

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Mestrado em Ciência Animal**

Raissa Macaron Longo

**EFEITO DA LIPÓLISE NA MENSURAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA E  
PROTEÍNA DO LEITE PELOS MÉTODOS DE ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO POR FILTRO E TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Belo Horizonte  
2016

Raissa Macaron Longo

**EFEITO DA LIPÓLISE NA MENSURAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA E  
PROTEÍNA DO LEITE PELOS MÉTODOS DE ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO POR FILTRO E TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte  
2016

L856e Longo, Raissa Macaron, 1988-  
Efeito da lipólise na mensuração dos teores de gordura e proteína do leite pelos métodos de espectroscopia no infravermelho por filtro e transformada de fourier (ftir) / Raissa Macaron Longo.- 2016.  
64 f. il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Medicina Veterinária.  
Bibliografia F. 52 – 64.

1. Leite - Qualidade - Teses – 2. Leite – Análise - Teses – 3. Lipólise – Teses – 4. Espectroscopia de infravermelho – Teses - I. Fonseca, Leorges Moraes da - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO **RAISSA MACARON LONGO**

Às 10:00 horas do dia 21 de Março de 2016, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 17/03/2016, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

EFEITO DA LIPÓLISE NA MENSURAÇÃO DOS TEORES DE GORDURA E PROTEÍNA DO LEITE PELOS MÉTODOS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR FILTRO E TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal**.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Prof. Leorges Moraes da Fonseca**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovado	Reprovado
Prof. Leorges Moraes da Fonseca	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Profª. Mônica de Oliveira Leite	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Luiz Ronaldo de Abreu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado

Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 07 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de Março de 2016.

Assinatura dos membros da banca:

*Leorges Moraes da Fonseca* \_\_\_\_\_ *Mônica de Oliveira Leite* \_\_\_\_\_  
*Ronaldo de Abreu* \_\_\_\_\_

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

**(Este documento não deverá conter rasuras e não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)**



## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por ter me iluminado durante todo esse caminho.

Á minha família pelo incentivo, motivação e amor. Ao meu pai Alexandre por ser meu exemplo de esforço e dedicação nos estudos. Á minha mãe Simone por me ensinar a nunca desistir e sempre correr atrás dos nossos sonhos, por ser meu exemplo de força e determinação, pela paciência e ajuda diária durante esses anos de estudo. Á minha querida irmã Juliana pela amizade, pelos conselhos, risadas e pelos ótimos momentos de descontração. Aos meus queridos e amados Costelinha e Zé por trazerem alegria aos meus dias, companheirismo e amor incondicional.

Ao professor Dr. Leorges Moraes da Fonseca pela orientação durante o mestrado, por todos os ensinamentos transmitidos durante a graduação e pós-graduação, pela paciência e amizade durante esses anos, pelo crescimento profissional e pessoal.

À família Guerra Alves por me acolherem como membro da família. Em especial ao Guilherme Guerra Alves por todo amor, carinho, atenção, paciência e ajuda que foram essenciais durante o mestrado e os anos de convivência.

Á todos os professores do DTIPOA por todos os ensinamentos transmitidos, sempre com carinho e boa vontade.

Aos professores Dra. Mônica Leite, Dra.Sandra Maria Pinto, Dr. Luiz Ronaldo de Abreu e Dr. Marcelo Rezende pela disponibilidade.

À todos os funcionários do LabUFMG por me ajudarem em todas as etapas do experimento. Em especial as queridas Rose, Débora, Raquel, Taynara e Márcia e aos queridos Márcio e Wendel pela ajuda essencial nas análises, pelos momentos de descontração e por todo carinho e paciência durante os meses de experimento.

Aos funcionários do DTIPOA, em especial ao Marco Antônio e Maura pela ajuda.

Aos funcionários da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa por toda ajuda e boa vontade durante as coletas de leite.

Aos alunos de iniciação científica Letícia e Fernando pelo apoio e ajuda durante as análises.

Aos amigos da Vet que sempre torceram por mim e estiveram presentes em todos os momentos de alegria.

Às minhas queridas amigas Carol, Luciana, Ellen e Lídia pela torcida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.

À Escola de Veterinária e ao CNPQ pela concessão da bolsa.

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”*

Robert Coll

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da lipólise na mensuração dos componentes do leite por espectroscopia no infravermelho (IV), comparando os métodos de análise da gordura por filtro e FTIR (Fourier Transform Infrared). Além disso, avaliou-se a interferência da lipólise na leitura dos teores de proteína do leite. 10 litros de leite cru foram coletados da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa da UFMG e pasteurizado a 75°C por 30 segundos, o volume total foi homogeneizado e dividido em amostras de 40 mL contendo conservante bronopol. Foi adicionada enzima comercial de *pseudomonas fluorescens* (Sigma Aldrich®) nas amostras de leite em três concentrações (100U, 300U e 600U) e incubadas a 7°C, 20°C, 30°C e 40°C. As análises ocorreram após os tempos de incubação correspondentes a 0 (zero), 3, 6, 24, 48 e 96 horas. As amostras sem adição de enzima foram consideradas controle. Todas as amostras foram analisadas por meio da espectroscopia no IV por filtro, utilizando o equipamento Bentley® 2000 (Bentley Instruments), e por FTIR, utilizando o equipamento Combiscope® (Advanced/Delta Instruments). Foi demonstrado efeito significativo da lipólise na mensuração dos teores de gordura por espectroscopia no IV, com queda dos teores, principalmente no equipamento de espectroscopia no IV por filtro. A relação entre os teores de gordura e proteína foi inversamente proporcional. Em relação às temperaturas e os períodos de incubação, todas as amostras apresentaram alterações significativas na leitura dos teores de gordura e proteína. O efeito foi mais pronunciado nas amostras incubadas a 40°C e pelo período de 96 horas. Conclui-se que o efeito da lipólise pode ter efeito negativo significativo na leitura dos teores de gordura determinado por espectroscopia no IV. Portanto, as amostras destinadas a análise de controle leiteiro e de qualidade devem ser armazenadas sob-refrigeração e analisadas no menor tempo possível.

