

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS GRADUAÇÃO

**QUALIDADE DO LEITE UAT SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

AMANDA RIBEIRO DOS SANTOS

BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG

2019

Amanda Ribeiro dos Santos

**QUALIDADE DO LEITE UAT SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à
Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas
Gerais – UFMG, como requisito
para obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal.

Área de concentração:
Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal.

Orientador: Leorges Moraes da
Fonseca.

Co-orientador(a): Cláudia Freire
de Andrade Morais Penna.

BELO HORIZONTE - MG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG

2019

S237d Santos, Amanda Ribeiro dos, 1994-
Qualidade do leite UAT sob diferentes condições de armazenamento
[manuscrito] / Amanda Ribeiro dos Santos. – 2019.

41 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca.

Coorientador: Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. Leite - Teses. 2. Leite - Qualidade - Teses. 3. Leite - Proteínas. 4. Atos ilícitos.
5. Proteólise. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Penna, Cláudia Freire de
Andrade Moraes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. IV. Título.

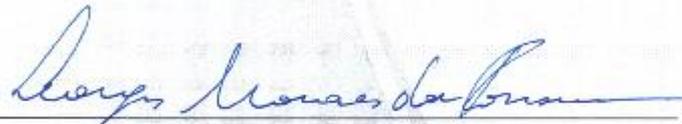
CDD: 637

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA RIBEIRO DOS SANTOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL .

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



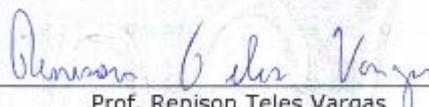
Prof. Leorges Moraes da Fonseca
Presidente - Orientador



Dr^a. Cristiane Viana Guimarães Ladeira
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG



Prof^a. Débora Cristina Sampaio de Assis
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Renison Teles Vargas
Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado dando forças e me fazendo acreditar em suas promessas para minha vida. Deus é bom o tempo todo.

Agradeço aos meus pais Senara e Wellington, todas as idas e vindas incessantes à UFMG não foram em vão. Essa vitória é de vocês.

Aos meus irmãos Samara e Samuel, meus cunhados Hans e Letícia e a nossa princesinha Marina. Vocês são muito importantes para mim, A família sempre foi meu maior tesouro.

Ao meu orientador Leorges por todo o tempo dedicado a esse projeto, sempre prestativo e disposto a aguentar toda minha ansiedade. Obrigado por sempre me acalmar nos momentos mais difíceis, e resolver meus problemas na hora certa. Tudo deu certo no tempo certo.

À minha co-orientadora Cláudia por caminhar comigo desde a graduação, sempre me recebendo de braços abertos todas as vezes que precisei.

Agradeço as minhas amigas de mestrado Marcela e Cecília por sempre estarem comigo. Isso teria sido impossível sem vocês.

À Beatriz, aluna de iniciação científica, por ter sido meu braço direito durante todas as análises, com toda eficiência e dedicação. Bia, todo agradecimento a você será pouco pelo tanto que me ajudou.

Ao professor João Paulo por todo suporte estatístico oferecido.

Agradeço aos técnicos do DTIPOA, Cosme, Maura, Marco Antônio, César, Márcia e Miltoninho.

Aos funcionários do LabUFMG por sempre estarem de prontidão para receber minhas amostras.

Agradeço à CAPES, FAPEMIG e ao CNPq por todo apoio institucional e financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 LEITE UAT	14
3.1.1. REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO LEITE UAT.....	14
3.2. AVALIAÇÃO SENSORIAL DO LEITE UAT	15
3.3. ESTABILIZANTES EM LEITE UAT	16
3.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	16
3.4.1. ALTERAÇÕES NA PROTEÍNA DO LEITE UAT.....	18
3.4.2. ALTERAÇÕES NA GORDURA DO LEITE UAT.....	18
3.5. FRAUDES EM LEITE	19
3.6. CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP)	19
3.7. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	21
3.8. TEMPERATURA E PERÍODO DE ESTOCAGEM	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. AMOSTRAGEM	22
4.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	22
4.2.1. CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS....	22
4.2.2. CONTAGEM BACTERIANA TOTAL.....	22
4.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	23
4.3.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	23
4.4. ÍNDICE DE LIPÓLISE	23
4.5. ANÁLISES DE NEUTRALIZANTES DA ACIDEZ, RECONSTITUINTES DA DENSIDADE, CONSERVANTES DO LEITE E ANTIBIÓTICOS	24
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média dos resultados das análises físico-químicas de 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B). 26
- Tabela 2 – Média dos teores de Proteína Total, Caseína e Índice de CMP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B). 31
- Tabela 3 – Média dos resultados de mesófilos aeróbios e CPP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B). 34

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Desenho esquemático da micela de caseína; A: submicela; B: cadeia protéica; C: fosfato de cálcio; D: κ -caseína; E: grupamentos fosfatos. 20
- Figura 2 – Média dos resultados dos teores de gordura e índice de lipólise encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento. 28
- Figura 3 – Média dos resultados dos teores de proteína e CMP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento. 31
- Figura 4 - Índice de CMP médio (mg/L) de 120 amostras de leite UAT estocadas ao longo de 120 dias de armazenamento em relação as temperaturas de estocagem e indústrias (A e B). Obs: Resultados negativos estão relacionados a constante negativa a qual não foi significativa. 33

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Requisitos físico-químicos para leite UAT..... 15
- Quadro 2 Requisitos microbiológicos para leite UAT..... 15

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácido graxo livre
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMP	Caseínomacropéptido
CPP	Contagem Padrão em Placas
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EV	Escola de Veterinária
FAO	Food and Agriculture Organization
LabUFMG	Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG
LPL	Lipoproteína lipase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
PCA	Plate Count Agar
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
ST	Sólidos Totais
TCA	Ácido tricloroacético
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHT	Ultra High Temperature

RESUMO

O leite UAT (UHT) é o tipo de leite fluido mais consumido pela população, devido principalmente à possibilidade de ser estocado a temperatura ambiente, por longo período de tempo. Porém, esse armazenamento prolongado pode resultar em perda de qualidade e integridade, devido principalmente a ação de enzimas termorresistentes que permanecem ativas após o processamento. Apesar do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UAT estabelecer exigências quanto ao teor de matéria gorda, acidez, estabilidade ao etanol 68% e à quantidade de micro-organismos mesófilos aeróbios, observa-se que apenas esses parâmetros podem não ser suficientes para averiguar a qualidade desse leite. Por isso, objetivou-se avaliar as alterações de natureza físico-química e microbiológica que ocorrem durante o armazenamento do leite UAT por até 120 dias. Foram avaliadas 120 amostras de leite UAT, procedentes de duas indústrias do estado de Minas Gerais, armazenadas em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) e por cinco períodos de armazenamento (0, 30, 60, 90 e 120 dias). Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2x2x5, totalizando 20 tratamentos, com seis repetições por tratamento (seis lotes). O estudo objetivou avaliar a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, determinar a composição centesimal, contagem de células somáticas, acidez, densidade, crioscopia, índice de lipólise e caseinomacropéptideo (CMP), além das análises de conservantes e reconstituintes no leite UAT. Quando comparados aos parâmetros exigidos pelo RTIQ do leite UAT, observou-se que os valores médios de acidez, gordura e extrato seco desengordurado (ESD) mantiveram-se dentro do padrão até o último dia de estocagem. Quanto aos outros parâmetros [densidade, crioscopia, índice de lipólise, lactose, sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS); teor de proteína, caseína e CMP], não são abrangidos pela legislação específica do leite UAT, o que pode levar a falhas durante a inspeção desse produto. A densidade, CCS, contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios e Contagem Bacteriana Total (CBT) não tiveram alterações relacionadas aos períodos de estocagem, diferentes temperaturas de armazenamento e indústrias. Houve aumento gradativo e significativo ($p < 0,05$), ao longo do tempo, da acidez, índice de lipólise e CMP; por outro lado houve diminuição gradativa significativa ($p < 0,05$) de matéria gorda, ST, ESD e proteína total. A lactose manteve-se com média praticamente constante durante o período de estocagem e teve diminuição significativa ($p < 0,05$) apenas aos 120 dias. Houve efeito de temperaturas e indústrias nos parâmetros de índice crioscópico, lactose, ST, ESD e CMP, mostrando que o aumento da temperatura de armazenamento pode intensificar as alterações que ocorrem no leite e a qualidade do leite está associada à sua origem (indústria). Nas análises de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade, conservantes do leite e resíduos de antibióticos não foram encontradas alterações, descartando a possibilidade de fraudes no leite. Os resultados demonstram que há perda gradativa da qualidade do leite UAT durante sua vida de prateleira, devendo-se atentar para a qualidade do leite cru que será processado e refletirá na vida útil do leite UAT. Além disso, a legislação do leite UAT pode ser aprimorada, de modo a estabelecer parâmetros de controle de qualidade que permitam sua avaliação em outros quesitos ainda não contemplados, como o CMP que pode ser um ótimo índice de qualidade do leite no mercado por refletir condições de qualidade do leite cru e do processado.

Palavras-chave: leite UAT, fraudes, estabilizantes, lipólise, proteólise, qualidade do leite, CMP.

ABSTRACT

UHT milk is the most consumed fluid milk by the Brazilian population, because of the easy storage at room temperature. However, such storage, when prolonged, may result in loss of quality, integrity and safety, mainly due to the action of thermoresistant enzymes that remain active after processing. Although the Brazilian Regulation of UHT milk establishes requirements for fat content, acidity, ethanol stability and the counting of aerobic mesophilic microorganisms. It is observed that only these parameters may not be adequate to verify the quality of this milk. The objective of this study was to evaluate the physicochemical and microbiological changes that occur during UHT milk storage for up to 120 days. A total of 120 UHT milk samples were collected from two dairy industries in the state of Minas Gerais, stored at two temperatures (20°C/30°C) and five periods (0, 30, 60, 90, and 120 days). A completely randomized design was used in a 2x2x5 factorial arrangement, with a total of 20 treatments, with six replicates per treatment (six batches). The objective of this study was to evaluate: aerobic mesophilic microorganisms counting, centesimal composition, somatic cell count, acidity, density, freezing point, lipolysis index and caseinomacropptide (CMP), as well as the residues of preservatives and other illegal substances added to UHT milk. When compared to the Brazilian parameters for UHT milk, the average values of acidity, fat and solids non-fat (SNF) contents remained within the acceptable values until the last day of storage. However, the other parameters [density, freezing point, lipolysis index, somatic cell count (SCC), lactose, total solids (TS), casein and protein content, and CMP] are not covered by specific legislation of UHT milk in Brazil. Density, SCC, aerobic mesophilic microorganisms and Total Bacterial Count (TBC) did not change due to storage time and temperatures, and industries. There was a gradual and significant increase ($p < 0.05$) only at day 120. The different temperatures and industries resulted in considerable changes of freezing point, lactose, TS and SNF contents and CMP, showing that low milk quality and increasing storage temperatures may intensify the changes that occur in milk. No extraneous substances, such as neutralizers of the acidity, density modifiers, preservatives or residues of antibiotics were detected. The results show that there is a gradual loss of UHT milk quality during its shelf life, which is related to the raw milk quality and storage time. In addition, UHT milk legislation could be improved with the addition of new quality control parameters to improve quality monitoring during storage, such as CMP index.

Key-words: UHT milk, frauds, stabilizers, lipolysis, proteolysis, milk quality, CMP.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a produção mundial de leite aumentou mais de 50%, chegando a 652 milhões de toneladas, em 2017. O Brasil, produzindo aproximadamente 33,5 milhões de toneladas por ano, é o terceiro maior produtor de leite do mundo, ficando abaixo apenas dos Estados Unidos e da Índia que ocupa o primeiro lugar representando uma parcela de 13% do volume total de produção (FAOSTAT, 2017).

Em pesquisa realizada pela Associação Brasileira da Indústria do Leite Longa Vida (ABLV), no ano de 2016, apesar da crise, o leite longa vida é uma preferência dos brasileiros, representando 86% do leite fluido de consumo, categoria em que faz parte junto com o leite pasteurizado (14%). Quando o leite em pó de consumo direto é incluído na estatística, o leite longa vida passa a representar 62,5% do total de leite consumido no Brasil (ABLV, 2016).

