o leite cru quanto para o leite pasteurizado.

Todos os valores de acidez encontraram-se em conformidade com as legislações de leite UHT (Brasil, 1997) e de leite cru refrigerado (Brasil, 2002b). A acidez contribuiu pouco para o entendimento dos fenômenos relacionados aos processos de gelificação e sedimentação no leite UHT.

Fazendo-se uma abordagem da evolução do pH ao longo da estocagem do leite UHT, pôde-se elaborar as curvas e gráficos relacionados nas Figuras 40, 41 e 42, com os valores para as duas estações, nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

Silva (2001), em consonância com este trabalho, também detectou que o pH do leite UHT se reduz com o armazenamento.

A determinação de acidez não foi capaz de discriminar as alterações no leite UHT durante a vida de prateleira.

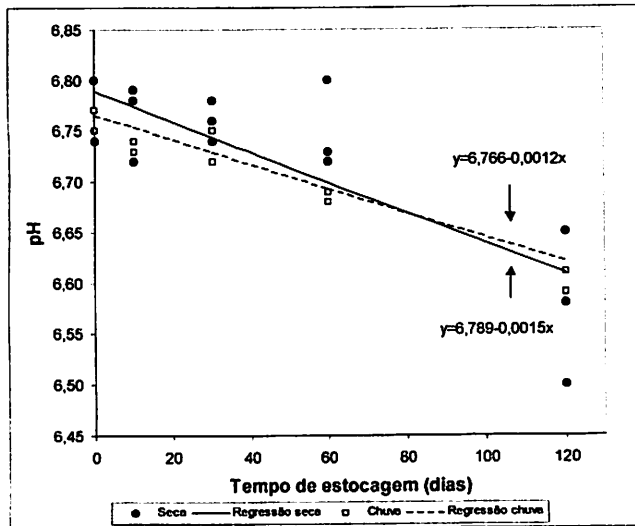


FIGURA 40 Evolução do pH durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

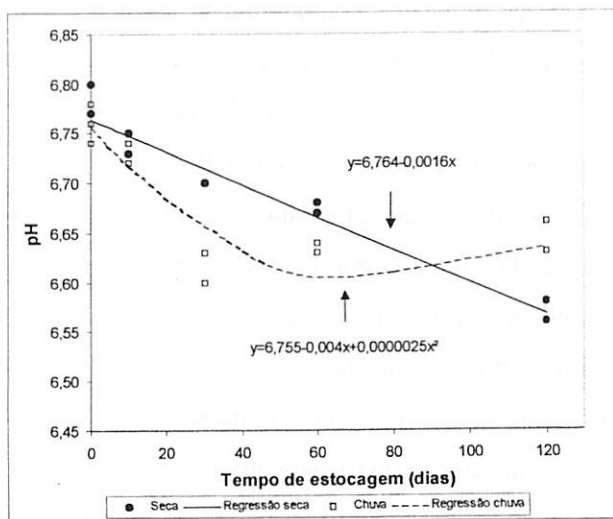


FIGURA 41 Evolução do pH durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

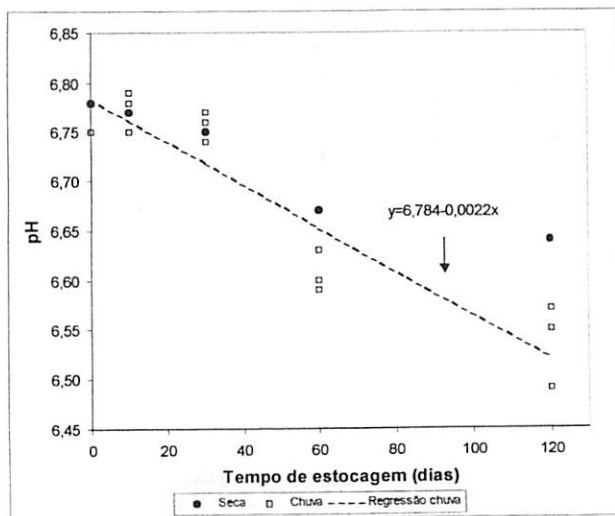


FIGURA 42 Evolução do pH durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

A medição do pH mostrou-se útil para uma avaliação dos compostos com caráter ácido, com implicações na qualidade do produto final.

O decréscimo no pH reflete a progressiva liberação de prótons hidrogênio, revelando instabilidade iônica que pode comprometer as propriedades do leite UHT. Renner & Schimidt (1981) apontam como possíveis causas os deslocamentos no equilíbrio salino, como a insolubilização de fosfato de cálcio, além da Reação de Maillard e de eventual desfosforilação da caseína.

#### **4.15 Estabilidade ao etanol**

O emprego do teste do álcool iniciou-se na Europa central, no início do século XX, com citações oficiais a partir de 1915. O objetivo inicial era avaliação da qualidade do leite para venda ao varejo. Posteriormente, o teste foi aceito como indicador de acidez, mistura do leite com colostro ou leite proveniente de animais com mastite. Na seqüência, a estabilidade ao etanol mostrou-se útil para seleção de leite a ser concentrado e, mais além, para avaliação da estabilidade do leite ao aquecimento. Por volta de 1980, estudos apontaram o valor do teste pela similaridade observada entre a instabilidade induzida pelo etanol e a instabilidade induzida pelo processamento UHT (Horne, 1992).

Na Figura 42 são mostrados os resultados para a estabilidade do leite cru ao etanol, por estado e por estação.

Pien (1972), citado por Shew (1981), sugeriu que, para fins de produção de leite UHT, o leite cru deve resistir, no mínimo, ao etanol a 74% (v/v).

Ponce et al. (1999) indicaram que instabilidade ao etanol a 70% (v/v) é um dos fatores que caracterizam a Síndrome do Leite Anormal em Cuba.

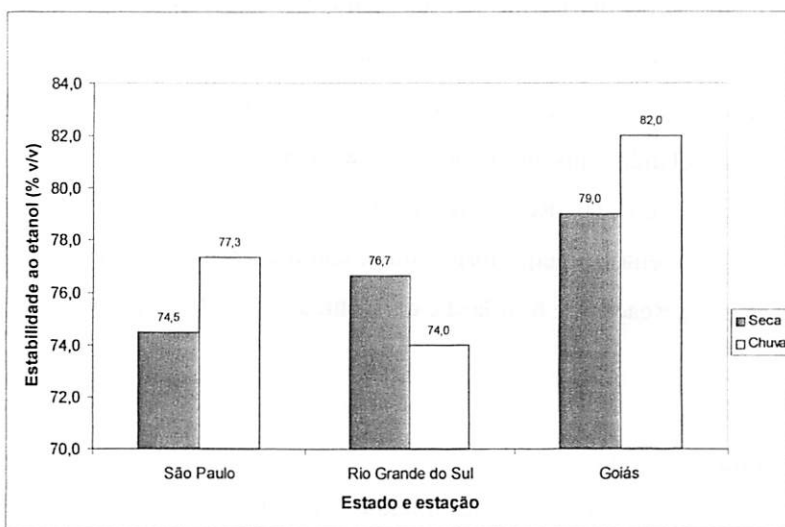


FIGURA 42 Estabilidade do leite cru ao etanol, por estado e por estação

Silva (2001) analisou 30 amostras de leite cru destinado à produção de leite UHT e verificou que todas resistiram ao etanol a 68% (v/v) e apenas uma não resistiu ao etanol a 74% (v/v).

Os resultados observados neste trabalho demonstram que os leites analisados exibiram considerável resistência ao etanol, com especial menção ao leite do estado de Goiás, sugerindo sua adequada aptidão para processamento UHT, com base neste critério.

O efeito de estado foi estatisticamente significativo para a estabilidade ao etanol ( $P < 0,001$ ). Procedeu-se à comparação das médias dos estados e os resultados podem ser visualizados na Tabela 28. O leite de Goiás destacou-se sobremaneira dos demais estados, o que pode se atribuir, parcialmente, ao maior teor de citrato registrado no leite cru de Goiás, que confere um aumento na resistência ao etanol pelo efeito seqüestrante do cálcio iônico.

TABELA 28 Estabilidade ao etanol (% v/v) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Estabilidade ao etanol do leite cru (% v/v)
Rio Grande do Sul	74,83 b
São Paulo	75,67 b
Goiás	80,50 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Harwalkar (1997), ao discutir as alterações durante a estocagem de leite UHT e autoclavado, afirmou que o complexo coloidal entre cálcio, fosfato e caseinato tem a sua estabilidade afetada e que há uma perda gradual da estabilidade ao etanol.

Os resultados do trabalho de Samuel et al (1971), citados por Harwalkar (1997), contribuíram para evidenciar a redução da estabilidade do leite UHT ao etanol, ao mostrarem que, com nove meses de estocagem, o valor do teste do álcool caiu de 96% (v/v) para 62% (v/v).