**Palavras-chave:** lipólise; espectroscopia no infravermelho; qualidade do leite; lipase.

## ABSTRACT

The objective was to quantify the effect of lipolysis in the measurement of fat and milk protein by IR spectroscopy, comparing the methods of analysis of filter and FTIR (Fourier Transform Infrared). Ten liters of raw milk were collected from the Experimental Farm Prof. Hélio Barbosa, UFMG. The milk has undergone pasteurization (65°C/30 seconds) and the total volume was homogenized and aliquoted into 40 ml samples containing bronopol. To promote lipolysis enzyme used was *Pseudomonas fluorescens* (Sigma Aldrich®, 20.000U/g). Aliquots of the enzyme were added in three concentrations (100U, 300U, 600U) and incubated at 7 ° C, 20 ° C, 30 ° C and 40 ° C. Samples without addition of enzyme were considered as control samples. The analyzes occurred after incubation periods of 0, 3, 6, 24, 48 and 96 hours. Samples incubated at 7° C were analyzed by the period of 168 hours. All samples were analyzed by means of IR spectroscopy by filter (Bentley® 2000) and FTIR (Combiscope®). It has been shown significant effect of milk lipolysis in the measurement of fat and protein by IR spectroscopy, with a drop in the reading of the fat content and increased reading of protein content. The different spectroscopy methods in IV showed significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) in reading the fat, but no significant statistical differences ( $p > 0.05$ ) in reading the protein. The IR spectroscopic equipment for filter showed the greatest variation reading the fat content when compared to the equipment of IR spectroscopy by FTIR. The samples incubated at 20 ° C, 30 ° C and 40 ° C were similar statistically, as well as periods of 24, 48, 96 and 168 hours. It follows that the effect of lipolysis can have a significant effect on fat content and protein determined by IR spectroscopy. The storage temperature and the period between the collection and analysis are essential to preserve the quality of milk samples for analysis.

**Keywords:** lipolysis; infrared spectroscopy; milk quality; lipase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ranking e avaliação anual do volume de leite cru adquirido pelos laticínios – Unidades da federação- 2º Semestres de 2014 e 2015 .....	14
Figura 2. Estrutura do triacilglicerol .....	22
Figura 3. Catabolismo dos ácidos graxos livres .....	23
Figura 4. Hidrólise sequencial dos grupos acila do triacilglicerol catalisada por lipases .....	25
Figura 5. Classificação das lipases baseadas na sua especificidade .....	26
Figura 6. Esquema ilustrativo do interferômetro de Michelson .....	36
Figura 7. Esquema fatorial 3x4x7x2 das amostras com adição de enzimas .....	39
Figura 8. Ordem de leitura das amostras em cada período .....	40
Figura 9. Efeito da concentração de lipase e período de incubação sobre as médias de gordura captadas pelos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR.....	42
Figura 10. Efeito da concentração de lipase e período de incubação sobre as médias de proteína captadas pelos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR .....	44
Figura 11. Efeitos da interação entre as concentrações de lipase, equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR e temperaturas de incubação sobre a leitura das médias do teor de gordura ao longo do tempo .....	49
Figura 12. Efeitos da interação entre as concentrações de lipase, equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR e diferentes temperaturas de incubação sobre a leitura das médias do teor de proteína ao longo do tempo .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades das enzimas lipolíticas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	31
Tabela 2. Regiões espectrais do infravermelho .....	34
Tabela 3. Interações do tempo e concentração de lipase na leitura das médias do teor de gordura pelos equipamentos de IV baseados em filtros e FTIR .....	41
Tabela 4. Efeito da concentração da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a leitura das médias do teor de gordura nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR.....	42
Tabela 5. Efeito do tempo de incubação sobre a leitura das médias do teor de gordura nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR .....	42
Tabela 6. Interações do tempo e concentração de lipase na leitura das médias do teor de proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR .....	43
Tabela 7: Efeito da concentração da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sobre a leitura das médias do teor de proteína nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR .....	44
Tabela 8: Efeito do tempo de incubação sobre a leitura das médias do teor de gordura nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR .....	44
Tabela 9: Efeito da temperatura de incubação sobre a leitura das médias dos teores de gordura e proteína nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR .....	45

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Requisitos microbiológicos e de CCS a serem avaliados pela RBQL .....	16
Quadro 2. Valores pagos pelo programa de pagamento por qualidade para bonificação e penalização da empresa DPA .....	19
Quadro 3. Comparação das características da lipoproteína do leite (LPL) e das lipases produzidas por bactérias psicrófilas .....	28

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Geral .....	13
2.2 Específicos .....	13
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
3.1 Características da produção, armazenamento e beneficiamento do leite no Brasil. 13	
3.1.1 Produção de leite no Brasil .....	13
3.1.2 Qualidade do leite .....	15
3.1.2.1 Contagem de Células Somáticas .....	16
3.1.2.2 Contagem Bacteriana Total .....	16
3.1.2.3 Composição centesimal do leite .....	17
3.1.3 Pagamento por qualidade do leite .....	18
3.1.4 Armazenamento do leite .....	20
3.1.5 Bactérias psicrotróficas no leite .....	20
3.1.5.1 <i>Pseudomonas</i> sp. ....	21
3.2 Lipólise no leite .....	21
3.2.1 Características da gordura do leite .....	22
3.2.2 Ácidos graxos livres no leite .....	23
3.2.3 Classificação das lipases .....	24
3.2.4 Lipase endógena do leite .....	26
3.2.5 Lipases bacterianas .....	27
3.2.6 Lipases relacionadas á alta contagem de células somáticas .....	28
3.2.7 Lipases comerciais .....	30
3.2.8 Lipases de <i>Pseudomonas</i> sp. ....	30
3.2.9 Alterações no leite causadas pelas lipases .....	32
3.3 Métodos analíticos da gordura do leite .....	33
3.3.1 Espectroscopia no Infravermelho na análise da gordura do leite .....	33
3.3.1.1 Princípio .....	33
3.3.1.2 Espectroscopia no IV baseada em filtros .....	35
3.3.1.3 Espectroscopia no IV por metodologia FTIR .....	36
3.3.1.4 Comparação entre espectroscopia de IV por filtro e FTIR .....	37
<b>4. MATERIAL E METODOLOGIA .....</b>	<b>38</b>
4.1 Coleta das amostras .....	38
4.2 Local de análises .....	38
4.3 Delineamento das análises .....	38
4.4 Preparo das amostras .....	39
4.5 Análises estatísticas .....	40
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 Efeitos das interações do tempo e concentração de lipase sobre a leitura do teor de gordura nos equipamentos de IV por filtro e FTIR .....	41
5.2 Efeitos das interações do tempo e a concentração de lipase sobre a leitura do teor de proteína nos equipamentos de IV por filtro e FTIR .....	43
5.3 Efeitos da temperatura na leitura da gordura e proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR .....	45
5.4 Efeitos dos equipamentos de IV por filtro e FTIR sobre a leitura da gordura e proteína .....	46
5.5 Efeitos das interações entre concentração, temperatura, tempo e equipamentos na leitura da gordura .....	47