O leite é um alimento rico em nutrientes, tendo em sua composição alto teor de proteínas, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água, sendo considerado um dos produtos mais completos por seu valor nutricional. É utilizado na dieta humana em todas as faixas etárias, pois auxilia no desenvolvimento. Portanto, é necessário conhecer a composição e os padrões de qualidade do leite visto que o não cumprimento desses parâmetros de controle pode levar a ingestão de um produto de qualidade indesejável (Silva *et al.*, 2015).

O leite e seus derivados são fontes de proteínas de alta qualidade, vitaminas e minerais com destaque para o cálcio. Embora o cálcio seja um mineral amplamente distribuído na natureza, diferentemente dos produtos vegetais, nos lácteos este micronutriente possui maiores taxas de absorção. Por este motivo, e pela presença de lactose e outros micronutrientes que favorecem a absorção de cálcio, leites e derivados são considerados as principais fontes alimentares deste mineral que, dentre outras funções, é fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea do organismo. A ingestão de leite e derivados tem sido associada a efeitos benéficos no que diz respeito à saúde óssea e muscular, além da prevenção a doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, como o de cólon. Por isso, o consumo de leite é recomendado à população e a redução ou restrição ao consumo de leite e derivados somente deve ser feita aos indivíduos com diagnóstico clínico confirmado de intolerância à lactose, alergia à proteína do leite ou de outras condições físicas e imunológicas (SBAN, 2015).

A procura por produtos lácteos com maior vida de prateleira que, ao mesmo tempo, conservem suas características sensoriais, nutritivas e de segurança são requisitos cada vez mais importantes para o consumidor, para a indústria e conseqüentemente para o produtor, ressaltando que a qualidade final do leite é dependente da qualidade da matéria-prima antes de ser processada e tem como ponto de partida o local de produção. O principal conceito de qualidade é que não há como melhorá-la depois que o leite deixa a fazenda (Fonseca & Santos, 2007).

Após a obtenção do leite, vários processos podem ser executados visando manter sua qualidade e aumentar seu período de validade, como a pasteurização, o envasamento e o resfriamento. O leite UAT (Ultra Alta Temperatura) ou UHT (*Ultra High Temperature*) é o leite processado termicamente que possui como características ser menos perecível e poder ser estocado em temperatura ambiente por longo período (até 120 dias), diferente do leite pasteurizado, que deve permanecer refrigerado devido à maior quantidade de micro-organismos viáveis. O processamento UAT é feito de forma contínua, com temperaturas altas o suficiente para inativar

a quase totalidade dos micro-organismos (esterilização comercial), e envasado assepticamente em embalagens estéreis; o que justifica ser menos perecível.

O processamento UAT não altera o valor nutritivo do leite de forma significativa, ao contrário do que ocorre na esterilização convencional que é feita a uma temperatura de 120°C entre 15 a 20 minutos o que impacta negativamente na avaliação sensorial. Com exceção de algumas vitaminas, no processamento UAT não há modificações expressivas na composição do leite, como teor de proteínas e aminoácidos, lactose, gordura e sais minerais (Guedes Neto *et al.*, 2002). Porém, a estocagem do leite UAT por longo período em temperatura ambiente pode causar alterações na sua composição centesimal, bem como favorecer o desenvolvimento de micro-organismos, consequentemente comprometendo a qualidade do leite e seus derivados.

As leis referentes aos alimentos asseguram parâmetros de identidade e requisitos mínimos de qualidade para cada tipo de alimento, tendo como objetivo principal melhorar e aprimorar a qualificação dos produtos processados e comercializados e oferecer alimentos íntegros em sua composição, tanto nutricional quanto em suas características sensoriais. Nesse sentido, o leite UAT precisa atender aos padrões estabelecidos pelo seu RTIQ (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade).

Embora o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (Brasil, 1997) estabeleça os parâmetros microbiológicos e físico-químicos legais para controle deste produto dentro da indústria, devido a particularidades do processamento UAT, provas microbiológicas e físico-químicas importantes, que integram o conjunto de análises básicas estabelecidas para o controle de qualidade dos leites cru e pasteurizado, não são preconizadas para leite UAT, como crioscopia, densidade, extrato seco total, teor de proteína, dentre outras (Tamanini *et al.*, 2011). A falta desses parâmetros para averiguar a qualidade desse leite leva a falhas na inspeção desse alimento, não constatando algumas fraudes e perdas em sua qualidade. Por isso, é necessário atualizar os parâmetros do leite UAT além de incluir análises importantes na averiguação de sua qualidade como o índice de lipólise e CMP, que podem ser ótimos parâmetros para quantificar o grau de degradação do leite. Dessa forma, a iniciativa deste trabalho justifica-se pela necessidade da avaliação da qualidade do leite UAT, considerando também esses outros índices de qualidade citados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição físico-química e qualidade microbiológica do leite UAT fornecido por duas indústrias distintas e estocado em duas temperaturas (20°C/30°C) ao longo de 120 dias de armazenamento.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Verificar a presença e o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos aeróbios no leite UAT proveniente de duas indústrias (A e B) e armazenado sob diferentes temperaturas (20°C e 30°C) por até 120 dias.

2.2.2. Acompanhar alterações composicionais, de acidez titulável, índice de lipólise e Contagem de Células Somáticas (CCS) durante a estocagem por 120 dias, com relação às temperaturas de estocagem (20°C/30°C) e indústrias (A e B);

2.2.3. Determinar o índice de caseínomacropéptido (CMP) no leite durante a estocagem por 120 dias, associando as alterações às diferentes temperaturas de estocagem (20°C/30°C) e indústrias (A e B);

2.2.4. Avaliar a utilização do CMP como um índice de qualidade;

2.2.5. Verificar a presença de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade, conservantes do leite e resíduos de inibidores do crescimento microbiano.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Leite UAT

Para a produção de leite UAT, o leite homogeneizado deve ser processado em fluxo contínuo em temperaturas entre 130 a 150°C por 2 a 4 segundos, sendo imediatamente resfriado a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas hermeticamente fechadas. A estocagem e entrega ao consumo desse leite ocorre em temperatura ambiente (Brasil, 2017).

Durante o processo UAT, as proteínas tendem a desestabilizar, devido aos tratamentos térmicos empregados e à homogeneização (Vidal-Martins *et al.*, 2005). Para evitar que isso ocorra, é permitida a adição de estabilizantes a esse leite (Brasil, 1997). Os estabilizantes são os únicos aditivos permitidos pela legislação que podem ser adicionados no leite. A presença de qualquer outra substância é considerada fraude e está sujeita às penalidades cabíveis.

O tratamento térmico UAT possui algumas particularidades que podem refletir em suas características físico-químicas. Para aquecer o leite pode-se utilizar dois sistemas: o sistema indireto, com trocadores de calor, e o sistema direto, no qual o leite sofre injeção direta de vapor aquecido. No primeiro, o leite é aquecido pelo calor por meio de dispositivos metálicos (placas ou tubos) condutores de energia calorífica; como na pasteurização, o aquecimento destes dispositivos se dá por meio de água quente ou vapor. Já no tratamento direto, primeiramente o leite é pré-aquecido a 80°C por 2 a 3 minutos e então submetido a temperaturas entre 130 e 150°C por 2 a 4 segundos (tratamento UAT propriamente dito) pela injeção direta de vapor quente e homogeneizado. Logo depois este leite passa pela câmara de vácuo, a fim de eliminar a água do vapor condensado. O sistema de injeção direta de vapor é o que menos causa alterações no leite e por isso é também o mais adotado pelas indústrias. Por atingir a temperatura desejada de forma quase instantânea, o sistema direto expõe o leite ao aquecimento por um tempo menor do que no sistema UAT indireto (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Porém, excesso de água de condensação pode ainda permanecer no leite causando aumento do índice crioscópico e densidade (Tamanini *et al.*, 2011).

O RTIQ do leite UAT estabelece os parâmetros para as características físico-químicas e microbiológicas desse leite, porém não abrange as análises de crioscopia e densidade que seriam importantes para detectar a presença de água no leite.

3.1.1. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (Brasil, 1997) estabelece as características mínimas de identidade e qualidade para esse leite. Quanto as características sensoriais, o leite deve apresentar-se com aspecto líquido, cor branca, odor e sabor característicos, sem sabores nem odores estranhos. Quanto as características físico-químicas, deve apresentar parâmetros mínimos de qualidade, abrangendo matéria gorda, acidez, estabilidade ao etanol 68% e Extrato Seco Desengordurado (Quadro 1).

Quadro 1 – Requisitos físico-químicos para leite UAT

Requisitos	Leite Integral	Leite Semi ou Parcialmente Desnatado	Leite Desnatado	Métodos de Análises
Matéria Gorda % m/m	Mín. 3.0	0,6 a 2,9	Máx. de 0,5	FIL 1C: 1987
Acidez g ac. Lático/100 ml	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	AOAC 15 ed. 947.05
Estabilidade ao etanol 68% (v/v)	Estável	Estável	Estável	FIL 48: 1969
Extrato seco desengordurado % (m/m)	Mín. 8.2	Mín. 8.3	Mín. 8.4	FIL 21B: 1987

Fonte: BRASIL (1997)

Além disso, deve passar por incubação em embalagem fechada a 35-37°C durante sete dias, não apresentando modificações que alterem a embalagem; continuar estável ao etanol 68% v/v; a acidez não deve ir além de 0,02g de ácido láctico/100mL em relação a acidez determinada em outra amostra original fechada, sem incubação prévia. As características sensoriais não devem diferir sensivelmente das de um leite UAT sem ser incubado.

O RTIQ do leite UAT permite o uso dos seguintes estabilizantes: citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio, separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1g/100mL expressos em P₂O₅.

Quanto aos critérios microbiológicos e tolerâncias, o RTIQ do leite UAT estabelece limites para a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios (Quadro 2).

Quadro 2 – Requisitos microbiológicos para leite UAT

Requisito	Critério de Aceitação	Categoria (ICMSF)	Método de Análise
Aeróbios Mesófilos/ ml	n=5 c=0 m=100	10	FIL 100B: 191

Fonte: BRASIL (1997)

3.2. Avaliação sensorial do Leite UAT

Alguns exemplos de alterações no aspecto do leite são: presença de grumos, leite filamentososo, material estranho em suspensão e depósito de material gelificado no fundo da embalagem; sabor amargo, rançoso, ácido ou salgado.

Segundo Burton (1988), durante o processo UAT a maioria das bactérias perde a viabilidade, mas enzimas termoestáveis de origem nativa ou bacteriana podem continuar ativas e dão origem, durante o armazenamento, a gelificação e sabores anormais (amargo, velho e oxidado).

Alguns fatores são significativos para o início da gelificação como a natureza do tratamento térmico, a proteólise durante o armazenamento, a composição e qualidade do leite, fatores sazonais de produção de leite, temperatura de armazenamento e adição excessiva de aditivos como o fosfato de sódio e citrato de sódio que são capazes de acelerar a gelificação em leite UAT (Datta; Deeth, 2001).

Malmgren *et al.* (2017) analisaram leite UAT em uma fábrica na Suécia, estudando um defeito muito frequente, a sedimentação e a gelificação. Concluíram que o aumento da sedimentação é fortemente dependente da temperatura de armazenamento, pois com o aumento desta são encontrados maiores níveis de sedimentação. Vesconsi *et al.* (2012) analisando leite UAT integral, semidesnatado e desnatado, armazenados a 20°C e 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 120 dias, em um laticínio do Rio Grande do Sul, verificaram que no decorrer do período de armazenamento ocorreu aumento de sedimentação nos três tipos de leite UAT armazenados a 30°C, e o leite integral no 120º dia de armazenamento a 30°C apresentou maior quantidade de sedimentação que os outros tipos de leite. Isso estaria relacionado com a ação das enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas pelas bactérias psicrotólicas, cuja ação é favorecida a maiores temperaturas.

Costa (2010) ao analisar sete marcas de leite UAT verificou ocorrência de gelificação no fundo da caixa do leite de uma marca aos 135 dias de estocagem, e relacionou o acontecimento a adição de citrato de sódio acima do preconizado pelo RTIQ de leite UAT.