Pelas Figuras 43, 44 e 45 notam-se as modificações sucessivas na estabilidade ao etanol com o passar do tempo de estocagem do leite UHT. Observam-se os dados das estações seca e chuvosa, para os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

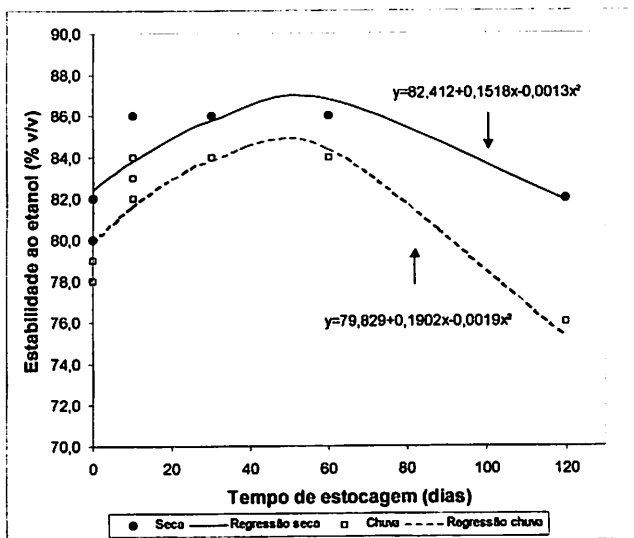


FIGURA 43 Evolução da estabilidade do leite UHT ao etanol, no Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

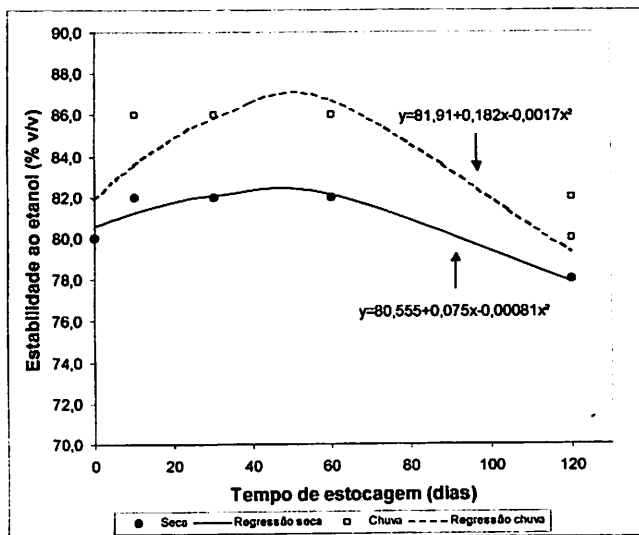


FIGURA 44 Evolução da estabilidade do leite UHT ao etanol, em São Paulo nas estações seca e chuvosa

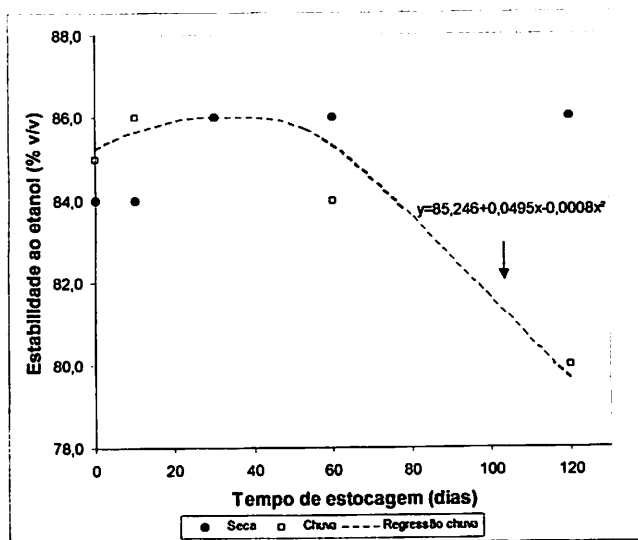


FIGURA 45 Evolução da estabilidade do leite UHT ao etanol, em Goiás nas estações seca e chuvosa

Em que pese o fato dos resultados aqui apresentados se alinharem à literatura, ao comprovarem a queda na resistência alcoólica do leite UHT ao longo do tempo, há uma característica que merece particular interesse. As regressões calculadas conduzem à interpretação de um aumento inicial da estabilidade ao etanol, atingindo o ápice em torno de 40 a 50 dias para, só, então, dar lugar ao decréscimo progressivo, resultando que a resistência alcoólica no final da estocagem seja menor que no início da mesma.

Não foram encontrados relatos equivalentes a este fato, o que remete a uma nova abordagem do fenômeno, sob as óticas acadêmica e industrial. Pode-se recorrer aos aspectos de equilíbrio salino no leite UHT para contribuir na explicação do ocorrido, visto ser razoável supor que se faça necessário um tempo para estabilização após adição do citrato e tratamento térmico. Por outro

lado, o desenvolvimento da sedimentação também tem a possibilidade de, a partir de um determinado ponto, passar a prejudicar a estabilidade ao álcool.

O mecanismo de desestabilização das caseínas por ação do etanol está vinculado ao efeito desnaturante do álcool, o qual promove redução na constante dielétrica da mistura, tornando-a um solvente desfavorável, podendo chegar a um limite crítico em que ocorra a precipitação. Vários fatores desempenham papéis relevantes, como as cargas e as interações entre as micelas, pH, concentração do álcool e composição do leite (Horne, 1992).

Na Tabela 29 têm-se os coeficientes de correlação de fatores estudados com a estabilidade dos leites cru e UHT ao etanol, por estado. O teor de cálcio no leite cru, ao apresentar correlação negativa com a resistência alcoólica, tanto no leite cru quanto no leite UHT com 120 dias, comprovou a relevância do

TABELA 29 Coeficientes de correlação para estabilidade dos leites cru e UHT ao etanol, por estado

Variável testada para correlação com a estabilidade ao etanol	Coeficiente de correlação			
	RS		SP	
	Leite cru	Leite UHT 120 dias	Leite cru	Leite UHT 120 dias
Teor de cálcio no leite cru	-0,8870 (*)	-	-0,8963 (*)	-0,8572 (*)
Teor de fósforo no leite cru	0,8240 (*)	-	-	-
Relação cálcio/fósforo no leite cru	-0,8574 (*)	-	-	-
Teor de cálcio no leite UHT com 120 dias	-	-0,9488 (**)	-	-

(\*) estatisticamente significativo (P<0,05).

(\*\*) estatisticamente significativo (P<0,01).

cálcio sobre a estabilidade protéica no leite. Relato similar foi descrito por Horne (1992).

O fósforo, por outro lado, associou-se positivamente com o resultado do teste do álcool, evidenciando que a maior concentração de fosfatos leva ao aumento da estabilidade.

A relação cálcio/fósforo mostrou que pode influenciar a resistência ao etanol, o que remete à importância do equilíbrio salino do leite na aptidão para processamento.

Na Tabela 30 têm-se os coeficientes de correlação de fatores estudados com a estabilidade dos leites cru e UHT ao etanol, por estação.

O efeito favorável do teor de uréia sobre a estabilidade do leite ao calor foi descrito por Walstra & Jenness (1984). Pelas correlações observadas na Tabela 30, pode-se também afirmar que a estabilidade do leite cru e do leite UHT ao etanol é melhorada em presença de maior teor de uréia.

**TABELA 30** Resultados da análise de correlação para estabilidade dos leites cru e UHT ao etanol, por estação

Variável testada para correlação com a estabilidade ao etanol	Coeficiente de correlação			
	Seca		Chuva	
	Leite cru	Leite UHT 120 dias	Leite cru	Leite UHT 120 dias
Teor de uréia no leite cru	0,8237 (*)	0,7742 (*)	-	-
Teor de fósforo no leite cru	-	-	0,7964 (*)	0,7989 (*)
Contagem de células somáticas no leite desnatado	-	-	-	-0,8605 (*)

(\*) estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ).

O teor de fósforo no leite cru conduziu à maior resistência alcoólica na estação chuvosa, de forma similar ao efeito nos estados. Tanto o leite cru quanto o leite UHT no final da validade tiveram o teor de fósforo do leite cru original como um fator de estabilização das micelas de caseína.

As alterações no balanceamento de lactose e sais reduzem a tolerância ao calor em leites provenientes de animais com mastite (Brito, 1999). É admissível que tais modificações afetem da mesma forma a estabilidade ao etanol, resultando na correlação negativa observada entre a contagem de células somática e a estabilidade ao álcool do leite UHT estocado.

#### **4.16 Ponto de congelamento**

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. A composição normal do leite gera um valor aproximado de  $-0,531^{\circ}\text{C}$  ( $-0,550^{\circ}\text{H}$ ) para o ponto crioscópico. Este valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, ocasionando dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos (Pereira et al., 2000).

Todas as amostras de leite cru analisadas apresentaram-se de acordo com o requisito oficial de índice crioscópico máximo de  $-0,530^{\circ}\text{H}$ , segundo a legislação concernente ao leite cru refrigerado (Brasil, 2002b).

A Figura 46 resume os pontos de congelamento no leite cru, por estados e estações.

Não houve efeito de estados sobre o ponto de congelamento ( $P>0,088$ ), entretanto, o efeito de estações foi estatisticamente significativo ( $P<0,005$ ).

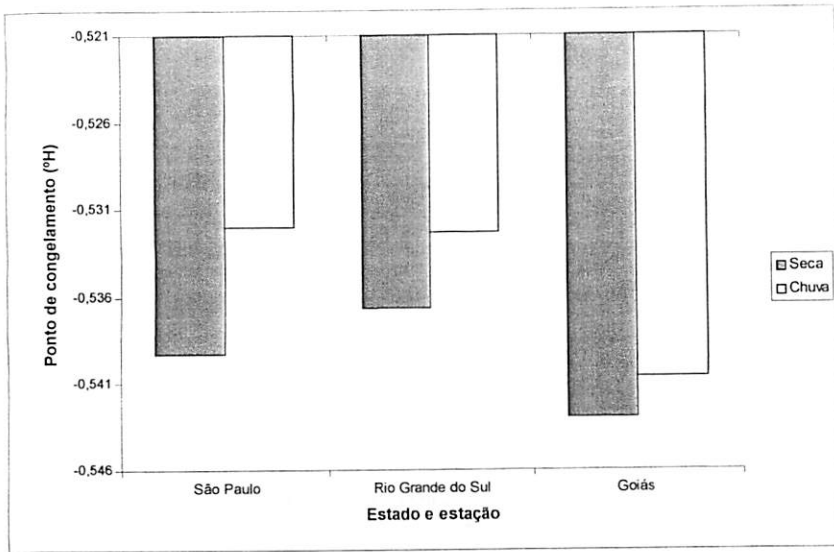


FIGURA 46 Ponto de congelamento do leite cru por estado e por estação

A comparação de médias pelo Teste de Tukey indicou que o ponto de congelamento na estação seca foi mais baixo (valor mais negativo) do que na estação chuvosa (-0,540°H e -0,533°H, respectivamente, n=9).

Tais aspectos revelaram as diferentes condições de manejo, alimentação e de raças bovinas que afetam os sólidos do leite.

Pelas Figuras 47, 48 e 49, é possível visualizar o ponto de congelamento do leite UHT durante o armazenamento, para as estações seca e chuvosa, nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, respectivamente.