5.6 Efeitos das interações entre concentração, temperatura, tempo e equipamentos na leitura da proteína .....	50
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente exigência da legislação e do consumidor por um produto de qualidade fez com que a indústria leiteira sofresse grandes transformações nos últimos anos, a fim de se aquedar ao mercado que se encontra cada vez mais competitivo. Várias ferramentas são utilizadas para quantificar e conhecer os parâmetros que podem interferir na qualidade do leite, diagnosticando os pontos que devem ser corrigidos, com a finalidade de gerar ganhos efetivos com a atividade leiteira (Oliveira, 2011).

As principais análises realizadas pelos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios para o Controle da Qualidade do Leite (RBQL) são para avaliar a composição do leite, a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT). Estes parâmetros são utilizados pela indústria como base de pagamento ao produtor.

A gordura e a proteína são os macros componentes do leite mais utilizados na produção de derivados lácteos. Possuem um alto valor econômico e estão diretamente relacionados com a qualidade do produto final.

Durante a produção do leite vários fatores podem alterar sua qualidade. A gordura e proteína são os principais componentes que apresentam maior variação. Fatores como época do ano, tipo de alimentação, raça, estágio de lactação, número de ordenhas, entre outros, podem causar grande alteração nos teores de gordura e proteína do leite (Burchard e Block, 1998).

Outro fator de grande importância para a qualidade do leite é o seu correto armazenamento. O armazenamento prolongado em tanques de expansão pode favorecer a multiplicação de bactérias psicrotóxicas, como as *Pseudomonas fluorescens*. Essas bactérias são

responsáveis por alterar negativamente a qualidade do leite, pois atuam produzindo enzimas extracelulares termorresistentes como proteases e lipases que provocam reações bioquímicas, alterando as características sensoriais como sabor e aroma, o valor nutritivo e o tempo de prateleira do leite (Fonseca al., 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o efeito da lipólise na mensuração da gordura do leite por espectroscopia de infravermelho por filtro e por FTIR.

### 2.2 Específicos

- Comparar os métodos de espectroscopia no infravermelho por filtro e por FTIR quanto à sensibilidade ao efeito da lipólise na mensuração do teor de gordura no leite;
- Avaliar se a técnica espectroscópica de FTIR reduz a interferência da lipólise quando comparada a espectroscopia por filtro;
- Avaliar o efeito da lipólise na leitura do teor de proteína do leite.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Características da produção, armazenamento, beneficiamento e qualidade do leite no Brasil

#### 3.1.1 Produção de leite no Brasil

De acordo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos que atuam sob algum tipo de inspeção, seja ela Federal, Estadual ou Municipal, foi de 5,64 bilhões de litros no 2º trimestre de 2015. Dessa aquisição, 41,3% foi localizada no Sudeste do país, tendo Minas Gerais 26,7%

de participação, a maior nacional (IBGE, 2015).

Este número indica quedas de 2,6% sobre o volume do produto captado no 2º trimestre de 2014 e de 7,9% sobre o registrado no 1º

trimestre de 2015. A Figura 1 mostra a queda no volume captado do 2º trimestre de 2015 quando comparado com o mesmo período de 2014 (IBGE, 2015).

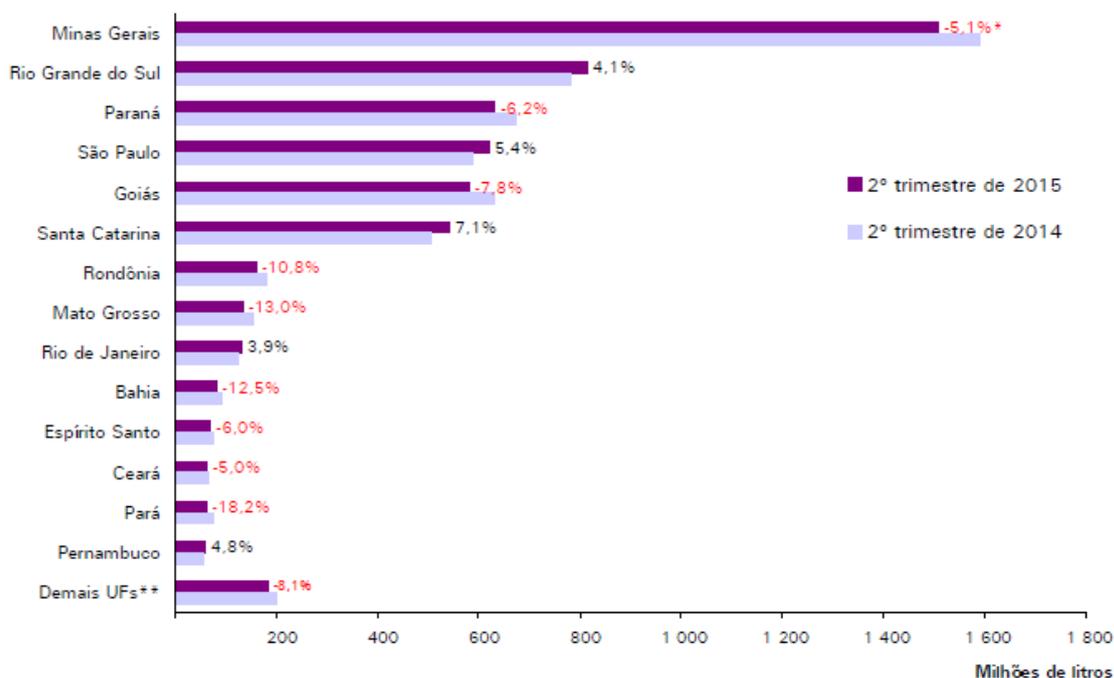


Figura 1: Ranking e variação anual do volume de leite cru adquirido pelos laticínios- Unidades da federação – 2º Semestres de 2014 e 2015. Fonte: IBGE (2015).