3.3. Estabilizantes em leite UAT

A legislação permite a adição dos aditivos estabilizantes citratos e fosfatos de sódio, separados ou em combinação, em quantidades não superiores a $0,1\text{g}100\text{mL}^{-1}$ (Brasil, 1997). A adição de estabilizantes de proteína, conseqüentemente, altera o índice crioscópico e a densidade do leite, porém a legislação que regulamenta os padrões para análise do leite UAT não abrange essas provas, que poderiam servir para a detecção de resíduo de água incorporada ou adicionada (Tamanini *et al.*, 2011).

Estudos preliminares de Beloti *et al.* (2010), citados por Tamanini *et al.* (2011), constataram que a adição de 0,1% do estabilizante citrato de sódio ao leite UAT reduz o ponto crioscópico em cerca de $-0,020^\circ\text{H}$. Sendo assim, concluíram que o ponto de congelamento para leite UAT seria próximo a $-0,550^\circ\text{H}$. Martins *et al.* (2008) estudaram a diferença entre o índice crioscópico do leite cru e do mesmo leite após o processamento UAT, concluindo ter ocorrido inclusão de água por falhas no processo de retirada da água que condensou durante o aquecimento do leite por injeção direta de vapor.

3.4. Características físico-químicas

As principais características físico-químicas do leite UAT são a acidez, densidade, crioscopia ou índice crioscópico (ponto de congelamento), teor de proteína e matéria gorda, que estão relacionadas a várias reações que podem ocorrer antes, durante e após o tratamento térmico, e

podem levar a diminuição ou aumento de seus valores. Porém, o RTIQ do leite UAT inclui apenas a necessidade de avaliação da acidez e matéria gorda no leite UAT havendo uma real necessidade de atualização com incremento de novos parâmetros na legislação. Durante o armazenamento pode ocorrer, por exemplo, a gelificação de proteínas, proteólise e lipólise diminuindo o teor de proteína e gordura, respectivamente; aumento da acidez e diminuição do índice crioscópico. A proteólise e a lipólise podem ocorrer por meio de enzimas nativas do leite, que são inativadas durante o tratamento térmico, ou, principalmente, por meio de enzimas extracelulares termorresistentes produzidas por micro-organismos psicrotróficos. Estas causam proteólise e lipólise nos constituintes do leite, mesmo após tratamento térmico e, portanto, contribuem significativamente para a degradação de proteínas e lipídeos (Villanoeva *et al.*, 2014).

A baixa qualidade microbiológica do leite cru destinado ao processamento UAT impacta a qualidade deste, proporcionando diminuição na vida de prateleira, já que durante todo o tempo que o leite cru fica refrigerado ocorre a proliferação de micro-organismos psicrotróficos e consequente produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que se acumulam até o tratamento térmico deste leite. Após o tratamento térmico grande parte dos micro-organismos são inativados, porém as enzimas continuam viáveis e degradando o leite (Vesconsi *et al.*, 2012). Por isso é essencial ter uma boa qualidade do leite cru e controle dessa qualidade durante toda a cadeia da refrigeração ao processamento visando mantê-la, pois ela irá refletir na qualidade final do leite UAT exposto no mercado.

Vesconsi *et al.* (2012) analisaram leite UAT integral, semidesnatado e desnatado, armazenados a 20°C e 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 120 dias quanto a acidez, pH, fervura, sensorial, integridade das embalagens e sedimentação e obtiveram valores de acidez crescentes durante o armazenamento, porém dentro da faixa de acidez estabelecida pelo RTIQ do leite UAT (Brasil, 1997). Este estabelece acidez de 0,14 a 0,18g ácido láctico 100 mL⁻¹ (Brasil,1997). Apenas o leite integral apresentou acidez de 0,20g ácido láctico 100mL⁻¹ no 120º dia de armazenamento a 30°C. Rossi Júnior *et al.* (2006) encontraram resultados semelhantes, com baixas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite UAT recém envasado. O aumento da acidez pode estar relacionado tanto ao aumento de ácidos graxos livres resultantes da lipólise, como ao aumento de ácido láctico produzido durante a fermentação do leite por micro-organismos lacto-fermentadores, quando presentes, cuja presença está relacionada a problemas higiênico-sanitários desde a ordenha até o processamento.

Segundo Beloti *et al.* (2010), citados por Tamanini *et al.* (2011), o índice crioscópico de $-0,530^\circ\text{H}$ estabelecido para o leite cru e pasteurizado é alterado por vários fatores durante o processamento UAT. A injeção direta de vapor, durante o tratamento térmico, provoca a condensação de água, cujo excesso deve ser removido. A ausência de um padrão de crioscopia específico para o leite UAT, muitas vezes, faz com que as indústrias de laticínios recomponham o leite sem considerar que houve a adição de estabilizantes de proteínas como o citrato de sódio que, por se tratarem de sais, alteram o ponto de congelamento do leite, levando à redução do índice crioscópico. Assim, a recomposição deveria ser baseada na crioscopia do leite após a adição do citrato de sódio e antes do tratamento UAT. Desconsiderar as alterações provocadas pela adição de estabilizantes resulta na possibilidade de permanência de parte da água incorporada ao leite durante o tratamento térmico, o que compromete a integridade do produto.

Quanto a densidade, quando está abaixo do mínimo pode indicar adição de água no leite e, eventualmente, problemas de saúde da vaca, ou mesmo problemas nutricionais. Contudo, a densidade depende também da quantidade de gordura e de sólidos não-gordurosos, porque a gordura do leite tem densidade menor que a da água, enquanto que os sólidos não-gordurosos têm densidade maior. A análise de densidade indicará claramente alteração no valor somente quando mais que 5 a 10% de água for adicionada ao leite. Densidade acima do normal pode indicar que houve desnate ou, ainda, que soluto foi adicionado (Embrapa, 2019). Bersot et al. (2010) consideraram como padrão para densidade do leite UAT o mínimo de 1,028 g/cm³, já que o RTIQ de leite UAT não inclui esse parâmetro, descrevendo assim 2,7% de suas amostras como irregulares. Já Tamanini *et al.* (2011) encontrou apenas 1 (6,25%) amostra das analisadas fora do padrão para densidade.

3.4.1. Alterações na Proteína do Leite UAT

A proteólise no leite UAT, durante a estocagem em temperatura ambiente, é um fator importante na diminuição da porcentagem de proteína no leite, limitando sua vida de prateleira devido às mudanças em seu sabor e textura. A alteração de textura é caracterizada pelo aumento na viscosidade, levando, em alguns casos, à formação de gel. As enzimas responsáveis pela proteólise são: a proteinase alcalina nativa do leite, plasmina e proteinases extracelulares bacterianas termoestáveis, produzidas por bactérias psicrotróficas contaminantes do leite antes do processamento térmico. Estas proteinases reagem diferentemente com as proteínas do leite e produzem diferentes peptídeos no leite UAT (Datta; Deeth, 2003).

Vidal-Martins *et al.* (2005) estudando o índice proteolítico do leite UAT, determinado por meio da quantificação do ácido siálico, ao longo de 120 dias de vida de prateleira de dois lotes, concluíram que houve um aumento da proteólise no decorrer do armazenamento. Esta proteólise está relacionada com a quebra da caseína pela ação das proteases bacterianas, originárias principalmente das bactérias psicrotróficas presentes no leite cru que, após o tratamento UAT, são eliminadas, mas as enzimas termorresistentes permanecem atuando lentamente sobre as proteínas durante o armazenamento, conseqüentemente levando a diminuição do teor protéico.

3.4.2. Alterações na Gordura do Leite UAT

A gordura, assim como a proteína, é um dos principais macro-nutrientes do leite, utilizado na produção de derivados lácteos. Além de apresentar um alto valor nutricional e econômico, os lipídios estão diretamente relacionados à qualidade do produto em consequência da sua oxidação ou degradação hidrolítica com conseqüente desenvolvimento de sabores desagradáveis (a exemplo do ranço). As reações de lipólise podem ocorrer por ação dos agentes lipolíticos secretados por microrganismos ou pela ação de enzimas nativas do leite, como a lipoproteína lipase (LPL) (McSweeney, 2004; Perry, 2004).

A concentração da LPL presente no leite seria suficiente, em condições ótimas para sua atuação, para causar ranço perceptível. Entretanto, no leite cru tal reação não acontece devido à membrana lipoproteica que envolve os glóbulos de gordura e ao fato de cerca de 90% da LPL estar associada a micelas de caseína (Há e Lindsay, 1991; McSweeney, 2004). No leite UAT, por outro lado, ocorre a inativação dessas enzimas durante o tratamento térmico, dessa forma, elas não apresentam importância na ocorrência de ranço (Deeth, 2006).

Ainda, segundo Deeth (2006), diferente da LPL, as lipases produzidas por bactérias psicotróficas não tem sua ação limitada pela membrana lipoproteica e, além disso, essas enzimas são estáveis ao calor, não ocorrendo sua inativação durante o processamento térmico do leite. Como consequência, o leite UAT e produtos derivados como manteiga, queijo e leite em pó, podem sofrer alterações durante o período de armazenamento com desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis, e diminuição do teor de gordura, podendo ser inaceitáveis para consumo humano.

O índice de lipólise em um produto pode ser determinado a partir da mensuração do teor de ácidos graxos livres (AGL). A determinação precisa de AGL em produtos lácteos é importante porque influenciam a qualidade do produto, principalmente as suas propriedades sensoriais como sabor e aroma, e por contribuir para a textura e funcionalidade do leite, alterando a tensão superficial e a capacidade de formação de espuma (Mannion et al., 2015). Valores, em leite integral, superiores a 1,5 mmol/L são inaceitáveis para a maioria das pessoas, sendo o sabor descrito como rançoso, butírico, adstringente ou até mesmo amargo (Deeth, 2006). Para medição quantitativa de AGL podem ser empregados três tipos de métodos, com base no isolamento dos AGL: (1) acidez da gordura livre, obtida por agitação ou por desemulsificação; (2) extração de solventes seguida por titulação alcalina da fase orgânica; e (3) métodos colorimétricos envolvendo o corante rodamina. Dentre estes, a extração por solventes é um dos métodos mais rápidos e menos trabalhosos (Deeth et al., 1975).

3.5. Fraudes em Leite

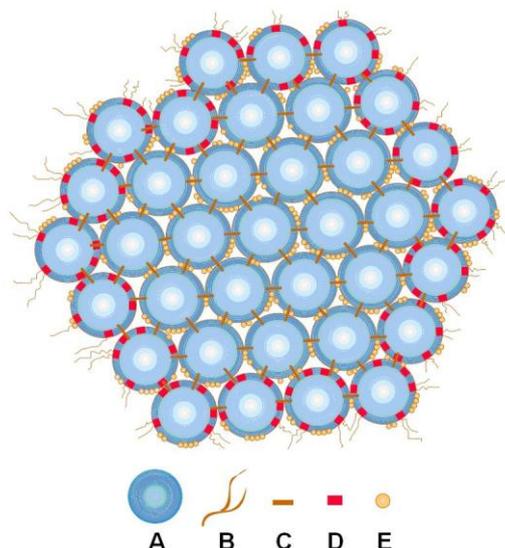
Segundo o parágrafo único do artigo 504 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de 29 de Março de 2017, são considerados adulterados as matérias-primas e os produtos que tenham sido privados parcial ou totalmente de seus componentes característicos em razão da substituição por outros inertes ou estranhos; que tenham adição de ingredientes, de aditivos, de coadjuvantes de tecnologia ou de substâncias de qualquer natureza com o objetivo de dissimular ou de ocultar alterações, deficiências de qualidade da matéria-prima, defeitos na elaboração ou de aumentar o volume ou o peso do produto; os produtos que na manipulação ou na elaboração tenham sido empregados matérias-primas ou ingredientes impróprios ou que não atendam ao disposto no RTIQ ou na formulação indicada no registro do produto; os produtos em que tenham sido empregados ingredientes, aditivos ou coadjuvantes de tecnologia diferentes daqueles expressos na formulação original ou sem prévia autorização do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal; ou os produtos que sofram alterações na data de fabricação, na data ou no prazo de validade.