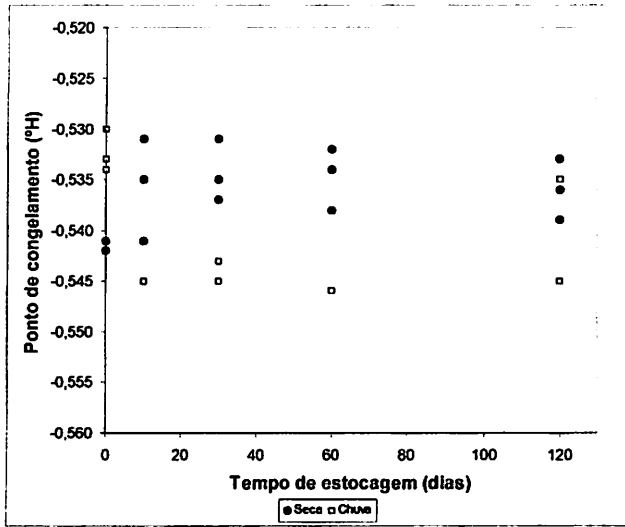


FIGURA 47 Evolução do ponto de congelamento durante a estocagem do leite UHT do Rio Grande do Sul nas estações seca e chuvosa

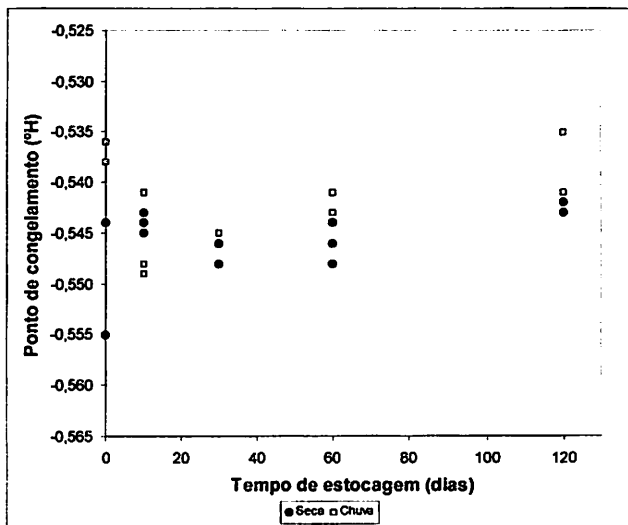


FIGURA 48 Evolução do ponto de congelamento durante a estocagem do leite UHT de São Paulo nas estações seca e chuvosa

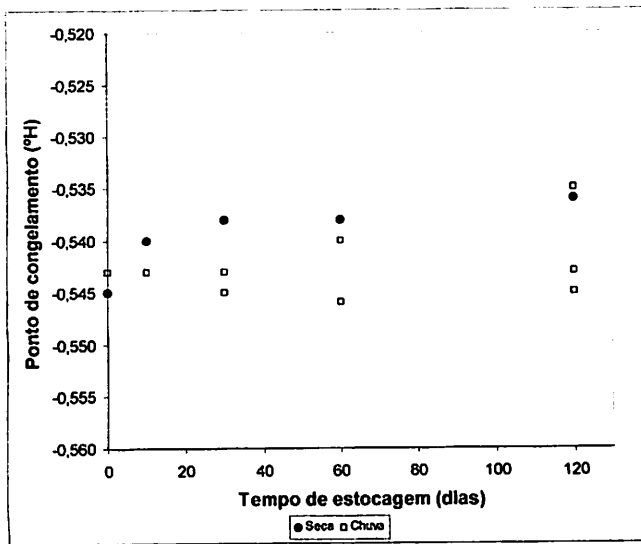


FIGURA 49 Evolução do ponto de congelamento durante a estocagem do leite UHT de Goiás nas estações seca e chuvosa

Não houve tendência linear nem quadrática do ponto de congelamento do leite UHT em relação ao fator tempo ( $P > 0,05$ ). Este fato pode estar relacionado ao efeito da adição do citrato sobre o ponto de congelamento, que promove uma alteração em direção a valores mais baixos (mais negativos). A migração de sais para os sedimentos que ocorreu durante a estocagem também pode ter exercido considerável influência sobre o ponto de congelamento, dificultando a obtenção de modelos ajustados de regressão.

Ao se deparar com o deslocamento do ponto de congelamento do leite UHT pela adição do citrato e eventual sedimentação, pode-se abordar a questão sob o aspecto legal. O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (Brasil, 1997) não preconiza o ponto de congelamento como um requisito do leite UHT. Neste contexto, é razoável admitirem-se as

dificuldades para se chegar a um valor de referência. Não se pode, no entanto, deixar de levar em conta os resultados obtidos neste trabalho e a necessidade de prosseguir-se na busca de uma melhor caracterização do leite UHT com respeito ao ponto de congelamento.

#### **4.17 Contagem de microrganismos mesófilos**

Dos leites analisados, apenas em São Paulo na estação seca obteve-se média de contagem de microrganismos mesófilos abaixo do valor máximo legal para leite cru refrigerado (Brasil, 2002b), que é  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL.

Na Figura 50 podem ser observados os resultados para as contagens de microrganismos mesófilos no leite cru por estado e por estação.

Não obstante o fato que o atendimento ao padrão legal seja obrigatório apenas a partir de 01/07/2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, os resultados remetem a uma clara necessidade de aplicação mais efetiva de investimentos na qualidade microbiológica do leite cru pelas fábricas que participaram deste trabalho.

Teuber & Busse (1981), ao discorrerem sobre os aspectos microbiológicos relacionados ao leite UHT, afirmaram que a qualidade microbiológica do leite cru merece especial atenção para que sejam alcançados os objetivos de obtenção de um produto final comercialmente estéril.

Houve efeito significativo de estados sobre a contagem de microrganismos mesófilos ( $P < 0,006$ ).

Ao aplicar-se o teste de Tukey (Tabela 31), ficou evidenciado que a média do estado de São Paulo foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) do que as médias de Goiás e Rio Grande do Sul, as quais não diferiram entre si.

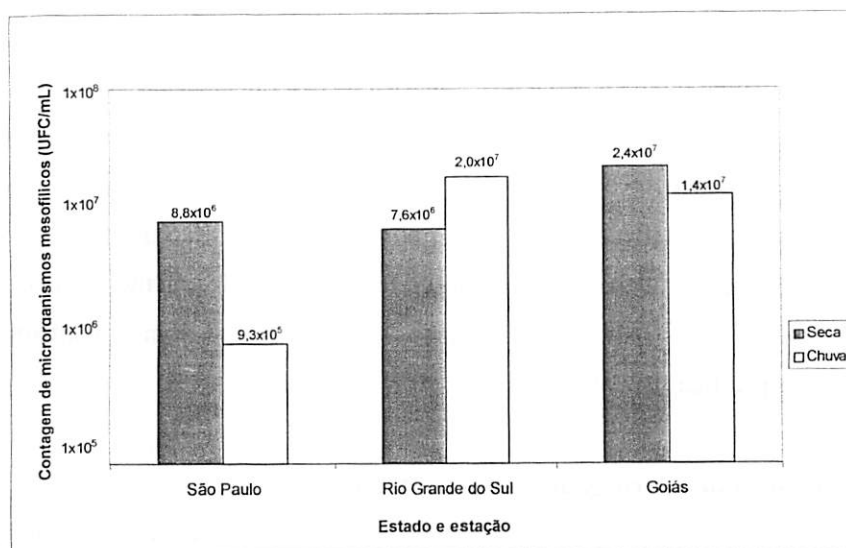


FIGURA 50 Contagens de microrganismos mesófilos por estado e por estação

TABELA 31 Contagem média de microrganismos mesófilos (UFC/mL) do leite cru coletado nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Contagem de microrganismos mesófilos do leite cru (UFC/mL)
Rio Grande do Sul	$1,4 \times 10^7$ a
São Paulo	$4,9 \times 10^6$ b
Goiás	$1,9 \times 10^7$ a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Os dados de São Paulo podem ter recebido influência da menor distância entre os centros de produção do leite e a fábrica de laticínios, quando comparada com os percursos necessários em Goiás e Rio Grande do Sul e seus respectivos tempos de permanência do leite sob refrigeração. De fato, a otimização das linhas de leite e uma eficaz utilização dos postos de refrigeração podem reduzir o intervalo entre a ordenha e a recepção do leite no estabelecimento industrial, tendo sempre como balizador o período máximo de 48 horas, conforme legislação específica (Brasil, 2002a).

#### 4.18 Contagem de microrganismos psicrotróficos

As contagens de microrganismos psicrotróficos no leite cru, por estado e por estação, são resumidas na Figura 51.

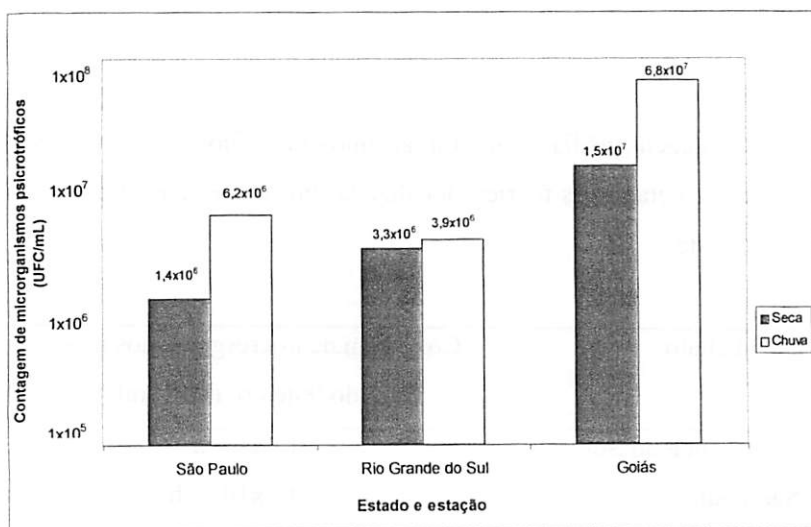


FIGURA 51 Contagens de microrganismos psicrotróficos por estado e por estação

As altas contagens de microrganismos psicrotróficos obtidas, particularmente no leite de Goiás, indicam que a implantação de um programa de granelização deve ser acompanhada de ações eficazes que evitem a contaminação do leite durante a produção, estocagem refrigerada, coleta e transporte a granel. Em paralelo, a redução do tempo em que o leite é mantido refrigerado deve ser um objetivo a ser alcançado.