A queda ou o desenvolvimento lento da produção muitas vezes ocorre devido às características da produção de leite brasileira. A maior parte dos produtores brasileiros é classificada como pequenos ou médios, com produção diária de 50 a 100 litros de leite e de caráter familiar. Consequentemente, o investimento na atividade é menor, acarretando em baixa tecnificação, falta de controle sanitário dos animais e condições higiênicas inadequadas durante a ordenha, conservação e transporte. Essas deficiências refletem na baixa produtividade do rebanho nacional e redução da qualidade do leite produzido (Embrapa gado de leite, 2009).

Em relação ao mercado mundial, por apresentar problemas de eficiência produtiva e de qualidade da matéria prima, o setor leiteiro Brasileiro perde em competitividade para outros países (Ribeiro et al., 2000).

A má qualidade do leite cru e de seus derivados está relacionada a fatores como deficiências no manejo e higiene da ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente, mão de obra desqualificada, entre outros (Santana et. al., 2001).

Torna-se necessário incentivar o aumento do consumo de leite e de seus derivados,

bem como expandir a venda dos produtos brasileiros para novos mercados, via exportação. Para que essas necessidades sejam atendidas, se fez necessário atender a principal demanda do mercado: produtos de qualidade e que não ofereçam riscos ao consumidor (Silva, 2012).

A modernização da cadeia produtiva do leite tem como base a melhoria da qualidade do leite cru que foi impulsionada principalmente pelas novas exigências da legislação, em vigor desde 2005.

### 3.1.2 Qualidade do leite

A qualidade dos produtos lácteos é caracterizada pela qualidade higiênica (ou inocuidade), qualidade composicional, qualidade sensorial e qualidade tecnológica. A qualidade higiênica é definida pela ausência de agentes físicos, químicos ou biológicos estranhos ao leite e/ou que apresentem riscos à saúde do consumidor, tais como substâncias estranhas, antimicrobianos, pesticidas e herbicidas, patógenos, toxinas, etc. No que diz respeito à qualidade composicional, os teores de gordura, proteína, lactose, vitaminas e minerais devem corresponder à própria natureza do produto. A qualidade sensorial é aquela percebida pelos sentidos do paladar, olfato e visão sendo que, para esta avaliação, o leite considerado normal é um líquido branco, opaco e homogêneo, de sabor e odor característicos. Por fim, a qualidade tecnológica é traduzida como a adequação do leite para o processamento, armazenagem e distribuição (Picinin, 2003).

Visando melhorar e compatibilizar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil com os padrões mundiais em setembro de 2002 foi publicada a Instrução Normativa nº 51, que entrou em vigor em

julho de 2005. Nela foi determinado que as indústrias de laticínios sob Inspeção Federal devem enviar amostras de cada uma das propriedades rurais que lhes fornecem leite para análises mensais em um dos laboratórios da Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). As amostras de leite devem ser analisadas quanto aos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD), contagem de células somáticas (CCS), pesquisa de resíduos de antimicrobianos, determinação do índice crioscópico e contagem bacteriana total (CBT) (Brasil, 2002).

No que diz respeito à composição centesimal do leite cru refrigerado, foram estabelecidos os limites mínimos de 2,9% de proteína, 3,0% de gordura, e 8,4% de ESD (Brasil, 2002).

A Instrução Normativa nº 62 (IN 62), publicada em dezembro de 2011, estabelece mudanças nos prazos e nos valores máximos de contagem bacteriana e contagem de células somáticas permitidos, até que sejam alcançados os limites máximos de contagem de 100.000 Unidades formadoras de colônia/ml (UFC/ml) e 400.000 células/ml (céls./ml) (julho de 2016 e julho de 2017 de acordo com a região do Brasil). O valor máximo permitido para a contagem bacteriana e para a contagem de células somáticas no período de 01/07/2014 até 30/06/2016 será de 300.000 UFC/ml e 500.000 céls./ml, respectivamente, nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, e de 600.000 UFC/ml e 600.000 céls./ml nas regiões Norte e Nordeste, como mostra o Quadro 1 (Brasil, 2011).

Quadro 1: Requisitos microbiológicos e de CCS a serem avaliados pela RBQL. Fonte: adaptado de Brasil (2011).

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	De 01/07/2008 até 31/12/2011 Regiões: S/SE/CO De 01/07/2010 até 31/12/2012 Regiões: N/NE	De 01/01/2012 até 30/06/2014 Regiões: S/SE/CO De 01/01/2013 até 30/06/2015 Regiões: N/NE	De 01/07/2014 até 30/06/2016 Regiões: S/SE/CO De 01/07/2015 até 30/06/2017 Regiões: N/NE	A partir de 01/07/2016 Regiões: S/SE/CO A partir de 01/07/2017 Regiões: N/NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em céls/mL	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

### 3.1.2.1 Contagem de Células somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas é reconhecida, internacionalmente, como um dos parâmetros mais importantes para determinar a qualidade do leite (Philpot, 1998).

As células somáticas (CS) são constituídas por dois grupos de células: as advindas da resposta inflamatória na glândula mamária, como os leucócitos; e oriundas dos processos de renovação natural e reparo a injúrias (células epiteliais). Essas últimas são encontradas em menor proporção, e variam de 0 a 7% do conjunto total de células (Harmon, 1998).

Mastite é a inflamação da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão do úbere, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microrganismos, especialmente por bactérias. O grau de inflamação pode variar desde a forma subclínica até as várias formas clínicas da doença, dependendo da gravidade com que o úbere reage à causa da irritação (Philpot e Nickerson, 2002).

A resposta inflamatória ocasionada pela mastite influencia negativamente os componentes do leite. Segundo Bueno et al. (2004), contagens acima de 200.000 céls./mL causam alterações significativas nos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

Machado et al. (2000) observaram mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorrerem a partir de CCS superiores a  $10^6$  cél/ml para gordura e  $5,0 \times 10^5$  céls./ml para proteína e lactose.

A mastite resulta em redução relevante na quantidade do leite e em mudanças na sua composição. Para os produtores, isto significa menor retorno financeiro devido à diminuição da produção. Para as indústrias, significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos produtos de laticínios (Philpot e Nickerson, 2002).