Os alimentos ou ingredientes mais suscetíveis às práticas fraudulentas são aqueles com alto valor agregado ou que passam por várias etapas de processamento. O leite é um dos produtos sujeito a adulterações, afetando a sua qualidade e a dos derivados lácteos. A adulteração do leite por adição de ingredientes de baixo valor, tais como água e soro lácteo, é conhecida como "adulteração econômica" e esta prática tem sido registrada muitas vezes (Oancea, 2009). A Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece como devem ser feitas as análises de neutralizantes da acidez, reconstituíntes da densidade (amido, sacarose, cloretos) e conservantes (formol, peróxido de hidrogênio).

3.6. Caseinomacropéptido (CMP)

O CMP é uma porção hidrofílica da κ -caseína que é liberado durante o processo de coagulação do leite, pela ação da quimosina (Figura 1). A fraude por adição de soro de queijo ao leite pode ser detectada pela análise do índice de caseinomacropéptido (CMP). No entanto, a ação de proteases termorresistentes produzidas por micro-organismos psicrotróficos também implica na produção de CMP denominado pseudo-CMP (Lobato, 2014). Logo, a quantidade de CMP, determinada como limite máximo de 30mg/L para consumo humano direto pela Instrução Normativa n° 69, de 13 de dezembro de 2006, abrange tanto o CMP obtido de soro de queijo quanto o CMP originado da proteólise por enzimas produzidas por psicrotróficos. De acordo com a legislação brasileira, amostras de leite que apresentarem concentração de CMP acima de 30 mg/L não podem ser destinados ao consumo direto, pois, ou apresentam adição de soro de queijo (leite fraudado) ou são de má qualidade devido a intensa atividade proteolítica no produto. (Brasil, 2006).

Figura 1 – Desenho esquemático da micela de caseína; A: submicela; B: cadeia protéica; C: fosfato de cálcio; D: κ -caseína; E: grupamentos fosfatos.



Fonte: Dairy Processing Handbook (1995)

Friedrich *et al.* (2010), analisando leite UAT da região de Passo Fundo – RS, coletado logo após o envase e estocado durante 49 dias mostraram que a partir de 21 dias de estocagem o CMP já ultrapassava o limite exigido pela legislação para consumo humano. Concluíram que, mesmo com o processo de ultra-alta temperatura, há ocorrência de proteólise no leite durante o tempo de vida de prateleira, pois existem enzimas proteolíticas termorresistentes ativas no leite.

A quantidade de enzimas proteolíticas no leite UAT está ligada a quantidade anterior de micro-organismos psicrotróficos e mesófilos aeróbios que multiplicaram no leite cru até seu processamento. O tempo e a temperatura de estocagem do leite cru são essenciais para limitar a proliferação destes micro-organismos, além de boas condições de higiene. O processamento UAT é capaz de eliminar estes micro-organismos quase em sua totalidade, porém as enzimas termorresistentes por eles produzidas permanecem e continuam em atividade no leite durante todo

o período de prateleira, impactando em sua qualidade final (Vidal-Martins *et al.*, 2005). A quantificação do CMP, portanto, poderia ser importante para quantificar a degradação no leite UAT estocado, podendo ser adotado como um índice de qualidade; além de ser importante para rejeição do produto, quando ultrapassado os limites estabelecidos pela legislação. Porém, a literatura atual carece de trabalhos publicados sobre o uso do índice de CMP como índice de qualidade em leite UAT.

3.7. Características microbiológicas

Segundo Costa (2010), pode haver micro-organismos no leite UAT oriundos de recontaminação, falha no processamento ou pela persistência de esporos termorresistentes de *Bacillus spp.*, e os termodúricos, *Streptococcus*, *Micrococcus* ou algumas bactérias Gram-negativas. Estes micro-organismos podem danificar o leite por meio da coagulação enzimática, produção de gases, gosto amargo e odores estranhos.

Aeróbios mesófilos podem se desenvolver e atuar em leite armazenado em temperatura ambiente causando acidificação ao hidrolisarem a lactose originando ácido láctico, o que causaria aumento dos valores de acidez titulável e redução do pH. Para Melo Júnior (2005), que verificou altas contagens de aeróbios mesófilos e diminuição de pH ao longo da vida de prateleira em leite UAT estocado por quatro meses, os resultados estão atrelados a baixa qualidade higiênico-sanitária desde a ordenha até o processamento do leite na indústria. O processamento térmico aplicado à matéria-prima para a produção do leite longa vida é capaz de reduzir, mas não de eliminar a carga microbiana inicial.

3.8. Temperatura e período de estocagem

O leite UAT pode ser encontrado no comércio em diversas condições de temperatura dependendo do ambiente e clima da região. Porém, dados na literatura demonstram que a temperatura de armazenamento, assim como o tempo que permanece estocado, têm implicações consideráveis em sua qualidade, e por isso precisam ser avaliados.

Villanoeva *et al.* (2014), analisando leite UAT de uma indústria na região de Belo Horizonte em cinco períodos de estocagem (0, 30, 60, 90 e 120 dias) e em diferentes temperaturas (-12°C, 6°C e 21°C), observaram diferença significativa entre as três temperaturas de armazenamento, com picos de CMP mais altos com o aumento da temperatura. O aumento do tempo de armazenamento foi correlacionado ao aumento dos níveis de CMP no leite.

A análise de CMP pode ser usada em conjunto com as análises físico-químicas e microbiológicas para averiguar a qualidade do leite durante todo o período de validade e com relação às diferentes temperaturas de estocagem, constatando se ele realmente estaria apto ao consumo até o último dia de armazenamento. Para isso, seria preciso acompanhar se o leite estaria atendendo aos parâmetros legais definidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (Brasil, 1997) desde o envase até seu último dia viável durante sua vida de prateleira (120 dias). O CMP, além de ser importante para detecção de fraude por adição de soro, também pode ser um índice de qualidade, como já foi constatado em algumas pesquisas (Friedrich *et al.*, 2010; Villanoeva *et al.*, 2014), já que com o passar dos dias as enzimas que permanecem viáveis no leite UAT continuam agindo e diminuindo a qualidade deste produto.

Todas essas características e análises discutidas podem auxiliar no incremento da verificação da qualidade do leite UAT, já que a literatura ainda é escassa de informações sobre a qualidade desse leite até o fim de sua vida útil, e carece de informações quanto ao uso da análise de CMP nesse leite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras de leite UAT (padronizado com 3% de gordura) foram obtidas diretamente de duas indústrias, localizadas em Minas Gerais. As amostras foram recebidas com até duas semanas de fabricação, sendo o dia de recebimento da amostra estabelecido como dia 0. O índice de CMP de todas as amostras no dia 0 foi inferior a 30mg/L, caracterizando amostras normais. Foram analisados seis lotes (repetições) diferentes de leite UAT e, para cada lote processado, foram coletadas dez caixas de leite UAT. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Cromatografia da Escola de Veterinária da UFMG (DTIPOA/EV/UFMG).

Em condições laboratoriais, dez caixas de leite UAT de cada lote foram armazenadas em estufas, em duas temperaturas (20 e 30°C), sendo igualmente divididas, cinco caixas para cada temperatura. Representaram, assim, cada dia de análise: 0; 30; 60; 90 e 120 dias de armazenamento. A amostra referente ao dia zero foi imediatamente encaminhada aos procedimentos de análise. Tendo em vista o número de indústrias (2), temperaturas de armazenamento (2), períodos de armazenamento (5) e o número de repetições (6), o experimento contou com um total de 120 amostras.

4.2. Análises microbiológicas

As amostras foram homogeneizadas e uma alíquota de 25 mL foi transferida para um frasco contendo 225 mL de salina peptonada 0,1% estéril, originando a primeira diluição decimal. Seguiram-se as diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de salina peptonada 0,1% (Brasil, 2003). Procedeu-se a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios de acordo com a Instrução Normativa número 62, de 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

4.2.1. Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios

Alíquotas de um mililitro das diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram espalhadas em placas de petri estéreis e cerca de 15 a 20 mL de Plate Count Ágar, ágar PCA (KASVI), fundido e mantido em banho-maria a 46°C foi vertido em cada placa. As placas foram homogeneizadas e mantidas em superfície plana para que o ágar solidificasse. A incubação foi por 48 horas a 36°C, com as placas invertidas de acordo com a Instrução Normativa número 62, de 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

4.2.2. Contagem Bacteriana Total

A amostra foi adicionada a frasco estéril contendo azidiol (azida sódica e cloranfenicol), como conservante, e mantida sob refrigeração até o momento da análise. A contagem Bacteriana total foi realizada por equipamento eletrônico IBC (Contagem Bacteriana Individual) BactoScan™ FC

(*Foss Analytics*, Dinamarca, Hilleroed) no LabUFMG (Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG). Os laboratórios da RBQL do MAPA realizam a determinação da CBT através de equipamentos de citometria de fluxo e os resultados são originalmente expressos em CBI. Como a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 utiliza como padrão UFC/mL, os resultados em CBI dos equipamentos são convertidos em Contagem Padrão em Placas (CPP) expresso em UFC/mL, através de modelo estatístico.

4.3. Análises físico-químicas

Foram determinados seguindo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006: índice de CMP (Brasil, 2006b), acidez titulável, densidade a 15°C, teores de matéria gorda e de proteína total e o índice crioscópico (Brasil, 2006a). As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, exceto para a determinação de CMP, em todas as amostras. Para análise de CMP, a técnica CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foi aplicada com uso do cromatógrafo Shimadzu modelo LC - 10ATvp (Kyoto, Japão) pertencente ao Laboratório de Cromatografia (DTIPOA/UFMG), equipado com coluna de separação em gel Zorbax GF 250 (*Agilent*®) cujo princípio de separação baseia-se no tamanho das moléculas. A fase móvel foi constituída de uma solução tampão fosfato, em pH 6,0. A detecção foi feita por espectrofotometria no UV, no comprimento de onda de 205 nm, sendo os compostos quantificados por integração eletrônica das áreas dos picos (amostra e curva padrão). Foram preparadas, soluções padrão de CMP que contemplassem, no mínimo, concentração abaixo de 30mg/L e acima de 75mg/L em leite fluido integral, isento de fraude a saber: 0mg/L, 15mg/L, 30mg/L, 45mg/L, 60mg/L, 75mg/L e 90mg/L. Foi construído um gráfico de índice de CMP versus a área do pico no cromatograma obtido e calculada a reta de regressão linear aceitando-se valores com $R \geq 0,95$. As amostras de leite de 10 mL foram precipitadas com 5 mL de ácido tricloroacético 24% (TCA), adicionado lentamente e sob agitação constante, deixadas em repouso por 60 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. Aproximadamente 20µL de material filtrado foram injetados no cromatógrafo, com fluxo da fase móvel de 1,5mL por minuto.

4.3.1. Composição centesimal e Contagem de Células Somáticas

Alíquotas de 50 mL de cada amostra de leite foram acondicionadas em frascos com conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) e foram encaminhadas para o LabUFMG para determinação de teores percentuais de proteína, caseína, gordura, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado, além do índice crioscópico por equipamento eletrônico CombiScope™ FTIR (*Delta Instruments*, Holanda, Drachten) pela metodologia de absorção do comprimento de onda na região do infravermelho. E no mesmo equipamento, utilizando a metodologia de citometria de fluxo, foi determinada a contagem de células somáticas do leite (IDF, 1995). Os equipamentos supracitados foram calibrados com padrões de leite cru bovino.