É relevante e prejudicial um número elevado de horas de refrigeração, resultante do somatório das horas no centro de produção, durante o transporte até o posto de refrigeração, descarregamento-estocagem-carregamento no posto de refrigeração, transporte até a fábrica, descarregamento e estocagem na fábrica que precede a aplicação industrial.

Bigalke (1985), ao discutir o termo microrganismo psicrotrófico na área de laticínios, esclarece que se trata de bactérias capazes de realizarem considerável crescimento no leite e em produtos lácteos, em temperaturas de refrigeração (2°C a 7°C), independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. As bactérias psicrotróficas diferem das bactérias psicrófilas, pois estas últimas têm sua temperatura ótima de crescimento à temperatura de refrigeração.

A análise de variância para as contagens de microrganismos psicrotróficos mostrou serem significativos os efeitos de estado ( $P < 0,002$ ) e de estação ( $P < 0,037$ ).

Quando da aplicação do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparação de médias entre estações, obteve-se a maior média na estação chuvosa ( $2,6 \times 10^7$  UFC/mL,  $n=9$ ), enquanto na estação seca a média foi  $6,5 \times 10^6$  UFC/mL ( $n=9$ ). De tais resultados depreende-se que o risco de contaminação e proliferação de psicrotróficos no leite cru é aumentado durante o período de chuvas, com conseqüente impacto negativo sobre a qualidade do leite UHT. Isto pôde ser comprovado por meio do maior aumento de viscosidade observado no leite UHT

durante a estação chuvosa, conforme foi apresentado no item 4.2.1.

O efeito de estado resultou em maior média ( $P < 0,05$ ) no estado de Goiás ( $4,1 \times 10^7$  UFC/mL,  $n=6$ ). As médias em São Paulo ( $3,7 \times 10^6$  UFC/mL,  $n=6$ ) e Rio Grande do Sul ( $3,6 \times 10^6$  UFC/mL,  $n=6$ ) não diferiram entre si. Este fato pode estar ligado às consideráveis distâncias e número de horas de refrigeração em Goiás.

A contagem de microrganismos psicrotróficos no leite cru correlacionou-se positivamente ( $P < 0,05$ ) com o aumento na viscosidade do leite UHT (diferença entre as viscosidades com 120 e 10 dias de estocagem). Os coeficientes foram 0,8072 (Rio Grande do Sul,  $n=6$ ), 0,8367 (São Paulo,  $n=6$ ) e 0,8229 (estação chuvosa,  $n=9$ ).

Com base nestes resultados é admissível presumir que houve produção de enzimas proteolíticas termorresistentes pelas bactérias psicrotróficas, ocasionando proteólise durante a estocagem do leite UHT. A elevação da viscosidade observada é característica própria do processo de gelificação do leite UHT.

A importância da qualidade microbiológica do leite cru, com ênfase nas bactérias psicrotróficas, tem recebido atenção especial de diversos autores, como Sorhaug & Stepaniak (1997), os quais afirmaram que a produção de proteinases termorresistentes por bactérias psicrotróficas antes do processamento representa o maior fator de deterioração do leite estocado.

Com respeito à produção de proteases termorresistentes, Neira (1986) concluiu que a atividade proteolítica no leite após processamento UHT pode ser atribuída em 93,17% pela atividade proteolítica anterior ao tratamento térmico.

Na perspectiva formada pela literatura e pelos dados deste trabalho, fica evidente que é fundamental evitar a formação de proteases termorresistentes no leite cru destinado ao processamento UHT. Para isto, é necessário garantir boas condições higiênicas e o menor tempo possível de manutenção do leite cru sob

refrigeração entre a ordenha e o processamento.

#### 4.19 Contagem de células somáticas

Machado et al. (1999) conceituam células somáticas como sendo células de defesa do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater agentes agressores, mas também podem ser células secretoras descamadas.

Proseguem os autores afirmando que a mastite causa alteração na composição do leite por alterar a permeabilidade dos vasos sanguíneos e a habilidade de síntese do tecido secretor. A contagem de células somáticas é um indicativo do grau de infecção da glândula mamária.

Ao se observar a Figura 52, pode-se verificar as contagens de células somáticas no leite cru, por estado e por estação.

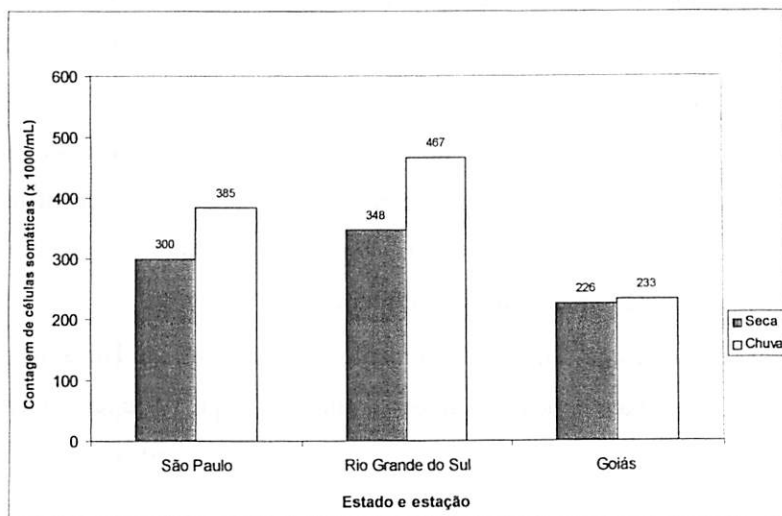


FIGURA 52 Contagens de células somáticas no leite cru por estado e por estação

Os estudos de Machado et al. (1999) com 7.491 amostras de leite de tanques de expansão revelaram o valor médio de 641 mil células somáticas/mL.

A legislação brasileira sobre leite cru refrigerado (Brasil, 2002) estabelece o valor máximo de um milhão de células somáticas/mL, o qual será obrigatório apenas a partir de 01/07/2005, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

Ao se interpretar os dados da Figura 52, em contraste com a literatura e a legislação, evidencia-se que as contagens de células somáticas em todos os estados e estações mantiveram-se com valores aceitáveis. Por outro lado, estes dados, embora satisfatórios, não indicam que o melhor possível no aspecto sanitário já tenha sido alcançado, mas que os programas de qualidade das indústrias analisadas neste trabalho devem prosseguir no apoio e na orientação aos produtores de leite sobre a importância da sanidade animal sobre a qualidade do leite e derivados.

Seguindo o fluxo do processamento descrito neste trabalho, o leite cru é desnatado em uma centrífuga. Na Figura 53 estão as contagens de células somáticas no leite desnatado, por estado e por estação.

O efeito da notável redução no número de células somáticas observado no leite desnatado em comparação com o leite cru pode ser atribuído, provavelmente, à remoção de células somáticas durante o processo de centrifugação executado para o desnate do leite.

Por ação da força centrífuga, elementos mais densos são lançados para a periferia da centrífuga e removidos automaticamente, o que pode ter contribuído para o arraste e retirada das células somáticas, embora estas sejam menos densas, com favorável influência sobre a aptidão do leite para processamento UHT.

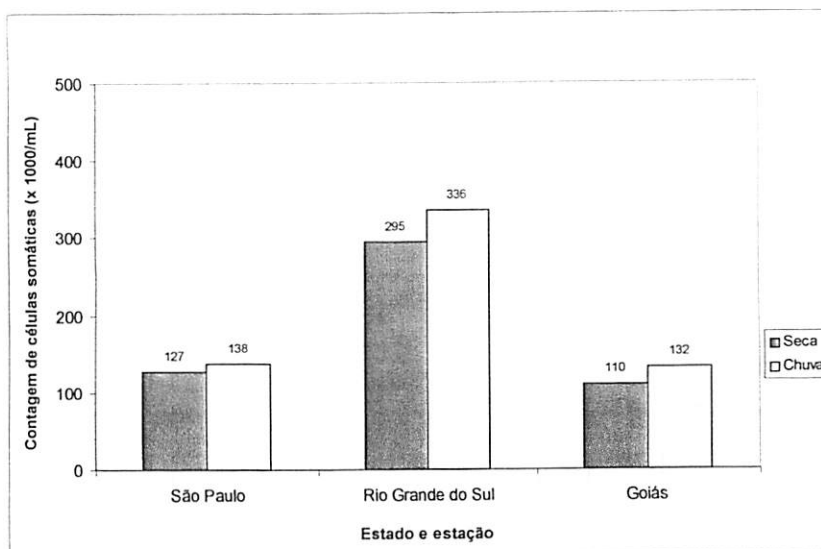


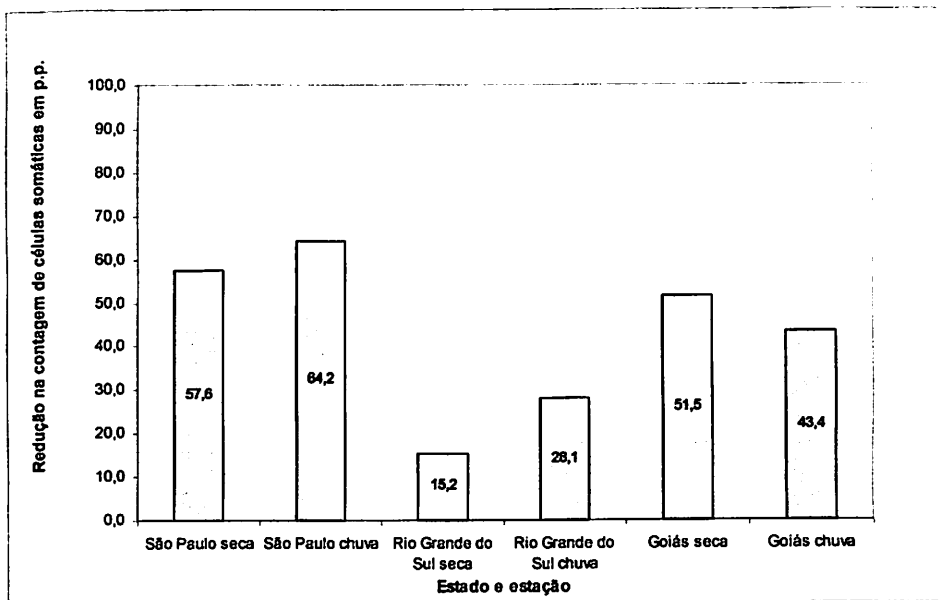
FIGURA 53 Contagens de células somáticas no leite desnatado por estado e por estação

No entanto, a remoção das células somáticas não foi uniforme, como demonstrado na Figura 54.