### 3.1.2.2 Contagem bacteriana total (CBT)

A CBT é uma ferramenta importante para auxiliar no controle da qualidade do leite, já

que fornece um perfil geral de todo o processo de ordenha, da saúde do úbere, do armazenamento e da coleta do leite (Fonseca et al., 1999).

Segundo Fonseca et al. (2008) a composição e a contagem bacteriana do leite cru refrigerado são influenciadas pelas variações sazonais e regionais, com aumento significativo da CBT durante o verão. Além disto, observa-se que a contagem bacteriana do leite ainda é um dos principais fatores que fogem do padrão de qualidade estabelecido pela legislação em vigor.

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, altas contagens de microrganismos, demonstrando que há deficiências na higiene durante a sua produção (Cerqueira et al., 1994). A disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade torna-o extremamente favorável ao crescimento de microrganismos (Arcuri et al., 2006).

De acordo com Cerqueira et al. (2010), os esforços das indústrias normalmente têm se pautado em promover ações de melhoria da qualidade do leite nas fazendas. As etapas de coleta e transporte não têm sido priorizadas e muitas vezes o procedimento relacionado a estas operações tem sido falhas. Com isto, ocorrem diferenças entre a qualidade da amostra de leite coletada individualmente no tanque e a do leite que a indústria recebe, proveniente do caminhão.

Folmer e Souto (2010) avaliaram as condições de boas práticas na coleta e transporte do leite cru a granel em um posto de resfriamento no Estado de Santa Catarina. Foram avaliadas condições de higiene em oito rotas de coleta e foram considerados quatro itens de condições higiênicas dos equipamentos e cinco itens das condições higiênicas pessoais. Dos 32 itens de condições higiênicas dos equipamentos e 40 das condições higiênicas

pessoais, 19 (59,6%) e 28 (70%) estavam de acordo com os requisitos legais.

No entanto, parâmetros como higiene dos equipamentos após a coleta e higiene das mãos apresentaram índices abaixo de 30%, levando a uma necessidade de adequação dos mesmos.

De acordo com Pinto et al. (2006) o investimento contínuo em Boas Práticas, visando prevenir a contaminação e o crescimento microbiano do leite, pode reduzir, conseqüentemente, problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios.

### **3.1.2.3 Composição centesimal do leite**

Outro importante parâmetro usado na caracterização da qualidade do leite está relacionado com a avaliação da composição centesimal de seus principais constituintes, como gordura, lactose e proteína.

A determinação da composição centesimal do leite é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros produtos (Fonseca e Santos, 2000).

O leite contém em média 87,4% de água e 12,6% de extrato seco total (EST) ou sólidos totais. A fração de sólidos totais contém 4,6% de lactose, 3,9% de gordura, 3,2% de proteína e 0,9% de minerais e vitaminas (Harding, 1995).

Esta composição está relacionada a diversos fatores de origem genética, fisiológica e ambiental, dentre os quais podem ser citadas as variações entre diferentes raças, indivíduos, idade, estágios de lactação, climas e manejos nutricionais (Burchard e Block, 1998).

A gordura é o componente do leite que apresenta maior variação, sendo fortemente

influenciada pela genética e pelo manejo nutricional. De modo geral, o teor de gordura pode variar de 2,2 a 4,4%. Provavelmente devido a esta variabilidade, a gordura foi o primeiro componente do leite a ser usado nos sistemas de pagamento por qualidade do leite; sendo o constituinte mais valorizado na maioria dos sistemas de pagamento por qualidade, seguido pela proteína (Burchard e Block, 1998).

No estudo realizado por Alves (2006) avaliando os efeitos da variação sazonal na qualidade do leite, foi demonstrado que os componentes do leite que apresentaram a menor variação sazonal foram lactose e proteína, e o de maior variação foi a gordura.

O leite é constituído basicamente de duas frações de proteínas: as caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas) que representam 80% do total de proteínas do leite, e as proteínas do soro, que representam os 20% restantes (Varnam e Sutherland, 1994). A caseína apresenta alta qualidade nutricional e é muito importante na fabricação dos queijos. Ela é produzida pelas células secretoras da glândula mamária e se encontra organizada na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com cálcio, fósforo e outros minerais (Sgarbieri, 2004).

De acordo com Hurley et al. (2006) acréscimos no volume de produção de leite são geralmente acompanhados por redução na concentração de gordura e proteína do leite. Assim, os teores destes componentes são mais elevados no início e no final da lactação e mais baixos no pico de produção.

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. O conhecimento dessa estabilidade é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite (Behmer, 1985). Uma

redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia, por exemplo, levar a suspeita de adição fraudulenta de água, ao leite. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, detectáveis em laboratório (Brito et al., 2009).

### 3.1.3 Pagamento por qualidade do leite

O pagamento pela qualidade é um instrumento empregado pelas indústrias para incentivar o produtor a investir em cuidados que resultem em melhor qualidade do produto. Esses programas têm constituído em ferramentas importantes na motivação de produtores. Os incentivos variam entre as indústrias ou cooperativas. Desta maneira as indústrias ou cooperativas estabelecem seus próprios requisitos, que geralmente, são mais rigorosos que os padrões oficiais, oferecendo bonificações para os produtores que se adequem às normas de produção (Guimarães et al., 2006).

Através do pagamento do leite por qualidade é possível obter uma remuneração adicional de até 20% do preço base do leite (Machado et al., 2003). Esse sistema possibilita a seleção de matérias primas que ofereçam maior rendimento industrial na produção de derivados lácteos, tais como creme de leite, sorvetes, leite em pó, queijos, manteiga e requeijão (Monardes, 1998).

No contexto da melhoria da qualidade do leite, a indústria tem papel fundamental, pois a partir do momento que adota programas de pagamento do leite baseado em indicadores de qualidade, proporciona incentivo aos produtores de leite em fazê-lo. Com isso, tendem a se profissionalizar e, conseqüentemente, induzem estes produtores a atenderem os limites estabelecidos na legislação, principalmente

no que diz respeito aos indicadores de qualidade higiênico-sanitários (IDF, 2006). Dada a importância de programas de pagamento por qualidade, a Food and Agriculture Organization (FAO) procura orientar grupos de produtores de leite no estabelecimento de programas de pagamento baseados em indicadores de qualidade do leite (Draaiyer et al., 2009).