4.4. Índice de Lipólise

A metodologia para a determinação do índice de lipólise no leite foi feita por meio de titulação dos ácidos graxos livres extraídos por solventes (Deeth *et al.*, 1975). Em um tubo de ensaio, 3 mL do leite foi misturado com 10 mL de solução de isopropanol, éter petróleo e ácido sulfúrico

(40:10:1 v/v); 6 mL de éter petróleo P.A., 4 mL de água destilada e duas gotas de solução de azul de metileno (0,1% m/v) para diferenciação das fases. Em seguida a amostra foi agitada e ficou em repouso por 5 minutos. O sobrenadante transparente foi retirado com o auxílio de uma pipeta e seu volume anotado e transferido para um erlenmeyer. Ao sobrenadante adicionou-se 2 gotas de solução metanólica de fenolftaleína (1% m/v) e procedeu-se a titulação dos ácidos graxos livres com solução metanólica de KOH (0,02 N). O teor de AGL é dado em μ equivalente/mL de leite e calculado pela seguinte equação:

$$\text{AGL } (\mu \text{ equiv./ mL}) = (T \cdot N / P \cdot V) \cdot 1000$$

Onde:

T = volume titulado

N= normalidade da solução da metanólica de KOH

P = volume do sobrenadante retirado

V = volume da amostra de leite

4.5. Análises de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade, conservantes do leite e resíduos de inibidores do crescimento microbiano

As análises de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade (amido, sacarose, cloretos) e conservantes (formol, peróxido de hidrogênio) do leite foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa Nº 68, de 12 de Dezembro de 2006 do MAPA. A pesquisa de resíduos de inibidores foi realizada utilizando-se o kit analítico Delvotest® SP NT (*Royal DSM*, Holanda, Delft) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6. Delineamento experimental e análise estatística

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x2x5, totalizando 20 tratamentos (indústrias x temperaturas de estocagem x períodos de armazenamento), com seis repetições por tratamento (seis lotes), totalizando 120 amostras. Para acompanhamento do efeito do armazenamento na qualidade do leite foi utilizado o modelo de regressão linear com significância de 5% para estudar as variações dos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e CMP, além de analisar a influência das diferentes temperaturas (20°C/30°C) e indústrias (A/B) em cada uma das variáveis estudadas durante os períodos de estocagem dos leites. O programa estatístico utilizado foi o STATA versão 15.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios das análises físico-químicas executadas ao longo da estocagem, de acordo com as diferentes temperaturas de estocagem e indústrias, como densidade, crioscopia, acidez, gordura, lipólise, lactose, sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) e contagem de células somáticas (CCS), obtidos no experimento, estão descritos na Tabela 1. Quando

comparados ao RTIQ do leite UAT observa-se que os valores médios de acidez, gordura e ESD mantiveram-se dentro do padrão da legislação até o último dia. Quanto aos outros parâmetros, não há valores de referência estabelecidos na legislação específica do leite UAT, o que pode resultar em falhas para a inspeção desse produto. Segundo o RIISPOA (Brasil, 2017), o leite deve ainda apresentar teor mínimo de proteína de 2,9g/100g; densidade relativa a 15°C entre 1,028 e 1,034 expressa em g/mL, índice crioscópico entre -0,530°H e -0,555°H, teor mínimo de lactose de 4,3g/100g, mínimo de ESD de 8,4g/100g e de sólidos totais de 11,4g/100g. Considerando também esses parâmetros, o leite ainda estaria dentro do padrão, embora esses valores sejam referência para leite cru refrigerado e os verdadeiros valores para leite UAT sejam diferentes, já que existe nele a presença do estabilizante citrato que altera seu índice crioscópico e densidade e pode encobrir a permanência de água de condensação no leite durante o processo de esterilização direta por vapor.

A densidade e o índice crioscópico não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) ao longo da estocagem e também não apresentaram associação significativa com as diferentes temperaturas de estocagem. Somente a crioscopia apresentou associação significativa ($p < 0,05$) com as diferentes indústrias, sendo que, da indústria B resultava em uma diminuição de -0,003 °H ao leite quando comparado a indústria A. A densidade se manteve praticamente constante ao longo da estocagem, com média igual a 1,032g/mL. Ela tende a permanecer constante com pequenas variações durante a estocagem, já que está ligada, principalmente, a presença de água e gordura no leite. Como a quantidade de água não varia durante a estocagem e a gordura, embora seja degradada por meio da lipólise, não tem grandes alterações em seu valor, a densidade tende a ter pouca ou nenhuma alteração durante o armazenamento do leite. Já a crioscopia teve média igual a -0,541°H. Costa (2010) analisando sete marcas de leite UAT concluiu que os índices de densidade se mantiveram dentro dos padrões normais (Brasil, 2017) durante os 135 dias de estocagem com exceção do leite de duas marcas que ficaram abaixo do mínimo aos 90 e 135 dias e 71% das amostras apresentaram índices crioscópicos acima do permitido (-0,555°H) ao final da estocagem. Martins *et al.* (2008) ao analisarem as características físico-químicas de 30 amostras de leite UAT encontraram valores de densidade e índices crioscópicos baixos, com densidade média igual a 1,028g/mL, sendo o mínimo exigido pela legislação, e índice crioscópico médio igual a -0,527°H, acima do mínimo exigido (-0,530°H).

Rios *et al.* (2013) investigando as alterações no índice crioscópico e densidade em amostras de leite UAT integral homogeneizado, decorrentes da adição de diferentes concentrações dos estabilizantes fosfatos de sódio (0,0-0,015%), concluíram que a redução do índice crioscópico é proporcional ao aumento da concentração de fosfato. Os estabilizantes são sais, e, como qualquer sal, tem a característica de reduzir o ponto de congelamento. Nas amostras com 0% de estabilizante, a média da crioscopia ficou em -0,537°H, já o leite com a concentração máxima testada de 0,15% ficou em -0,565°H, sendo que em 0,1% que é o limite máximo permitido pela legislação (Brasil, 1997) o ponto de congelamento médio foi -0,554°H, ou seja, foi capaz de alterar em -0,017°H. A prova de densidade não revelou alterações significativas, o que pode ter ocorrido pelo fato da densidade ser uma prova de menor sensibilidade, quando comparada à crioscopia. A determinação legal do ponto crioscópico para o leite UAT é de extrema importância, levando em consideração essas especificidades, já que pode ser indicativo da inclusão de água no leite e também pode servir para monitorar a concentração máxima permitida de estabilizantes.

Tabela 1 – Média dos resultados das análises físico-químicas de 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B).

INDÚSTRIA A											
Temperaturas de Estocagem		20°C					30°C				
Análise valores médios (DP)	0	30	Dias de estocagem			120	0	30	60	90	120
			60	90	120						
Densidade 15°C (g/mL)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	
Índice Crioscópico (°H)	0,546 (0,01)	0,540 (0,00)	0,542 (0,00)	0,542 (0,00)	0,542 (0,00)	0,545 (0,00)	0,540 (0,00)	0,543 (0,00)	0,544 (0,00)	0,545 (0,00)	
Acidez Dornic (°D)	15,43 (0,79)	15,53 (0,35)	17,03 (1,63)	17,37 (0,45)	17,93 (0,67)	15,62 (0,56)	15,43 (0,48)	17,20 (1,50)	17,90 (0,42)	18,42 (0,62)	
Matéria gorda (g/100g)	3,11 (0,09)	3,07 (0,08)	3,00 (0,10)	3,03 (0,08)	3,13 (0,11)	3,11 (0,08)	3,08 (0,05)	2,95 (0,04)	3,07 (0,16)	3,62 (1,16)	
Lipólise (μ equivalente/mL)	0,204 (0,03)	0,233 (0,02)	0,023 (0,01)	0,248 (0,01)	0,320 (0,04)	0,206 (0,03)	0,223 (0,03)	0,233 (0,02)	0,252 (0,02)	0,327 (0,04)	
Lactose (g/100g)	4,56 (0,02)	4,58 (0,03)	4,58 (0,03)	4,58 (0,03)	4,52 (0,05)	4,57 (0,01)	4,58 (0,02)	4,56 (0,03)	4,57 (0,02)	4,49 (0,08)	
ST (g/100g)	12,05 (0,12)	11,98 (0,14)	11,87 (0,10)	11,92 (0,11)	11,96 (0,08)	12,03 (0,12)	11,99 (0,03)	11,80 (0,10)	11,91 (0,17)	12,39 (1,02)	
ESD (g/100g)	8,93 (0,05)	8,90 (0,07)	8,87 (0,04)	8,88 (0,05)	8,83 (0,07)	8,93 (0,04)	8,91 (0,05)	8,85 (0,07)	8,84 (0,03)	8,77 (0,16)	
CCS (x1000/mL)	45,00 (32,4)	41,17 (13,6)	37,5 (36,8)	41,67 (18,6)	24,0 (29,1)	29,17 (15,8)	44,83 (15,2)	34,30 (37,4)	33,30 (33,5)	21,50 (23,1)	

INDÚSTRIA B											
Temperaturas de Estocagem		20°C					30°C				
Análise valores médios (DP)	0	30	Dias de estocagem			120	0	30	60	90	120
			60	90	120						
Densidade 15°C (g/mL)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,031 (0,00)	1,031 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	1,032 (0,00)	
Índice Crioscópico (°H)	0,536 (0,00)	0,539 (0,00)	0,540 (0,00)	0,544 (0,00)	0,538 (0,00)	0,537 (0,00)	0,538 (0,00)	0,540 (0,00)	0,545 (0,01)	0,540 (0,00)	
Acidez Dornic (°D)	15,12 (1,16)	15,97 (1,21)	16,93 (0,76)	16,75 (0,52)	17,37 (0,38)	15,65 (0,45)	16,07 (1,22)	17,10 (0,80)	16,83 (0,63)	17,87 (0,45)	
Matéria gorda (g/100g)	3,11 (0,09)	3,07 (0,08)	3,00 (0,10)	3,03 (0,08)	3,13 (0,11)	3,16 (0,04)	3,14 (0,17)	3,04 (0,09)	3,15 (0,05)	3,12 (0,04)	
Lipólise (μ equivalente/ml)	0,184 (0,01)	0,226 (0,03)	0,236 (0,01)	0,250 (0,22)	0,380 (0,17)	0,200 (0,02)	0,239 (0,03)	0,260 (0,04)	0,245 (0,02)	0,351 (0,05)	

(continuação)

INDÚSTRIA B										
Temperaturas de Estocagem	20°C					30°C				
	Dias de estocagem					estocagem				
Análise valores médios (DP)	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Lactose (g/100g)	4,56 (0,02)	4,58 (0,03)	4,58 (0,03)	4,58 (0,03)	4,52 (0,05)	4,51 (0,04)	4,49 (0,04)	4,51 (0,04)	4,49 (0,04)	4,39 (0,04)
ST (g/100g)	12,05 (0,12)	11,98 (0,14)	11,87 (0,10)	11,92 (0,11)	11,97 (0,08)	12,02 (0,10)	11,91 (0,09)	11,81 (0,09)	11,92 (0,09)	11,83 (0,07)
ESD (g/100g)	8,93 (0,05)	8,90 (0,07)	8,87 (0,04)	8,88 (0,05)	8,83 (0,07)	8,86 (0,07)	8,76 (0,11)	8,77 (0,05)	8,78 (0,04)	8,70 (0,04)
CCS (x1000/mL)	45,00 (32,4)	41,17 (13,6)	37,50 (36,8)	41,67 (18,6)	24,00 (29,1)	50,00 (71,5)	58,17 (21,5)	38,20 (30,3)	39,33 (21,2)	7,33 (6,78)

DP- Desvio Padrão

Houve aumento gradativo da acidez do leite durante os dias de estocagem, sendo esse aumento significativo ($p < 0,05$) durante os períodos de 60, 90 e 120 dias, porém ainda dentro valores permitidos pela legislação (14 a 18°D), exceto aos 120 dias de estocagem em que 13 amostras (10,8%) apresentaram acidez maior que 18°D. Não houve associação significativa do aumento da acidez com as diferentes temperaturas e indústrias. Os resultados obtidos pela análise da acidez titulável mostram que há efeito do armazenamento nesta análise. Hassan, Amjad e Mahmood (2009) também verificaram aumento gradual da acidez em leite UAT estocado por 3 meses, e concluíram que o aumento dos ácidos graxos livres (AGL) é responsável pelo aumento da acidez total titulável do leite UAT. Da mesma forma, neste estudo os AGL tiveram aumento significativo ao longo da estocagem, e, por outro lado, as amostras analisadas não continham micro-organismos mesófilos aeróbios, que podem liberar ácido lático e influenciar no aumento da acidez, como ocorre no leite cru e pasteurizado. Costa et al. (2010) não detectaram nenhuma irregularidade na acidez de leites UAT estocado por 135 dias, embora tenham constatado aumento gradual da acidez. Real et al. (2013), analisando amostras de leite UAT integral durante os 150 dias de armazenamento também verificaram que a acidez titulável das 3 marcas se mantiveram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Já Tamanini et al. (2011) encontraram 33,33% amostras com resultados superiores ao valor máximo e nenhuma abaixo do valor mínimo de 14°D. A média dos resultados dessa análise concordaram com a alta porcentagem de amostras fora do padrão, revelando um valor de 0,183 g de ácido lático/100mL.