A redução, em pontos percentuais, foi consideravelmente menor no Rio Grande do Sul, quando comparada com São Paulo e Goiás. Isto sugere que a efetividade da remoção centrífuga tenha sido diminuída por motivos ligados ao equipamento (manutenção, operação ou ajustes).

É necessário também considerar que as contagens iniciais de células somáticas foram maiores no Rio Grande do Sul e, neste caso, poderia indicar que o resultado da remoção centrífuga se estabelece sob influência da qualidade do leite cru admitido no processamento.

Em todos os estados e estações, invariavelmente, as contagens de células somáticas no leite UHT foram inferiores ao limite de detecção do método automático de análise empregado (um mil células somáticas/mL).



**FIGURA 54** Redução nas contagens de células somáticas do leite cru para o leite desnatado por estado e por estação

Como não há possibilidade de remoção física das células somáticas, posterior à centrifugação, o reduzido número encontrado nas amostras de leite UHT sugere que houve alterações nas células somáticas que as tornaram imperceptíveis ao equipamento de análise. É possível inferir que a etapa de homogeneização, a qual emprega pressão para reduzir o tamanho de glóbulos de gordura e agregados protéicos, tenha, provavelmente, rompido as células somáticas, ocasionando as baixas contagens observadas.

A plasmina, protease natural do leite capaz de promover proteólise e gelificação no leite UHT, provém de um composto precursor denominado plasminogênio. Kelly & Foley (1997) aventaram a presença de ativadores de plasminogênio termoestáveis associados às células somáticas em leites

provenientes de vacas com mastite. Os mesmos autores, ao estudarem leites de alta e baixa contagem de células somáticas, detectaram atividade residual de plasmina após processamento UHT indireto a 138°C por 2,4 segundos e subsequente estocagem a 20°C.

O rompimento das células somáticas, que provavelmente ocorreu nos leites analisados neste trabalho, pode ocasionar um aumento da atividade proteolítica no leite UHT, tanto pela liberação de proteases próprias das células somáticas quanto pelo favorecimento da conversão de plasminogênio para plasmina. Por conseqüência, aumenta a probabilidade de ocorrerem gelificação e sedimentação durante a estocagem do leite UHT.

Em suma, por ser usual a homogeneização do leite para processamento UHT, mesmo se tratando de leite desnatado, é imperioso que a contagem de células somáticas seja baixa, para que, com a provável ruptura das mesmas, haja um menor impacto negativo na preservação da qualidade do leite UHT.

Machado et al. (1999) concluíram que é necessário estudar as contagens de células somáticas do leite no Brasil levando-se em consideração as regiões geográficas e diferentes práticas de manejo.

Foi encontrada correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre a contagem de células somáticas no leite cru e a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem, com coeficiente 0,7643,  $n=7$ .

No caso do leite desnatado, as contagens de células somáticas mostraram coeficiente positivo (0,7318,  $n=7$ ) com o aumento na viscosidade do leite UHT (diferença entre as viscosidades com 120 e 10 dias de estocagem). O efeito sobre a perda de estabilidade foi evidenciado pela correlação negativa observada com a resistência ao etanol do leite UHT com 120 dias de estocagem (coeficiente - 0,8605,  $n=7$ ).

Foram encontradas diferenças significativas entre as contagens de células somáticas no leite cru entre os estados ( $P < 0,031$ ), com reflexo no leite

desnatado ( $P < 0,033$ ). A comparação das médias entre estados, empregando-se o teste de Tukey é descrita na Tabela 32.

As contagens de células somáticas, tanto no leite cru quanto no leite desnatado provenientes do Rio Grande do Sul foram significativamente maiores do que em Goiás. São Paulo apresentou contagens intermediárias às dos demais Estados.

Fundamentando-se nos resultados obtidos, ficou comprovada a influência da alta contagem de células somáticas sobre a ocorrência de gelificação e sobre a formação de sedimentos durante o período de armazenamento do leite UHT.

Contagens de células somáticas mais altas podem promover aumento na atividade proteolítica com desestabilização das caseínas, tornando-as mais susceptíveis à aglomeração, com conseqüentes espessamento e sedimentação do leite UHT.

**TABELA 32** Contagens médias de células somáticas (células/mL) dos leites cru e desnatado coletados nas fábricas localizadas nos três estados brasileiros em estudo

Estado	Contagem de células somáticas (células/mL)	
	Leite cru	Leite desnatado
Rio Grande do Sul	407,17 a	315,17 a
São Paulo	342,33 a b	132,33 a b
Goiás	245,17 b	120,67 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

## **4.20 Estudo de caso – Recirculação do leite durante o processamento UHT**

### **4.20.1 Caracterização do problema**

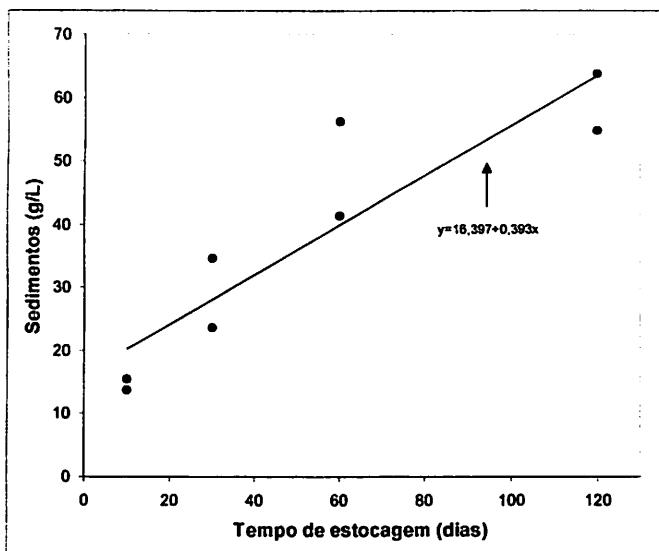
Em duas produções de leite UHT no estado de Goiás, durante a estação seca, houve recirculação excessiva do leite durante o processamento UHT. O equipamento de aquecimento estava abastecendo com leite UHT duas máquinas de envase, simultaneamente, quando ocorreu parada de uma das máquinas. Na seqüência, o volume de leite UHT superou a capacidade da máquina de envase restante, ocasionando retorno do leite UHT ao início do aquecimento, com recirculação continuada, até que a segunda máquina de envase voltasse a operar.

Os leites UHT provenientes destas duas produções apresentaram formação de sedimentos elevada, sem que isto fosse possível de ser atribuído à qualidade do leite cru empregado. Ao mesmo tempo, os leites exibiram coloração amarronzada, caracterizando alta formação de compostos de escurecimento não-enzimático. Pode-se, então, aventar a hipótese de que a causa da sedimentação foi o excessivo tratamento térmico ao qual os leites foram submetidos, por terem, repetidas vezes, passado pelas etapas de pré-aquecimento e aquecimento, nas recirculações que se sucederam no processamento UHT.

As amostras de leite UHT foram coletadas, analisadas e os resultados são apresentados e discutidos nos itens seguintes.

### **4.20.2 Sedimentos**

A formação dos sedimentos foi acompanhada ao longo da estocagem dos leites UHT com recirculação e na Figura 55 pode-se observar que a taxa de sedimentação aumentou de forma extremamente rápida. Ao final da estocagem, a quantidade de sedimentos foi, aproximadamente, 33 vezes maior que a média encontrada nos demais leites UHT analisados neste trabalho.



**FIGURA 55** Evolução da massa de sedimentos durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

Comparando-se com o processamento UHT sem recirculação, na estação seca de Goiás, a quantidade de sedimentos foi, aproximadamente, 70 vezes maior.

A partir da obtenção dos sedimentos nas amostras de leite UHT com recirculação foi possível proceder-se à análise de minerais nos sedimentos. Os resultados são apresentados nas Figuras 56 e 57.

Observa-se que houve elevação gradual dos teores de cálcio, fósforo e nitrogênio nos sedimentos ao longo do tempo. Tal fato demonstra que esses elementos migraram da fase fluida do leite UHT e passaram a ser constituintes dos sedimentos.