Em alguns países, como o Uruguai, o pagamento iniciou em função do teor de gordura a partir de 1954. Nos Estados Unidos, semelhante a outros países, foi adotado o sistema de precificação por múltiplos componentes (PMC), que possibilita às indústrias de processamento remuneração por teores de gordura, proteína e outros sólidos como lactose e minerais presentes no leite (Cardoso, 2012).

Dentre os parâmetros de pagamento, a gordura se destaca por ser o macro componente mais comumente utilizado no mundo inteiro. O fundamento em que se baseia o pagamento de bonificação extra para elevados teores de gordura reside no fato de que a gordura resulta na produção de derivados lácteos de valor agregado no mercado tais como manteiga e creme de leite. Além disso, o teor de gordura do leite está intrinsecamente relacionado com o rendimento industrial e tem importância fundamental sobre as características organolépticas para fabricação de queijos e outros derivados lácteos (Fonseca, 2004). No levantamento realizado pela Federação Internacional de Laticínios (IDF), dos 29

países analisados, 28 apontaram a utilização do teor de gordura como critério de pagamento do leite (IDF, 2006).

Em relação ao teor de proteína, o pagamento diferenciado vem crescendo em todo mundo. Pode-se atribuir essa valorização em grande parte ao crescente aumento no consumo de queijos, uma vez que o teor de proteína do leite é um dos fatores que apresenta maior correlação com o rendimento industrial para fabricação de queijos (Fonseca, 2004). No estudo pela IDF mencionado anteriormente, dos 29 países analisados, 22 utilizavam o teor de proteína total e três o de teor de proteína verdadeira para efeito de definição do valor a ser pago pelo leite (IDF, 2006).

Com relação aos demais parâmetros de composição, tais como sólidos totais e lactose, pode-se apontar que eles ocupam um espaço secundário nos sistemas de pagamento por qualidade, muito aquém dos critérios relacionados com a gordura e proteína (IDF, 2006).

A empresa Dairy Partners America (DPA) utiliza no Brasil os seguintes parâmetros: paga-se por um preço base e um adicional de mercado, volume, distância, teor de proteína, teor de gordura, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total (Machado, 2008). No programa de pagamento por qualidade do leite o produtor é bonificado ou penalizado, de acordo com os valores estabelecidos para os indicadores composicionais e higiênicos sanitários, conforme ilustrado no Quadro 2.

Quadro 2: Valores pagos pelo programa de pagamento por qualidade para bonificação e penalização da empresa DPA. Fonte: DPA/Nestlé-2008.

Parâmetro	Bonificação	Penalização
<b>Proteína</b>	> 3,00%	< 2,9%
<b>Gordura</b>	> 3,25%	< 3,05%
<b>CCS</b>	< 400.000 células/mL	> 500.000 células/mL
<b>CBT</b>	< 150.000 UFC/mL	> 450.000 UFC/mL

Independentemente do método de valorização empregado pelas indústrias, na IN 62 foi estabelecido coletar pelo menos uma amostra mensal de leite do tanque de cada produtor, para avaliar e monitorar a qualidade do leite fornecido às indústrias. Segundo as recomendações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a caracterização da qualidade do leite das fazendas deve ser feita pela média geométrica de CCS e CTB dos últimos três meses (Brasil, 2011).

### 3.1.4 Armazenamento do leite

A partir da IN 51, o MAPA passou a exigir o resfriamento do leite na propriedade leiteira (Brasil, 2002).

Visando à conservação da qualidade do leite cru refrigerado até a recepção em estabelecimento submetido à inspeção sanitária oficial, também foi estabelecido pelo MAPA que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento beneficiador deve ser de no máximo de 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas (Brasil, 2002). Essa exigência se baseia no fato de que o aumento da perda de qualidade do leite e a possibilidade de seleção de microrganismos psicrotróficos estão relacionados ao tempo de refrigeração prolongado nas propriedades rurais e fábricas de laticínios (Nornberg et al., 2010).

Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C (Fagundes et al., 2004).

Um efeito negativo da prática da refrigeração aliado a higiene deficiente durante a produção de leite é a seleção de bactérias que se multiplicam em baixas temperaturas (bactérias psicrotróficas), as quais podem produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas que acarretam em problemas tecnológicos e sensoriais.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) isolaram bactérias psicrotróficas provenientes de tanques de refrigeração individual, coletivo e do silo de uma indústria processadora de leite. O leite cru refrigerado mantido no silo industrial apresentou contagens bacterianas significativamente superiores as do leite mantido em tanques individuais e coletivos, podendo-se observar que a refrigeração do leite cru por períodos prolongados pode comprometer a sua qualidade microbiológica e tecnológica.

### 3.1.5 Bactérias psicrotróficas no leite

Bactérias psicrotróficas são aquelas capazes de crescer em baixas temperaturas, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, que geralmente se encontra na faixa de 20 a 30°C. São encontradas no solo, na água, na vegetação e nos animais. As superfícies do teto e do úbere, devido ao contato com o solo e com as camas, podem apresentar altas contagens desses microrganismos quando deficientemente limpos e sanificados (Chen et al., 2003).

Quando o leite é obtido em condições sanitárias adequadas, a microbiota psicrotrófica geralmente representa menos de 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto que em condições sanitárias precárias, pode chegar a representar 75% das bactérias presentes no leite (Nielsen, 2002).

Uma importante característica dos microrganismos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de sintetizar, durante a fase logarítmica de crescimento, enzimas extracelulares como as lipases e proteases, que degradam os componentes do leite. Ainda que, durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem poucos efeitos sobre a atividade das

enzimas produzidas por estes microrganismos (Cunha e Brandão, 2000).

As enzimas termorresistentes como proteases, lipases e fosfolipases, provocam reações bioquímicas, alterando as características sensoriais, como sabor e aroma, o valor nutritivo e a vida de prateleira do leite (Fonseca et al., 1999).

Uma população de psicotróficos no leite cru entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/ml já é capaz de produzir enzimas em quantidades suficientes para causar alterações no leite (Chen et al., 2003).