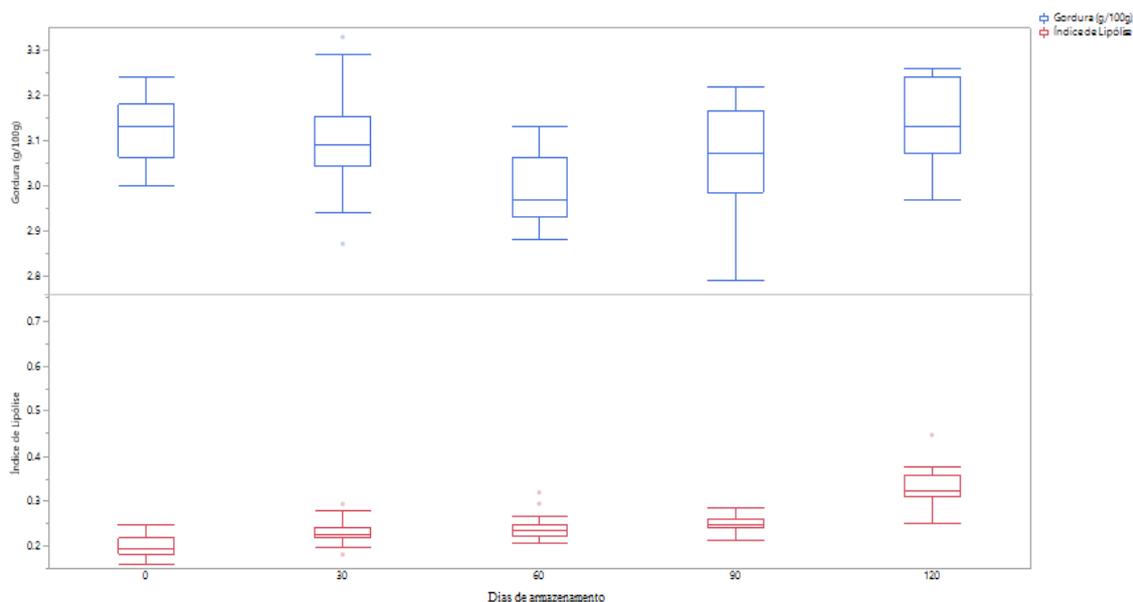
Como mostra a Tabela 1, o teor de matéria gorda diminuiu durante os dias de estocagem, sendo essa diminuição significativa ($p < 0,05$) durante os períodos de 60 e 90 dias, estando as médias dos valores dentro do permitido pela legislação. Porém, 25 amostras (20,8%) apresentaram teor de matéria gorda inferior ao mínimo de 3% durante a estocagem. A diminuição do teor de gordura parece ter relação com o aumento significativo dos AGL decorrentes da lipólise. O que condiz com os resultados de Santos, Okura e Rensis (2007) que verificaram uma diminuição no teor de gordura a partir do segundo mês de estocagem de leite UAT, armazenado por 150 dias em temperatura ambiente. O teor inicial de 3,1% decresceu até 2,4% ao final do experimento. Os

autores sugerem como causa a lipólise por enzimas lipolíticas termorresistentes durante o longo período de estocagem, provenientes das altas contagens de bactérias psicrotróficas verificadas no leite cru. Hassan, Amjad e Mahmood (2009) também constataram essa diminuição de gordura ao longo da estocagem do leite UAT, e apresentaram a mesma justificativa, além de afirmarem que essas enzimas são o principal fator de deterioração do leite armazenado. Real *et al.* (2013) encontraram 83,3% das amostras com gordura abaixo de 3% ao longo dos 150 dias de estocagem.

No entanto, outros autores encontraram todas as amostras de leite UAT pesquisadas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para a porcentagem de gordura como Souza *et al.* (2004), Bernardi *et al.* (2006), Martins *et al.* (2008), Souza *et al.* (2010) e Robim (2011).

Em associação aos baixos teores de gordura, o índice de lipólise, o qual é dado pelo teor de AGL em μ equivalente/mL de leite, teve aumento significativo ($p < 0,05$) durante os dias de estocagem (Figura 2). Não houve efeito significativo de temperaturas e indústrias. A lipólise do leite acontece devido a ação de enzimas lipolíticas termorresistentes, produzidas principalmente por microorganismos psicrotróficos no leite cru refrigerado, que hidrolisam os triglicérides do leite e liberam ácidos graxos livres. Essas reações continuam ocorrendo durante o período de estocagem, com aumento da concentração de AGL. O que está de acordo com Deeth (2006), que afirma que a maioria das lipases produzidas por bactérias psicrotróficas são termorresistentes a tratamentos intensos como o UAT, sendo assim seus efeitos são apenas observados em leite UAT e derivados como manteiga, queijo e leite em pó após um período de armazenamento prolongado. Os produtos afetados, ou produtos fabricados a partir deles, desenvolvem odores e sabores desagradáveis. Valores de lipólise em leite integral superiores a 1,5 mmol/L são inaceitáveis para a maioria das pessoas, sendo o sabor descrito como rançoso, butírico, adstringente ou até mesmo amargo.

Figura 2 - Média dos resultados dos teores de gordura e índice de lipólise encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento.



Como o leite UAT é estocado a temperaturas mais elevadas por longos períodos de tempo, o aumento da temperatura favorece a ação das enzimas lipolíticas durante a estocagem. Assim a presença dessas enzimas termostáveis é particularmente prejudicial à qualidade desse tipo de leite (Brito; Brito, 2001).

A lactose manteve-se com média praticamente constante durante o período de estocagem e teve diminuição significativa ($p < 0,05$) apenas aos 120 dias de estocagem (Tabela 1). As temperaturas de estocagem e indústria de origem tiveram influência considerável ($p < 0,05$) nos resultados, sendo que a 30°C houve uma diminuição média de 0,044g/100g de lactose comparado a temperatura de 20°C, e procedência da indústria B correspondia a uma diminuição de 0,041g/100g de lactose. A diminuição da lactose possivelmente está atrelada a ocorrência da reação de Maillard. A reação de Maillard é representada por uma complexa cascata de reações, que ocorre, principalmente, durante o aquecimento do leite e armazenamento prolongado resultando em modificações em sua qualidade, favorecendo a formação de compostos responsáveis pelo aroma, sabor e cor característicos do leite UAT. A reação de Maillard pode ser afetada por diversos fatores, sendo a temperatura um dos principais. A velocidade desta reação é lenta a temperaturas mais baixas e praticamente duplica a cada aumento de 10°C. A extensão da reação de Maillard pode ser monitorada pelo surgimento de compostos como a furosina, o hidroximetilfurfural e a carboximetilisina (Francisquini *et al.*, 2017). Cortez *et al.* (2010) e Tamanini *et al.* (2011) encontraram médias menores em relação às encontradas neste trabalho para o teor de lactose em leite UAT, 4,35% e 4,05%, respectivamente. Já Tamanini (2012) analisando 30 amostras de leite UAT comercializadas em Londrina encontrou médias maiores variando de 4,40 a 4,70% e explicou que a baixa concentração de lactose, bem como quantidades superiores a 4,7% indicam amostras anormais, diluídas quando em baixa concentração ou reconstituídas com sacarose quando apresentam alta concentração de lactose, já que a metodologia de detecção por infravermelho não diferencia lactose e sacarose, nem exclui a lactulose produzida no leite UAT. Isto porque estes equipamentos não aferem a lactose diretamente, apenas estimam sua quantidade a partir da aferição de gordura, proteína e a quantidade de sólidos totais. Mesmos nos equipamentos mais modernos de infravermelho a detecção de lactose ocorre em comprimentos de onda sobrepostos ao de outros açúcares.

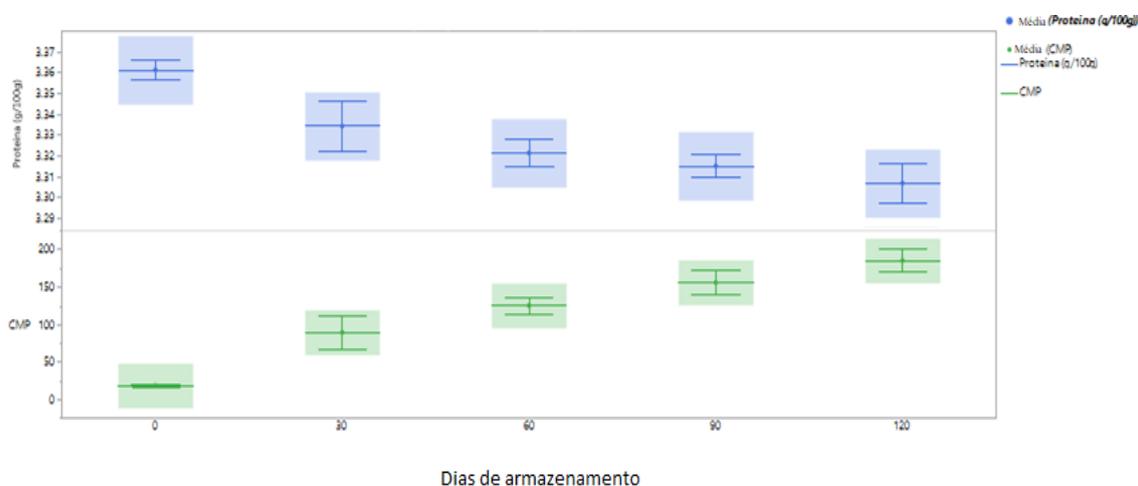
Em relação a ST e ESD houve diminuição gradativa e significativa ($p < 0,05$) ao longo do período de estocagem (Tabela 1). Além disso mostraram associação significativa ($p < 0,05$) com as diferentes temperaturas. ST tiveram uma diminuição significativa com o aumento de temperatura, sendo que a 30°C houve uma diminuição média de 0,035g/100g comparado a temperatura de 20°C, enquanto ESD teve diminuição de 0,062g/100g a 30°C quando comparado a temperatura de 20°C. Quanto as diferentes indústrias, apenas ESD apresentou associação significativa ($p < 0,05$), sendo que amostras da indústria B resultaram em diminuição de 0,048g/100g de ESD quando comparado aos leites da indústria A. Os termos sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) englobam todos os componentes do leite exceto a água. Por sólidos não-gordurosos (SNG) ou extrato seco desengordurado (ESD) compreendem-se todos os elementos do leite, menos a água e a gordura. Assim, a diminuição desses parâmetros está diretamente ligada a diminuição de seus principais componentes, proteína e gordura, decorrente da proteólise e lipólise que ocorrem durante todo o período de estocagem. Costa (2010) ao analisar sete marcas de leite UAT durante 135 dias de estocagem também verificou diminuição progressiva do teor de ST e ESD durante todo o período de estocagem, sendo que aos 135 dias 86% das amostras estavam abaixo do padrão para ST e ESD. Tamanini (2012) ao analisar 30 amostras de leite UAT encontrou apenas uma

amostra apresentando ESD abaixo do padrão (8,4g/100g). Tamanini *et al.* (2011) ao analisarem 33 amostras de leite UAT concluíram que os leites integrais analisados estavam todos de acordo com o padrão, com média igual a 8,42%. Já Bersot *et al.* (2010) descreveram resultados bastante distintos em relação aos ESD, pois 50,7% de suas amostras apresentavam valores menores do que o padrão. Camara *et al.* (2014) ao analisarem cinco diferentes marcas de leite UAT integral encontraram valores de ST variando entre 11,59 a 12,13%, estando todas as amostras dentro do padrão, assim como para ESD com exceção de duas amostras que apresentaram valores iguais a 8,22 g/100g.