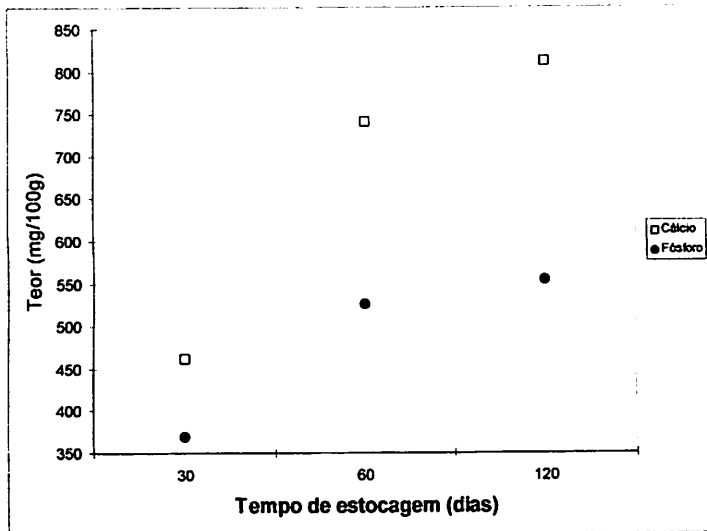


FIGURA 56 Evolução dos teores de cálcio e fósforo nos sedimentos durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

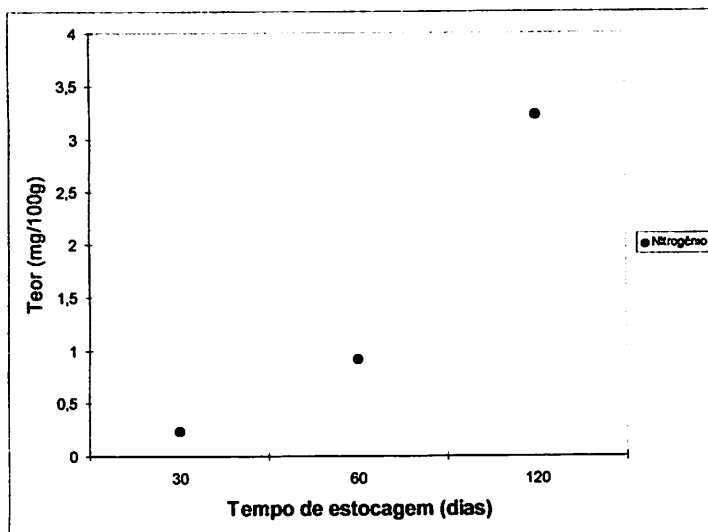


FIGURA 57 Evolução do teor de nitrogênio nos sedimentos durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

### 4.20.3 Viscosidade

Os dados obtidos para a viscosidade são expostos na Figura 58, pela qual nota-se que a viscosidade do leite UHT com recirculação decresceu ao longo da estocagem. Este fato está em oposição ao relatado para os demais leites UHT deste trabalho, mostrando que não foi possível observar ocorrência de gelificação nas amostras

Nos leites UHT com recirculação, a formação de sedimentos foi capaz de deslocar quantidades elevadas de proteínas e minerais, impossibilitando o espessamento e, em paralelo, repercutindo em uma fase fluida residual com baixa viscosidade.

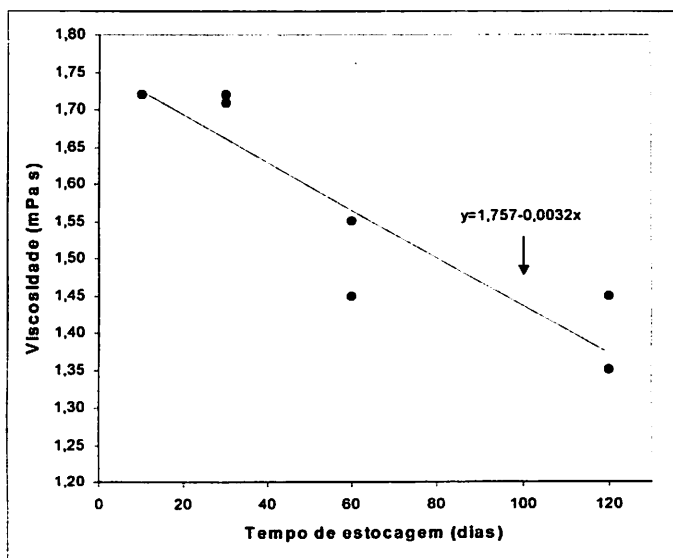


FIGURA 58 Evolução da viscosidade durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

#### 4.20.4 Teor de extrato seco desengordurado

A alta taxa de sedimentação resultou em queda no teor de extrato seco desengordurado no leite UHT com recirculação. De acordo com a Figura 59, a partir do 17º dia, o leite UHT avaliado não mais atendia ao padrão legal (Brasil, 1997) para extrato seco desengordurado, equivalente ao mínimo de 8,4% (m/v).

#### 4.20.5 Teores de proteínas e nitrogênio

Os teores de nitrogênio e de proteínas diminuíram durante a estocagem do leite UHT com recirculação (Figuras 60 e 61), à medida que o teor de nitrogênio aumentou nos sedimentos, em consonância com a Figura 57, comprovando que o nitrogênio dos sedimentos provém das proteínas do leite UHT.

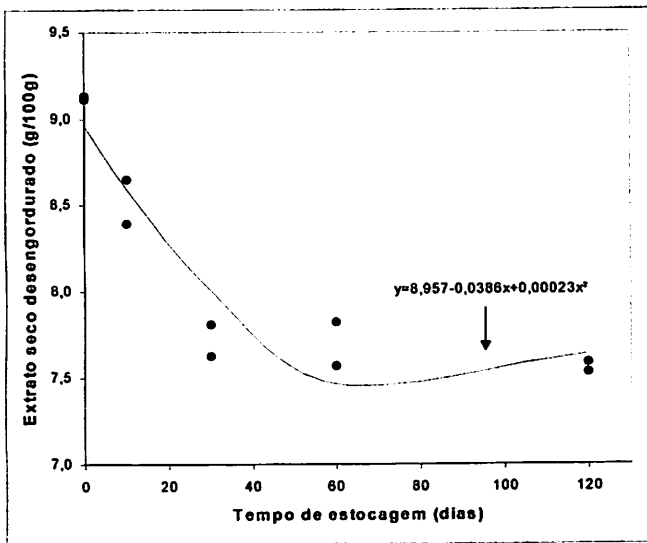


FIGURA 59 Evolução do teor de extrato seco desengordurado durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

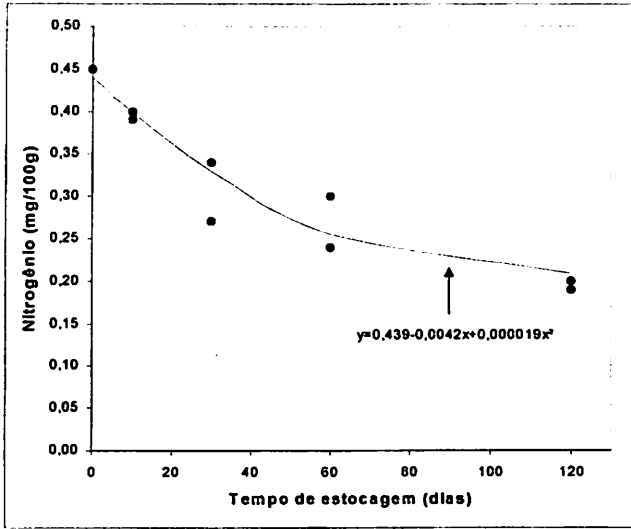


FIGURA 60 Evolução do teor de nitrogênio durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

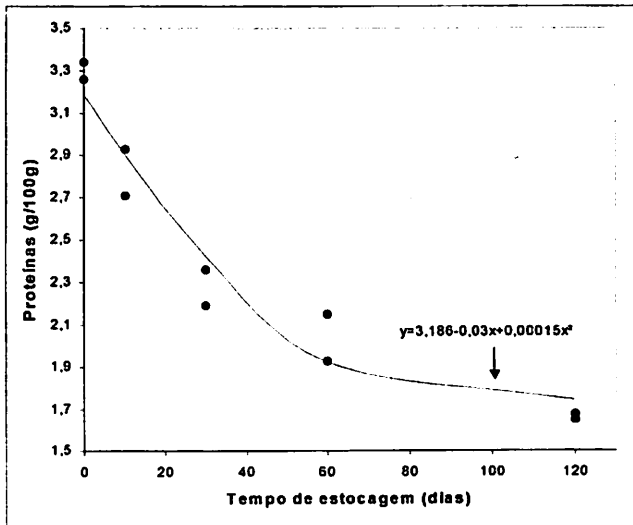


FIGURA 61 Evolução do teor de proteínas durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

#### **4.20.6 Teores de cálcio e fósforo**

Houve acentuados decréscimos nos teores de cálcio e de fósforo no decorrer da estocagem do leite UHT com recirculação, conforme mostrado nas Figuras 62 e 63.

Depreende-se que o aumento nos teores de cálcio e fósforo nos sedimentos (Figura 56) se deu à custa da transferência a partir dos constituintes minerais do leite UHT.

#### **4.20.7 Teores de HMF livre e total**

O teor de 5-hidroximetil-furfural (HMF) livre no leite UHT com recirculação foi 6,50  $\mu\text{mol/L}$ , sendo 2,4 vezes maior que a média dos demais leites analisados neste trabalho e 2,2 vezes maior que a média das produções de Goiás na estação seca sem recirculação.

De forma similar, o teor de HMF total atingiu 20,60  $\mu\text{mol/L}$ , superando em 1,6 vez tanto a média geral do trabalho quanto os leites sem recirculação no mesmo estado.

Diante destes dados, fica evidente que o efeito da recirculação promoveu profundas alterações nos constituintes e nas propriedades do leite, como a aceleração da reação de escurecimento não-enzimático, resultante do tempo em que o leite UHT permaneceu exposto a altas temperaturas.

#### **4.20.8 Percentual de desnaturação de soroproteínas**

No leite UHT com recirculação, o percentual de desnaturação de soroproteínas chegou a 95,2, superando em 1,2 vez a média geral dos leites analisados neste trabalho e também as produções de Goiás na estação seca sem recirculação. Como as soroproteínas desnaturam por efeito do aquecimento durante o processamento UHT, é inequívoco que a recirculação provoca alterações conformacionais e funcionais indesejáveis ao leite UHT.