As medidas para prevenção da contaminação e proliferação de psicotróficos no leite são basicamente higiene e manutenção de temperatura de armazenamento adequada. No quesito higiene, um ponto fundamental é a correta limpeza e sanificação dos equipamentos de ordenha. Os resíduos de leite na superfície dos mesmos fornecem nutrientes para o crescimento bacteriano e os protegem da ação dos sanificantes, favorecendo a formação de biofilmes. Uma aderência significativa pode ocorrer quando o tempo entre duas limpezas exceder oito horas. O suprimento de água de qualidade inadequada também pode atuar como fonte de contaminação de psicotróficos (Pereira, 2002).

A microbiota psicotrófica contaminante do leite cru inclui espécies Gram-negativo dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, e *Flavobacterium*, e bactérias Gram-positivo dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (Arcuri, 2003; Pinto, Martins e Vanetti, 2006).

### 3.1.5.1 *Pseudomonas* sp.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido isoladas com maior frequência do leite e de

produtos lácteos refrigerados, sendo ainda mais prevalentes em países de clima temperado (Arcuri, 2003; Pinto, Martins e Vanetti, 2006). Os microrganismos deste gênero são bacilos Gram-negativos, não esporogênicos e inclui espécies que apresentam um tempo de geração curto (4 - 7 horas), entre 0 °C e 7 °C, e uma temperatura mínima de crescimento baixa, de até - 10 °C (Sorhaug e Stepianiak, 1997).

No leite “in natura” refrigerado a espécie *P. fluorescens* é predominante sobre as demais espécies (Desmaures e Guenguen, 1997; Eneroth et al., 2000). Segundo Muir (1996), no leite recém-obtido, *Pseudomonas* spp. constitui cerca de 10% da microbiota total, mas, em leite mantido sob refrigeração, essas bactérias têm predominância sobre as demais espécies presente quer no leite “in natura” quer no leite beneficiado.

Este gênero microbiano, além de ser o mais prevalente, apresenta espécies capazes de produzir enzimas extracelulares, como lipases e proteases, resistentes às temperaturas comumente utilizadas no processamento térmico de leite e derivados (Griffiths, 1990).

Arcuri et al. (2008) quantificaram, isolaram e caracterizaram as bactérias psicotróficas do leite cru refrigerado, produzido na Zona da Mata de Minas Gerais e no sudeste do Rio de Janeiro. Verificou-se a predominância de bactérias psicotróficas Gram-negativas (81,2%) sendo que a espécie predominante foi *Pseudomonas fluorescens*. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica em temperatura de refrigeração (4°C, 7°C e 10°C), evidenciando o alto potencial de deterioração desses microrganismos.

## 3.2 Lipólise do leite

Lipólise é uma alteração enzimática no leite que ocorre devido à ação das lipases. As

lipases hidrolisam os triacilgliceróis a diglicerídeos e monoglicerídeos resultando em glicerol e ácidos graxos livres (AGL) (Santos et al., 1999).

O significado da lipólise no leite possui dois lados, a produção de sabores desejáveis, como em alguns queijos, e a alteração indesejável da qualidade, desenvolvendo sabores repugnantes ao paladar, chamados de ranço (Deeth, 2006).

São descritos dois tipos de alterações lipolíticas no leite, lipólise espontânea e lipólise induzida (Tousová et al., 2013). A lipólise espontânea é um processo natural que ocorre no leite cru após a ordenha e é influenciado pela individualidade de cada animal, alimentação (Cieslak et al., 2010), frequência de ordenhas (Wiking et al., 2006), e pela atividade de microrganismos (Vyletelová et al., 2001). Em contraste, a lipólise induzida ocorre através de danos físicos no glóbulo de gordura, provocados principalmente por estresses mecânicos durante o processamento de leite (bombeamento, distribuição no tanque de expansão, homogeneização, armazenamento e beneficiamento) (Miller e Puhán, 1985). Os dois tipos de lipólise evoluem durante o armazenamento do leite em baixas temperaturas (Ouattara et al., 2004).

### 3.2.1 Características da gordura do leite

O leite geralmente contém cerca de 3,5 a 5 g de gordura por 100 ml, na forma de glóbulos emulsificados medindo de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Jensen et al., 1991).

Os triacilgliceróis correspondem a cerca de 98% dos lipídeos presentes no leite. Eles se apresentam em forma globular com uma membrana mais externa (a membrana do glóbulo de gordura) que contém proteínas, fosfolipídeos, glicolipídeos, esteróis e glicerídeos (Cromie, 1992). A membrana do glóbulo de gordura fornece estabilidade e mantém os lipídeos hidrofóbicos fora de contato direto com a fase aquosa do leite. Isso permite que os glóbulos de gordura estejam bem distribuídos no leite. A membrana também protege os triacilgliceróis do leite contra ação de enzimas lipolíticas (Santos et al., 1999).

A ação de algumas lipases dependerá das condições dessa membrana, pois enquanto sua integridade for mantida os triacilgliceróis do leite estão fora do alcance dessas lipases. Algumas modificações físicas, como baixas temperaturas e processos mecânicos, alteram facilmente a integridade da membrana e possibilitam assim menor proteção dos triacilgliceróis à ação das lipases (Cheftel e Cheftel, 1992).

Triacilgliceróis tem pesos moleculares que variam de 470 a 890 Da, o que corresponde a 24-54 acil carbonos (Balcao e Malcata, 1998). São compostos de um esqueleto de glicerol com três ácidos graxos ligados (Stryer, 1988), conforme mostra a Figura 2.

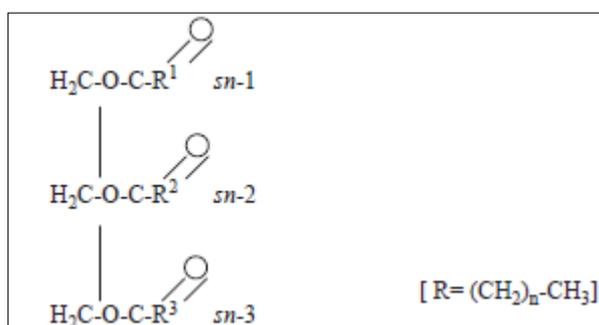


Figura 2: Estrutura do triacilglicerol. Fonte: Fox et al. (2000).