Não foram observadas alterações significativas na Contagem de Células Somáticas (CCS) durante o período de estocagem, nem quanto as diferentes temperaturas e indústrias. Tamanini (2012) encontrou CCS média de 13.733 células/mL em 30 amostras de leite UAT. Bernardi *et al.* (2006) e Souza *et al.* (2004) também encontraram baixas contagens de CCS no leite UAT. Segundo Souza *et al.* (2004), que encontraram média de CCS variando entre 59.000 e 78.000 células/mL, esta baixa contagem se deve, provavelmente, ao processo tecnológico de produção do leite UAT que destrói parte das células, e também está atrelada ao processo de clarificação/padronização que utiliza equipamentos centrifugadores que retiram do leite as impurezas, devido as densidades específicas dos componentes serem superiores aos dos constituintes do leite. Os sólidos contidos nas impurezas separadas pelas centrífugas clarificadoras/padronizadoras são formados por partículas de sujidades, componentes sanguíneos, além de outras substâncias, principalmente do tipo protéico, o que justifica a baixa contagem de CCS no leite. As impurezas retiradas do leite pelas centrífugas também contêm um elevado número de micro-organismos. Portanto, essa análise de CCS não reflete a qualidade do leite UAT quanto a sua origem.

A média dos teores de proteína total, caseína e índice de CMP encontrados nas 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B) estão contidas na Tabela 2. Como pode ser observado na Figura 3, a concentração de proteína total diminuiu progressivamente ao longo da estocagem, sendo essa diminuição significativa ($p < 0,05$) estatisticamente durante todo o período de estocagem, bem como houve elevação progressiva significativa do CMP.

Figura 3 – Média dos resultados dos teores de proteína e CMP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento.



Já a concentração de caseína não teve alterações significativas ($p>0,05$). Essas alterações podem ser explicadas pela proteólise do leite. A presença e aumento na concentração de CMP no leite pode indicar a sua deterioração, causada pela ação de enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas por microrganismos psicrotróficos durante a estocagem do leite cru refrigerado. A forma de estocagem, temperatura de refrigeração e o tempo de armazenamento do leite podem influenciar no grau dessa ação proteolítica (Friedrich *et al.*, 2010).

Tabela 2 – Média dos teores de Proteína Total, Caseína e Índice de CMP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B).

INDÚSTRIA A										
Temperaturas de Estocagem	20°C					30°C				
	Dias de estocagem					Dias de estocagem				
Análise valores médios (DP)	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Proteína Total (%)	3,30 (0,07)	3,23 (0,03)	3,19 (0,00)	3,21 (0,05)	3,15 (0,06)	3,24 (0,14)	3,23 (0,04)	3,177 (0,04)	3,218 (0,03)	3,115 (0,09)
Caseína (%)	2,59 (0,02)	2,56 (0,06)	2,58 (0,05)	2,61 (0,02)	2,55 (0,04)	2,58 (0,01)	2,57 (0,05)	2,59 (0,04)	2,58 (0,03)	2,51 (0,08)
CMP (mg/L)	18,7 (7,73)	39,1 (10,59)	99,6 (25,60)	104,0 (14,60)	146,9 (56,80)	22,5 (10,22)	62,5 (22,14)	141,8 (33,20)	143,9 (46,40)	210,8 (71,40)

INDÚSTRIA						B				
Temperaturas de Estocagem						30°C				
Análise valores médios (DP)	20°C					estocagem				
	0	30	60	Dias de 90	120	0	30	60	90	120
Proteína Total (%)	3,25 (0,07)	3,18 (0,030)	3,16 (0,06)	3,08 (0,12)	3,18 (0,07)	3,23 (0,07)	3,19 (0,03)	3,19 (0,04)	3,17 (0,07)	3,17 (0,061)
Caseína (%)	2,59 (0,02)	2,56 (0,06)	2,58 (0,05)	2,61 (0,02)	2,55 (0,04)	2,55 (0,04)	2,52 (0,03)	2,56 (0,02)	2,66 (0,02)	2,623 (0,12)
CMP (mg/L)	19,1 (7,05)	161,2 (21,30)	106,5 (48,50)	138,7 (28,70)	158,3 (53,40)	14,1 (8,32)	96,4 (41,20)	154,7 (85,30)	239,5 (11,30)	227,4 (88,40)

DP- Desvio Padrão

O MAPA, por meio da IN nº 69 de 13 de dezembro de 2006, estabelece os seguintes critérios para a interpretação dos valores referentes ao índice de CMP encontrados nas análises: somente quando o índice de CMP for de até 30 mg L⁻¹, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 mg L⁻¹ e 75 mg L⁻¹, este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos. Os derivados lácteos serão avaliados tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Por último, quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg L⁻¹, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo DIPOA (Brasil, 2006b).

Todas as amostras apresentaram índice de CMP menor que 30mg/L no primeiro dia de análise, correspondente ao dia 0 de estocagem, estando de acordo com o exigido pela legislação. Concluiu-se que as amostras não estavam fraudadas por soro de queijo e, sendo assim, o aumento de CMP ao longo da estocagem estaria diretamente ligado a proteólise. Aos 30 dias de estocagem 87% das amostras analisadas obtiveram CMP maior que 30 mg/L e, se for comparado ao valor da legislação, que não é específica para leite UAT, não estariam aptas ao consumo humano direto, 37% destas amostras apresentaram CMP maior que 75mg/L e na condição de utilização análoga desta legislação deveriam ser destinadas a alimentação animal. Aos 60 dias de estocagem 87% das amostras analisadas apresentaram CMP maior que 75mg/L. Aos 90 dias 96% das amostras já apresentavam CMP maior que 75mg/L e aos 120 dias, considerado o período máximo de estocagem previsto deste leite UAT, todas amostras já estavam em desacordo com o padrão estabelecido para CMP. Essa análise mostrou ser um ótimo parâmetro de qualidade do leite, pois detectou alterações relacionadas a sua degradação durante todo o período, sendo uma ótima análise quantitativa e qualitativa da qualidade desse leite.

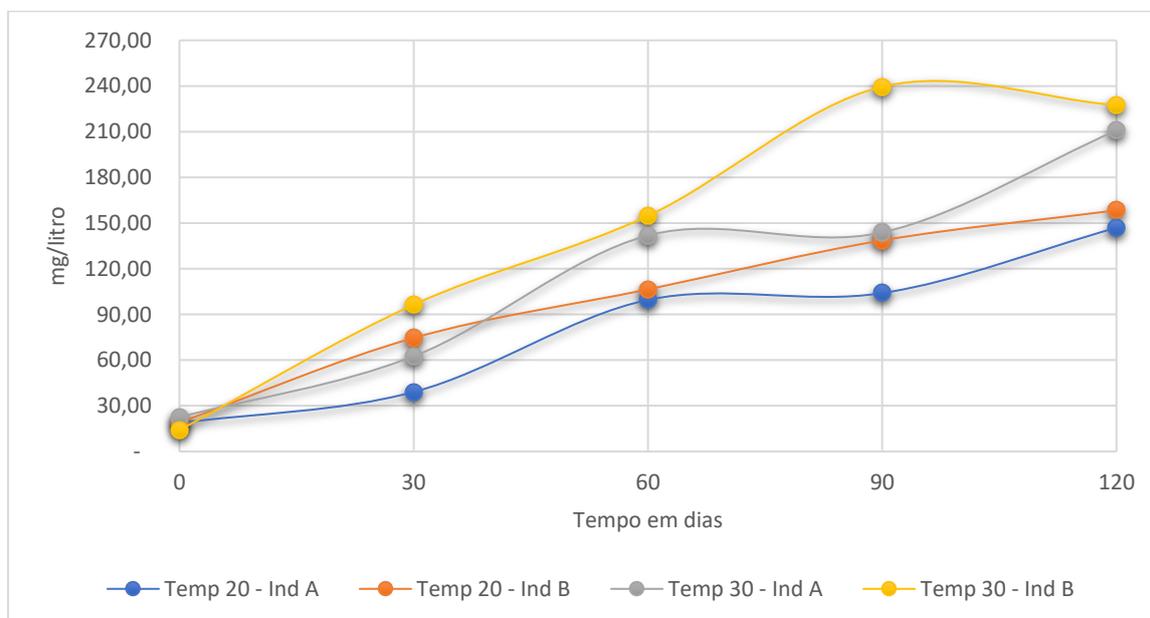
Considerando o período de validade do leite UAT de 120 dias, a qualidade do leite deve ser mantida durante todo esse período como garantia de sua inocuidade e integridade. Para minimizar essas alterações, o ideal seria minimizar a contaminação de micro-organismos psicrotóxicos no leite cru, responsáveis pela produção das enzimas proteolíticas termoestáveis. Cuidados no

transporte e armazenamento a temperatura baixa, mas sem congelamento, podem minimizar a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos no leite cru, pois acima de 7°C até temperaturas na faixa dos 20 a 30°C favorecem a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos. Outra medida seria controlar a temperatura de estocagem do leite UAT, pois temperaturas altas favorecem a atividade enzimática, chegando próximo a sua temperatura ótima de ação.

Friedrich *et al.* (2010) apresentaram resultados das análises feitas em leite UAT estocado por 49 dias, mostrando que o leite UAT apresentava, no dia em que foi processado, um índice de CMP de 15,15 mg/L. Após o quarto dia, a concentração de CMP era de aproximadamente 45,0 mg/L, aumentando progressivamente ao longo dos dias. Os autores concluíram que, mesmo com o processo de UAT, há ocorrência de proteólise no leite durante todo o tempo de vida de prateleira, devido a ação de proteinases estáveis ao calor que continuam ativas após o processamento térmico ainda que as bactérias produtoras dessas enzimas sejam destruídas. Segundo Fox (1992), sua desnaturação térmica só seria possível em tratamentos tão altos quanto 142° C durante 18 segundos ou 120°C durante 15 minutos. Porém, tratamentos como esses afetariam negativamente as características sensoriais e físico-químicas do leite UAT.

Também foi constatada associação significativa ($p < 0,05$) do aumento do CMP com as diferentes temperaturas e indústrias, como mostra a Figura 4, sendo que a 30°C houve um aumento médio de 31,9 mg/L comparado a temperatura de 20°C, e ser da indústria B implicou em um aumento de 32,8 mg/L quando comparado a indústria A. Villanoeva *et al.* (2014) encontrou resultados parecidos observando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as três temperaturas de armazenamento (21°C, 6°C e -12°C) após 60 dias de estocagem, concluindo que ocorria concentrações de CMP mais elevadas com o aumento das temperaturas de armazenamento.

Figura 4: Índice de CMP médio (mg/L) de 120 amostras de leite UAT estocadas ao longo de 120 dias de armazenamento em relação as temperaturas de estocagem e indústrias (A e B).



Quanto a presença de micro-organismos, não foram encontrados mesófilos aeróbios durante todo o período de estocagem (Tabela 3). O RTIQ de leite UAT exige que o leite tenha no máximo 100 UFC de aeróbios mesófilos/mL (Brasil, 1997), estando, portanto, todas as amostras dentro do padrão. A CPP está relacionada a contagem de micro-organismos viáveis e inviáveis, o que explica os números encontrados.

Tabela 3- Média dos resultados de mesófilos aeróbios e CPP encontrados em 120 amostras de leite UAT de 12 lotes diferentes, ao longo de 120 dias de armazenamento em duas temperaturas de estocagem (20°C/30°C) provenientes de duas indústrias (A/B).