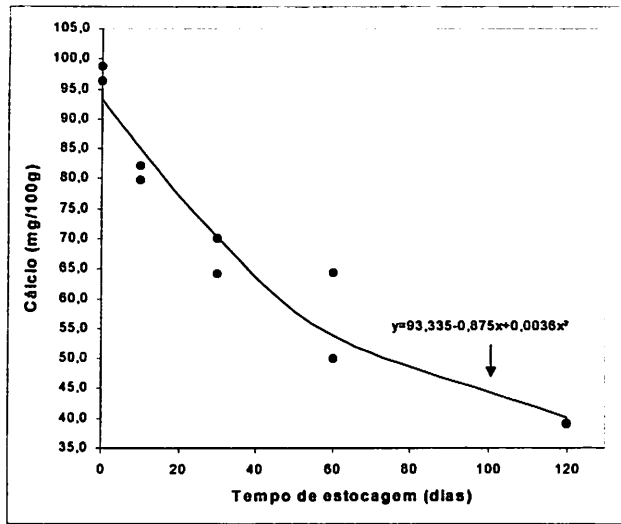


FIGURA 62 Evolução do teor de cálcio durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na estação seca

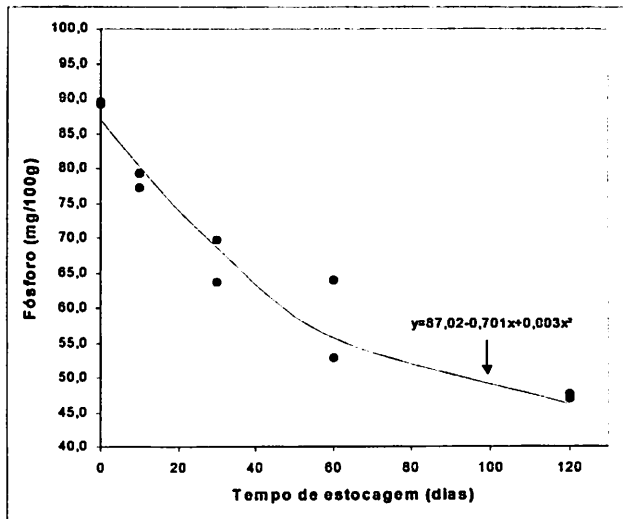


FIGURA 63 Evolução do teor de fósforo durante a estocagem do leite UHT com recirculação, em Goiás, na seca

#### **4.20.9 Considerações finais**

Com base no exposto neste estudo de caso, tem-se que a recirculação do leite durante o processamento UHT pode provocar intensa desestabilização no complexo protéico/salino do leite, maior desnaturação protéica e aceleração do escurecimento não-enzimático. Como consequência, pode ocorrer maior associação entre as proteínas e destas com os sais, resultando em maior sedimentação e podendo tornar o produto impróprio para o consumo.

Estes fatos convergem para a importância do controle de processo a fim de evitar-se a recirculação do leite UHT. Uma alternativa para impedir que haja recirculação por motivo de parada de máquina de envase é a adoção de um tanque asséptico entre o processamento UHT e o envase. Este tanque tem a capacidade de manter o leite UHT sob condições assépticas até que o sistema de envase o possa receber, sem precisar retornar o leite ao início do processamento.

É necessário perceber que, embora o leite cru em estudo tivesse qualidade aceitável, um desvio nas condições operacionais resultou em perda inaceitável de qualidade no produto final, ocasionando rejeição dos lotes, com prejuízo econômico. Deve-se enfatizar que a qualidade da matéria-prima precisa ser sucedida e complementada por um processamento tecnológico adequado, a fim de se alcançar e manter a qualidade ao longo da vida de prateleira do leite UHT.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nas condições empregadas neste trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- houve gradual elevação na taxa de sedimentação nas amostras de leite UHT ao longo da validade, com influência dos estados e das estações seca e chuvosa;
- a desnaturação de soroproteínas e a contagem de células somáticas no leite cru foram fatores determinantes para a maior formação de sedimentos no leite UHT;
- os teores de citrato no leite cru e no leite UHT e o teor de uréia no leite cru contribuíram para a menor formação de sedimentos no leite UHT;
- a formação de sedimentos foi maior com o aumento nos teores de HMF livre e total, evidenciando o efeito da temperatura sobre a sedimentação;
- os teores de extrato seco desengordurado, proteínas, nitrogênio, cálcio e fósforo no leite UHT diminuíram à medida que ocorreu sedimentação ao longo da estocagem;
- os teores de nitrogênio, cálcio e fósforo no sedimentos aumentaram com o tempo, demonstrando a migração destes elementos a partir da fase fluida do leite;
- a recirculação do leite durante o processamento UHT provocou alta desnaturação protéica e aceleração do escurecimento não-enzimático, resultando em taxas de sedimentação muito elevadas;
- houve tendência à gelificação nas amostras de leite UHT durante a estocagem, comprovada pela elevação na viscosidade;
- a contagem de microrganismos psicrotóxicos e a contagem de células somáticas, ambas no leite cru, foram fatores determinantes para o aumento da gelificação no leite UHT;

- os teores de cálcio, fósforo e citrato variaram entre os estados;
- a estabilidade do leite cru ao etanol reduziu com o aumento no teor de cálcio e na relação cálcio/fósforo e elevou com o aumento nos teores de fósforo e de uréia do leite cru;
- ocorreu aumento inicial da estabilidade do leite UHT ao etanol, seguido de um decréscimo progressivo, resultando em menor resistência alcoólica no final da estocagem;
- houve decréscimo no valor de pH do leite UHT com o passar da estocagem, enquanto a acidez não se mostrou útil como fator de acompanhamento;
- o ponto de congelamento não mostrou comportamento uniforme no leite UHT;
- o desnate e a homogeneização do leite promoveram consideráveis reduções na contagem de células somáticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1995. 335 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/index.cfm?fuseaction=longavida>>. Acesso em: 15 maio 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. 3ª revisão. Maryland, 1997. Method 991. 20.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. 3ª revisão. Maryland, 1997. Method 925. 22.

AULDIST, M. J.; COATS, S. J.; SUTHERLAND, B. J.; HARDHAM, J. F.; MCDOWELL, G. H; ROGERS, G. L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality ad storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 63, n. 3, p. 377-386, Aug. 1996.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Método de análise química de plantas**. Campinas, SP: IAC, 1983. (IAC. Boletim Técnico, n. 78).

BIGALKE, D. Biochemical changes in dairy products caused by growth of psicrotrophic microorganisms. **Dairy and Food Sanitation**, Ames, v. 5, n. 9, p. 345-346, Sept. 1985.

BIODIAGNÓSTICA. **Uréia Enz Color**. Pinhais, PR: Laborclin Produtos para Laboratórios, 2001. 2 p. (Informações Técnicas)

BLANC, B.; ODET, G. Apperance, flavour and texture aspects: recent developments. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 25-48. (Document, 133).

BOCKELMANN, B. VON; BOCKELMANN, I. VON **Long life products: heat treated, aseptically packed – a guide to quality**. Akarp, Sweden: Fälth & Hassler, 1998. 246 p.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru

refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002a. Seção I.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002b. Seção I.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 370, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, , n. 172, 8 set. 1997. Seção I.

BRITO, M. A. V. P. Influência das células somáticas na qualidade do leite. In: MINAS LEITE, 1., 1999, Juiz de Fora. **Anais... Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite**, 1999. p. 41-46.

CAUVIN, E.; SACCHI, P.; RASERO, R.; TURI, R. M. Proteolytic activity during storage of UHT milk. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 38, n. 383, p. 825-829, jul./ago. 1999.

CORRADINI, C; PECIS, P. P. Proteolytic activity in UHT-sterilized milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 227-229, Apr. 1979.

DAVIES, D. T.; WHITE, J. C. D. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 257-266, June 1958.

DE PETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 8, p. 2043-70, Aug. 1992.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura. **Software NTIA: versão 4. 2. 1: instalação e programa**. Campinas, 1996. 3 v.

ENRIGHT, E.; BLAND, A. P.; NEEDS, E. C.; KELLY, A. L. Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO<sub>3</sub> addition. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 581-591, Sept. 1999.

FERREIRA, J. R.; SILVA, P. H. F. da; PEREIRA, M. G.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; HANSEN, R. Determinação do valor de 5-hidroximetilfurfural em leite esterilizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 49, n. 290, p. 43-54, mar./abr. 1994.

FINK, R.; KESSLER, H. G. HMF values in heat treated and stored milk. *Milchwissenschaft*, Munich, v. 41, n. 10, p. 638-641, Oct. 1986.

FOX, P. F. **Food chemistry**. Part III. Cork: Cork University College, 1991. 201 p.

FOX, P. F.; HOYNES, M. C. T. Heat stability of milk: influence of colloidal calcium phosphate and  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 42, n. 1, p. 427-35, Feb. 1975.

GARCIA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDINO, R. Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Sussex, v. 79, n. 9, p. 1171-1178, July 1999.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterilizado "longa-vida"**. 1995. 108 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

GRAPPIN, R.; RIBADEAU-DUMAS, B. Analytical methods for milk proteins. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, p. 1-62.

HARLAND, H. A.; ASHWORTH, U. S. A rapid method for estimation of whey protein as an indicator of baking quality of non fat dry-milk solids. *Food Research*, New York, v. 12, n. 3, p. 247-251, Dec. 1947.

HARWALKAR, V. R. Age gelation of sterilized milks. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1997. v. 1, p. 691-734.

HORNE, D. S. Ethanol stability. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, p. 657-689.

HOSTETTLER, H. Appearance, flavour and texture aspects: development until 1972. In: International Dairy Federation. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 11-24. (Document, 133).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Control methods for sterilized milk.** Brussels, 1969. 3 p. (International Standard, 48:1969).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination du point de congelation.** Brussels, 1986. 4 p. (Norme Internationale, 108A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of milkfat, protein and lactose content.** Guide for the operation of mid-infra-red instruments. Brussels, 1996. 12 p. (International Standard, 141B).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Enumeration of microorganisms – colony count at 30 °C.** Brussels, 1987. 5 p. (International Standard, 100A:1987).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Enumeration of somatic cells.** Brussels, 1995. 8 p. (International Standard, 148A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Estimation of numbers of psychrotrophic microorganisms.** Brussels, 1991. 3 p. (International Standard, 132A:1991).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products – Methods of sampling.** Brussels, 1985. 19 p. (International Standard, 50B:1985).

KEENEY, M.; BASSETTE, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reactions in milk products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 6, p. 945-961, June 1959.