INDÚSTRIA A										
Temperaturas de Estocagem		20°C					30°C			
Análise valores médios (DP)	0	30	60	Dias de estocagem		0	30	60	90	120
				90	120					
Mesófilos aeróbios	6,67 (16,33)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
CPP (UFC x1000/mL)	177 (70)	61 (30)	34 (18)	26 (16)	22 (8)	179 (76)	58 (16)	32 (10)	26 (12)	11 (7)

INDÚSTRIA B										
Temperaturas de Estocagem		20°C					30°C			
Análise valores médios (DP)	0	30	60	Dias de estocagem		0	30	60	90	120
				90	120					
Mesófilos aeróbios	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
CPP (UFC x1000/mL)	178 (70)	61 (30)	34 (18)	26 (16)	22 (8)	164 (46)	19 (12)	11 (4)	6 (4)	3 (3)

DP- Desvio Padrão

Costa (2010) assim como Rossi Júnior *et al.* (2006), também encontrou contagens baixas de mesófilos aeróbios apresentando números entre 1 a 10 UFC/mL no leite UAT. Concluíram que o tratamento térmico aplicado ao leite UAT é capaz de reduzir, mas não de eliminar a carga microbiana encontrada no leite cru, sendo que a quantidade de micro-organismos encontrada é reflexo da qualidade do leite cru, já que o processamento UAT é capaz de eliminar 99% dos micro-organismos, mas não de esterilizar o leite. Já Tamanini *et al.* (2011) encontraram 21,21% de 33 amostras apresentando valores superiores ao estabelecido.

Nas análises de neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade, conservantes do leite e resíduos de antibióticos executadas não foram encontradas alterações nas 120 amostras de leite pesquisadas, o que demonstra que não ocorreram fraudes detectáveis antes e durante o processo

de produção do leite UAT. Essas análises são importantes em vista da preocupação da população com a integridade do produto, que deve ser isento de substâncias estranhas conforme preconiza a legislação (Brasil, 2017). Por outro lado, Souza *et al.* (2011) pesquisando a presença de conservantes em 100 amostras de leites UAT produzidos em 6 estados brasileiros detectaram a presença de formaldeído em 44,0% das amostras, seguido de peróxido de hidrogênio em 30,0% e cloro em 12,0% das amostras. A adição de conservantes é proibida (Brasil, 2017), e acaba sendo realizada com a finalidade de mascarar a qualidade higiênico sanitária do leite e visando aumentar a vida útil do produto. Tamanini (2012) não encontrou resíduos de antibióticos ao analisar 30 amostras de leite UAT, assim como Robim (2011) e Becker *et al* (2010). Já Ferreira *et al.* (2011) constataram a presença de resíduos de antibióticos em 12 (5,4%) de 224 amostras de leite UAT analisados do estado de Goiás. A presença de antibióticos, mesmo em concentrações residuais, pode causar problemas de saúde aos consumidores, isso porque dentre os riscos estão a seleção de cepas bacterianas resistentes, desequilíbrio da microbiota intestinal, efeitos teratogênicos e reações de hipersensibilidade.

6. CONCLUSÕES

O armazenamento do leite UAT durante 120 dias de estocagem, sob condições laboratoriais, resultou em alterações significativas na sua qualidade físico-química ao longo da estocagem, consequentemente levando a perda de qualidade gradativa durante sua vida de prateleira. Por outro lado, quanto a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios não foram encontradas alterações durante toda a estocagem. Foi constatada diminuição gradativa de proteína e gordura associadas ao aumento de CMP e índice de lipólise, respectivamente, assim como o aumento na acidez, que comprovam a ocorrência de proteólise e lipólise ao longo do armazenamento do leite, resultante da ação de enzimas termorresistentes ativas no leite UAT.

As diferentes temperaturas e indústrias causaram alterações consideráveis nos parâmetros de índice crioscópico, lactose, ST, ESD e CMP; mostrando que o aumento da temperatura de armazenamento pode intensificar as alterações que ocorrem no leite, assim como a qualidade da matéria-prima e do processamento quanto ao lugar de origem (indústria) vai acompanhar suas características durante todo o período de estocagem. O índice de CMP é um ótimo parâmetro para quantificar a degradação em leite UAT, podendo ser usado como índice de qualidade, sofrendo influência considerável do tempo de armazenamento, temperaturas de estocagem, e origem do leite (indústrias). O RTIQ do leite UAT contém poucos parâmetros para avaliação do leite e vários outros parâmetros podem ajudar na averiguação da qualidade desse leite e podem ser avaliados para futuras inserções na legislação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO LEITE LONGA VIDA (ABLV). **ABLV aponta crescimento do setor leiteiro.** 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/ablv-aponta-crescimento-do-setor-leiteiro/>>. Acesso em: 26 de Agosto de 2017.

BECKER, T. A.; NEGRELO, I. F.; RACOLTE, F. DRUNKLER, D. A. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados

na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguaçu – Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, p.707-716, jul./set. 2010.

BELOTI, V.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R. et al. Alterações do ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante citrato de sódio. In: TAMANINI, R.; BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; SILVA, L. C. C. et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Set/Out, n. 382, v. 66, p. 27-33, 2011.

BERNARDI, C. M. M; GUERRA, C. R. S. B.; DOS SANTOS, F. D.; TORRES, A. P. C.; GARCIA, J. L.; CRUZ, J. C. A.; TEIXEIRA, M. V. S.; PEREIRA, R. S. Teste comparativo da qualidade do leite integral comercializado no município de Andradina. **Revista Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v.6, p.45-48, jan./dez. 2006.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química dos leites UHT produzidos no Estado do Paraná, Brasil. **Sêmima Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 645-652, Londrina, julho/setembro de 2010.

BRASIL. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui Critério de Avaliação da Qualidade do Leite in natura, Concentrado e em Pó, Reconstituídos, com base no Método Analítico Oficial Físico-Químico denominado “Índice CMP”, de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez. 2006b, Seção 1, Página 67, 2006a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 370 de 04/09/1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Dos padrões de Identidade e Qualidade de Leite e Derivados. **Diário Oficial da União Federativa do Brasil**. C.5, seção 1, 2 e 3. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Microbiológicos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de origem Animal e Água. **Diário Oficial da União Federativa do Brasil**, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam

utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006. (a)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP” de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 15 de dezembro de 2006. (b)

BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. MINAS LEITE. 2., 2000, Juiz de Fora. **Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira: anais**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p. 83-94.

BURTON, H. (1988). **Ultra-high-temperature processing of milk and milk products**. London ; New York : Elsevier Applied Science, 354p.

CAMARA, F. A.; WESCHENFELDER, S. Leite UHT Integral: Avaliação da rotulagem nutricional e dos padrões de identidade e qualidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 4, p. 268-279, jul./ago., 2014.

COSTA, A. M. C. **Avaliação de características físico-químicas de leites UAT produzido no estado de Goiás ao longo da estocagem**. 2010. 56f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- UFG, Goiás.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age Gelation of UHT Milk—A Review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 4, p. 197–210, 2001.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C. H.; WOOD, A. F. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 30, p. 109-111, 1975.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 555-562, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Agência de Informação Embrapa - Agronegócio do Leite**. 2019. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_196_21720039246.html>. Acesso em: 10 de Março de 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT Database, 2017. Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 24 dez. 2018.

FERREIRA, P.; NICOLAU, E.S.; SANTOS, T.; SOARES, R. S. Qualidade do Leite Produzido no Estado de Goiás: Ocorrência de Resíduos de Antimicrobianos. In Reunião anual da SBPC, 63°, 2011, Goiânia. **Anais eletrônicos...** Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pibic/trabalhos/Priscylla%20Paulina%0Ferreira-PIBIC.pdf>> Acesso em 20 de set. 2012

FONSECA, L. F. L. & SANTOS, M. V. **Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314p.

FOSS ANALYTICS Database, 2018. Disponível em <<https://www.fossanalytics.com/pt-br/products/bactoscan>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

FOX, P.F. Indigenous enzymes in milk. In: SWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry: Proteins**, cap.2, 1. ed. London: Blakien Academic e Professional, p.310-320, 1992.

FRANCISQUINI, J. A.; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F.; SCHUCK, P.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Reação De Maillard: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 1, p. 48-57, jan/mar, 2017.

FRIEDRICH, M. T.; FRANKEN, R. B. C.; AZEVEDO, M. S. et al. Avaliação da estabilidade do leite “in natura” e UHT quanto ao índice de CMP. **Revista Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo**, Passo Fundo, v. 2, n. 1, p. 21-27, 2010.

GUEDES NETO, L. G.; AGUIAR, E. G.; KRATKA, F. C. et al. Influência do tratamento UAT no valor nutritivo do leite. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 12, n. 67, p. 36-39, 2002.

HA, J. K.; LINDSAY, R. C. Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavors. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1241-1247, 1991.

HASSAN, A.; AMJAD, I.; MAHMOOD, S. Microbiological and physicochemical analysis of different UHT milks available in market. **African Journal of Food Science**. v. 3, n. 4, p. 100- 106, 2009.

LOBATO, P. R. **Pesquisa da adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais: Determinação de CMP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e comparação dos métodos imunoquímicos**

(**STICK cGMP e BRW ELISA**). Tese (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, 49 p., 2014.

MALMGREN, B.; ARDÖ, Y.; LANGTON, M. et al. Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 60-75, 2017.

MANNION, D. T.; FUREY, A.; KILCAWLEY, K. N. Free fatty acids quantification in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 1, p. 209- 220, 2015.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M. et al. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 295-298, abr.-jun, 2008.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p. 127-144, 2004.

MELO JÚNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicrotóxicos na gelificação e sedimentação do leite UAT**. Lavras, MG, UFLA, 2005. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2005.

OANCEA, S. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 14, n. 1, p. 4146- 4151, 2009.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v.2.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 02, p. 293-300, 2004.

REAL, C.G.A.; ANTUNES, G.; SILVA, L.C.C.; COSTA, M.R.; ARAGONALEGRO, L.C.; SOUZA, C.H.B.; SANTANA, E.H.W. Avaliação da qualidade do leite UHT Integral e determinação da proteólise durante armazenamento. **Anais do Simpósio Paranaense dos Centros Mesorregionais de Excelência em Tecnologia de Leite**, Londrina, Paraná, 25 e 26 de Junho de 2003.

RIOS, E. A.; TAMANINI, R.; PEREIRA, J. R.; YAMADA, A. K.; BELOTI, V. Alterações no ponto de congelamento do leite por adição do estabilizante fosfato de sódio. **Anais do Simpósio Paranaense dos Centros Mesorregionais de Excelência em Tecnologia de Leite**, Londrina, Paraná, 25 e 26 de Junho de 2003.

ROBIM, M. S. **Avaliação de diferentes marcas de leite UAT comercializadas no Estado do Rio de Janeiro e o efeito da fraude por aguagem na fabricação, composição e análise sensorial de iogurte.** 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; CORTEZ, A. L. L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 73, n.1, p. 27-32, 2006.

SANTOS, M. G.; OKURA, M. H.; RENSIS, C. M. V. B. Avaliação da qualidade do leite UHT durante sua vida de prateleira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 357, p. 141-147, 2007.

SILVA, P. A.; SILVA, J. C.; COELHO, P. O.; SOUZA JÚNIOR, E. Qualidade do leite UHT comercializado em Campos Gerais, MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 415-423, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (SBAN). **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional Brasileiro.** 2015. Disponível em: <http://sban.cloudpanel.com.br/source/SBAN_Importancia-do-consumo-de-leite.pdf>. Acesso em: 27 de Fevereiro de 2019.

SOUZA, L. G.; DOS SANTOS, G. T.; SAKAGUTI, E. S.; DAMASCENO, J. C.; MATSUSHITA, M.; HORST, J. A.; VILLALBA, R. G. Avaliação da composição do leite UHT proveniente de dois laticínios das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v.26, n.2, p.259-264, abril/jul. 2004.

SOUZA, A. H. P.; KATSUDA, M. K.; DIAS, L. F. Avaliação físico-química do leite UHT e pasteurizado comercializado na cidade de Londrina – PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v.1, n.1, p.39-42, jan./jun., 2010.

TAMANINI, R. **Controle De Qualidade Do Leite UHT.** 2012. 130f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- UEL, Londrina.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C. et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Set/Out, n. 382, v. 66, p. 27-33, 2011.

VESCONSI, C. N.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v.42, n.4, abr, p.730-736, 2012.

VIDAL-MARTINS, A.M.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; B. PENNA, A. L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

VILLANOEVA, C.N.B.C.; ANDRADE, E.H.P.; BAFFA JUNIOR, J.C. et al. Caseinomacropéptide index in UHT whole milk stored under different conditions of temperature and time. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte , v. 66, n. 1, p. 289-296, Feb. 2014 .