KELLY, A. L.; FOLEY, J. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmina activity, plasmina/beta-globulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 7, n. 6/7, p. 411-420, June/July 1997.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation fo ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 145-148, 1977.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A. Selected indicators of the quality of thermal processed milk. **Food Science and Technology International**, Frederick, v. 5, n. 2, p. 121-137, Apr. 1999.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; CORZO, N.; RAMOS M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 60, n. 3, p. 339-347, Aug. 1993.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIÉS, G. A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 10-16, ago. 1999.

MORAES, J. F. V.; RABELO, N. A. **Um método simples para a digestão de amostras de plantas**. Brasília: EMBRAPA-DDT/EMBRAPA-CNPAF, 1986. 12 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 12).

MORALES, F. J.; ROMERO, C.; JIMENEZ-PEREZ, S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 193-200, Apr. 2000.

MORRISSEY, P. A. The heat stability of milk as affected by variations in pH and milk salts. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 36, n. 3, p. 343-351, Oct. 1969.

NEIRA, M. R. P. **Efecto de la actividad de proteasas sobre la estabilidad de leches uht durante su almacenamiento**. 1986. 163 p. Tese (Mestrado) - Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

PARRY, R. M. Milk coagulation and protein denaturation. In: WEBB, B. H.; JOHNSON, A. H.; ALFORD, J. A. **Fundamentals of dairy chemistry**. 2. ed. Westport, Connecticut : AVI, 1974. p. 603-661.

PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; SILVA, P. H. F. **da Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 2000. 190 p.

PICARD, C.; PLARD, I.; COLLIN, J. C. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat-resistant *Pseudomonas* proteinases specific towards kappa-casein in heated milk. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 51, n. 8, p. 438-442, Aug. 1996.

PINTO, A. P. E. F.; WOLFSCHOON-POMBO, A. 5-hidroximetilfurfural no doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n. 236, p. 9-11, nov./dez. 1984.

PONCE, P.; CAPDEVILA, V. C.; LARANJA, L. F. Characterization of the Abnormal Milk Syndrome: an approach of its probable causes and its corrections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 195, 1999. (Supplement, 1).

REHMAN, Z.; SAEED, A.; ZAFAR, S. Hydroxymethylfurfural as an indicator for the detection of dried powder in liquid milk. **Milchwissenschaft** Munich, v. 55, n. 5, p. 259-257, May 2000.

RENNER, E.; SCHMIDT, R. H. Chemical and physico-chemical aspects. In: International Dairy Federation. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 49-64. (Document, 133).

RIOS, H. Tetra Pak. São Paulo, 2003. **Mercado lácteo**. ppt, 1 disquete, 3 1/2 pol. Power point 2000.

ROSE, D. Factors affecting the heat stability of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, n. 11, p. 1305-1311, Nov. 1962.

ROSE, D. Variations in the heat stability and composition of milk from individuals cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 3, p. 430-441, Mar. 1961.

SALINAS, J. G.; GARCIA, R. **Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras**. Cali. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical/Programa de Pastos Tropicales, 1985. 83 p.

SAMUEL, R.; WEAVER, W. V.; GAMMACK, D. B. Changes on storage in milk processed by ultra-high-temperature sterilization. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 38, n. 3, p. 323-332, Oct. 1971.

SHALABI, S.; FOX, P. F. Heat stability of milk: synergistic action of urea and cabonyl compounds. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, n. 2, p. 197-207, May 1982.

SHEW, D. I. Technical aspects of quality assurance. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 115-121. (Document, 133).

SILVA, E. O. T. R e **Leite longa vida: avaliação de alguns parâmetros de qualidade dos leites cru e processado**. 2001. 132 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, P. H. F. da; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 157-163, jul./ago. 1998.

SILVA, P. H. F. da; TORRES, K. F. Acidez, pH e efeito tampão no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 296, p. 33-41, nov./dez. 1995.

SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat stability of milk. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, p. 621-655.

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

SWEETSUR A. W. M.; WHITE, J. C. D. Studies on the heat stability of milk protein. I. Interconversion of type A and type B milk heat-stability curves. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 41, n. 3, p. 349-358, Oct. 1974.

TETRA PAK. **Dairy processing handbook**. Lund, Sweden, 1996. 1 CD.

TEUBER, M.; BUSSE, M. Microbiological aspects. In: International Dairy Federation. **New monograph on UHT milk**. Brussels, 1981. p. 5-10. (Document, 133).

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984. 423 p.

WHITE, J. C. D.; DAVIES, D. T. The determination of calcium and magnesium in milk and milk diffusate. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.29, n. 3, p. 285-296, Oct. 1962.

WHITE, J. C. D.; DAVIES, D. T. The determination of citric acid in milk and milk sera. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 30, n. 2, p. 171-189, 1963.

WHITE, J. C. D.; DAVIES, D. T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 236-255, Oct. 1958.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FERNANDES, R. M.; GRANZINOLLI, G. G. M. Efeitos da pasteurização-HTST e da fervura doméstica sobre a proteína do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, n. 223, p. 3-7, 1982.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; LIMA, A. de. Teor em uréia do leite fornecido no DPTA/ILCT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 38, n. 226, p. 19-22, mar./abr. 1983.

ZALAZAR, C.; PALMA, S.; CANDIOTI, M. Increase of free sialic acid and gelation in UHT milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 51, n. 1, p. 22-23, Apr. 1996.

ZEHETNER, G.; BEREUTHER, C.; HENLE, T.; KLOSTERMEYER, H. Inactivation of endogenous enzymes during heat treatment of milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v. 50, n. 2, p. 215-226, 1996.

## ANEXOS

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Condições climáticas no Rio Grande do Sul. ....	143
TABELA 2B	Condições climáticas em São Paulo. ....	143
TABELA 3B	Condições climáticas em Goiás. ....	143

TABELA 1A Condições climáticas no Rio Grande do Sul

Condição climática	Estação chuvosa (julho de 2001)	Estação seca (janeiro de 2002)
Precipitação total (mm)	200 a 250	100 a 150
Temperatura máxima (°C)	18 a 20	20 a 30
Temperatura mínima (°C)	6 a 8	18 a 20

Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (<http://www.cptec.inpe.br/clima>)

TABELA 2A Condições climáticas em São Paulo

Condição climática	Estação seca (julho de 2001)	Estação chuvosa (janeiro de 2002)
Precipitação total (mm)	25 a 50	250 a 300
Temperatura máxima (°C)	24 a 26	28 a 30
Temperatura mínima (°C)	10 a 12	16 a 18

Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (<http://www.cptec.inpe.br/clima>)

TABELA 3A Condições climáticas em Goiás

Condição climática	Estação seca (agosto de 2001)	Estação chuvosa (dezembro de 2001)
Precipitação total (mm)	1 a 25	150 a 200
Temperatura máxima (°C)	26 a 28	28 a 30
Temperatura mínima (°C)	12 a 14	18 a 20

Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (<http://www.cptec.inpe.br/clima>)

**ANEXO B****Página**

<b>TABELA 1B</b>	<b>Características de manejo em São Paulo. ....</b>	<b>145</b>
<b>TABELA 2B</b>	<b>Características de manejo no Rio Grande do Sul. ....</b>	<b>146</b>
<b>TABELA 3B</b>	<b>Características de manejo em Goiás. ....</b>	<b>147</b>

TABELA 1B Características de manejo em São Paulo

Característica de manejo	São Paulo	
	Seca	Chuva
<b>1. Alimentar</b>		
• Concentrado	Sim	50%
• Forrageira Predominante	Crost cross, capim elefante, braquiárias	Crost cross, capim elefante, braquiárias
• Uso de silagem	Sim	Não
• Tipo de silagem	Milho	
• Água	À vontade	À vontade
<b>2. Reprodutivo</b>		
• Inseminação	40% utilizam	
• Intervalo de partos	13 meses, em média	
<b>3. Ordenha</b>		
• Predomina manual ou mecânica	60% ordenha mecânica	
• Número de ordenhas	2	
• Tipo de resfriamento	Expansão direta	
• Temperatura média de entrega	6°C	
• Intervalo entre coletas	60% com 24 horas e 40% com 48 horas	
<b>4. Rebanho</b>		
• Raças predominantes	Holandês ou mestiços de holandês	
• Regime de criação	Semi-confinamento	

TABELA 2B Características de manejo no Rio Grande do Sul

Característica de manejo	Rio Grande do Sul	
	Seca	Chuva
<b>1. Alimentar</b>		
• Concentrado	Sim	30%
• Forrageira Predominante	Crost cross, capim elefante	Alfafa, azevém e trevo
• Uso de silagem	Sim	Não
• Tipo de silagem	Milho e sorgo	
• Água	À vontade	À vontade
<b>2. Reprodutivo</b>		
• Inseminação	60% utilizam	
• Intervalo de partos	12,5 meses, em média	
<b>3. Ordenha</b>		
• Predomina manual ou mecânica	65% ordenha mecânica	
• Número de ordenhas	2	
• Tipo de resfriamento	Expansão direta	
• Temperatura média de entrega	5°C	
• Intervalo entre coletas	40% com 24 horas e 60% com 48 horas	
<b>4. Rebanho</b>		
• Raças predominantes	Holandês ou mestiços de holandês	
• Regime de criação	98% extensivo a pasto	

TABELA 3B Características de manejo em Goiás

Característica de manejo	Goiás	
	Seca	Chuva
<b>1. Alimentar</b>		
• Concentrado	Sim	20%
• Forrageira Predominante	Capim elefante, braquiárias	Capim elefante, braquiárias
• Uso de silagem	Sim	Não
• Tipo de silagem	Milho	
• Água	A vontade	A vontade
<b>2. Reprodutivo</b>		
• Inseminação	30% utilizam	
• Intervalo de partos	14 meses, em média	
<b>3. Ordenha</b>		
• Predomina manual ou mecânica	30% ordenha mecânica	
• Número de ordenhas	2	
• Tipo de resfriamento	60% utilizam resfriadores por imersão, 10% não resfriam e 30% expansão direta	
• Temperatura média de entrega	13°C	
• Intervalo entre coletas	70% com 24 horas e 30% com 48 horas	
<b>4. Rebanho</b>		
• Raças predominantes	Mestiços e girolandos	
• Regime de criação	A pasto	