O posicionamento dos ácidos graxos no triacilglicerol não é aleatório; a posição-sn de um ácido graxo denota a sua posição sobre o triacilglicerol. Os ácidos graxos podem ser esterificados nas posições 1, 2 ou 3 (Figura 2).

Os fosfolípidos representam menos de 1% do total de lípidos presentes no glóbulo de gordura, porém desempenham um papel muito importante na membrana do glóbulo de gordura. Isso porque eles são anfipáticos, possuem uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica. Esta propriedade permite que ocorra estabilidade tanto em

soluções de óleo em água quanto de água em óleo (Banks, 1991).

### 3.2.2 Ácidos graxos livres no leite

Ácidos graxos livres são formados principalmente como resultado da ação de lipases sobre os triacilgliceróis do leite, especialmente ácidos graxos de cadeia curta e média. Os AGL também atuam como precursores de outros compostos tais como metil-cetonas, lactonas, ésteres e álcoois secundários, através de várias reações químicas (McSweeney e Sousa, 2000), conforme ilustrado na Figura 3.

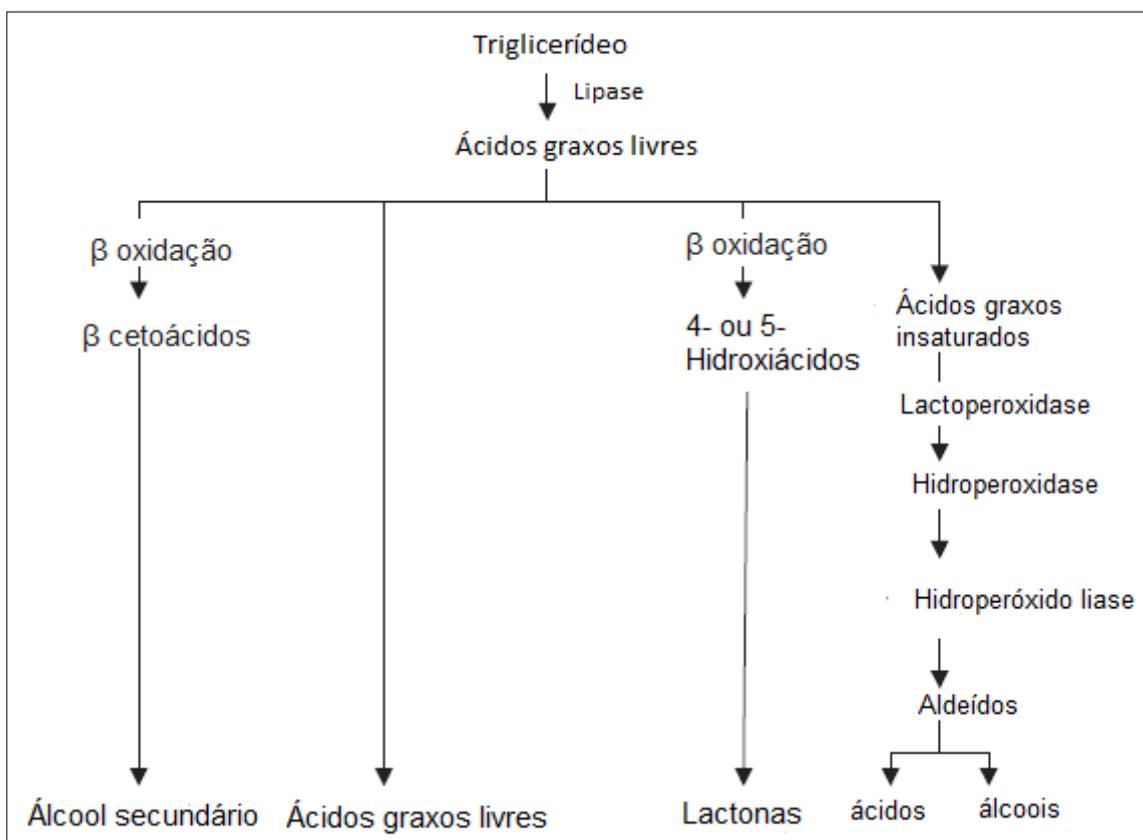


Figura 3: Catabolismo dos ácidos graxos livres. Fonte: Adaptado de Molimard & Spinnler (1996).

Os ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico, ácido capróico e caprílico, conferem sabor forte e picante ao produto; já os de cadeia média, como cáprico e

láurico tendem a conferir um sabor de sabão (Vulfson, 1994).

Os ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise são susceptíveis a oxidação (Figura 3) e concomitante formação de aldeídos e cetonas, que proporcionam um sabor descrito como oxidado ou metálico (Shipe, 1980).

O teor de AGL como um indicador de mudanças lipolíticas varia geralmente entre 0,5 e 1,21 mmol x 100g<sup>-1</sup> (Hanus et al., 2008; Wiking et al., 2006). O aumento AGL no leite provoca alterações em seus parâmetros tecnológicos (Vyletelová et al., 2000). O leite cru, contendo mais de 1 mmol de AGL após 24 horas de armazenamento não pode ser considerado como leite de alta qualidade. O valor crítico do conteúdo de AGL no leite cru no que diz respeito à sua qualidade é de 1,5 mmol x L<sup>-1</sup> (Deeth, 2006).

No estudo realizado por Santos et al. (2003) 34% dos integrantes do teste sensorial foram capazes de detectar o sabor causado pela lipólise no leite pasteurizado com 2% de gordura, com uma concentração de 0,25 meq/kg de AGL. Dessa forma, a concentração de AGL derivados da atividade lipolítica está intimamente

relacionada com as características sensoriais do leite.

### 3.2.3 Classificação das lipases

Lipases podem ser definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis (Beisson et al., 2000).

A especificidade da enzima lipolítica é controlada por três elementos: propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e fatores que afetam a ligação entre enzima e substrato (Jensen et al., 1983).

Enzimas lipolíticas são comumente classificadas pela sua especificidade em relação às características do substrato, como posição do ácido graxo na cadeia lipídica (Jensen et al., 1983). Dessa forma, as lipases são divididas em três grupos. O primeiro grupo compreende as enzimas lipolíticas não específicas. Essas enzimas liberam os ácidos graxos em qualquer uma das três posições da cadeia do triacilglicerol. Com isso, hidrolisam o triacilglicerol por completo resultando em AGL e glicerol (Figura 4).

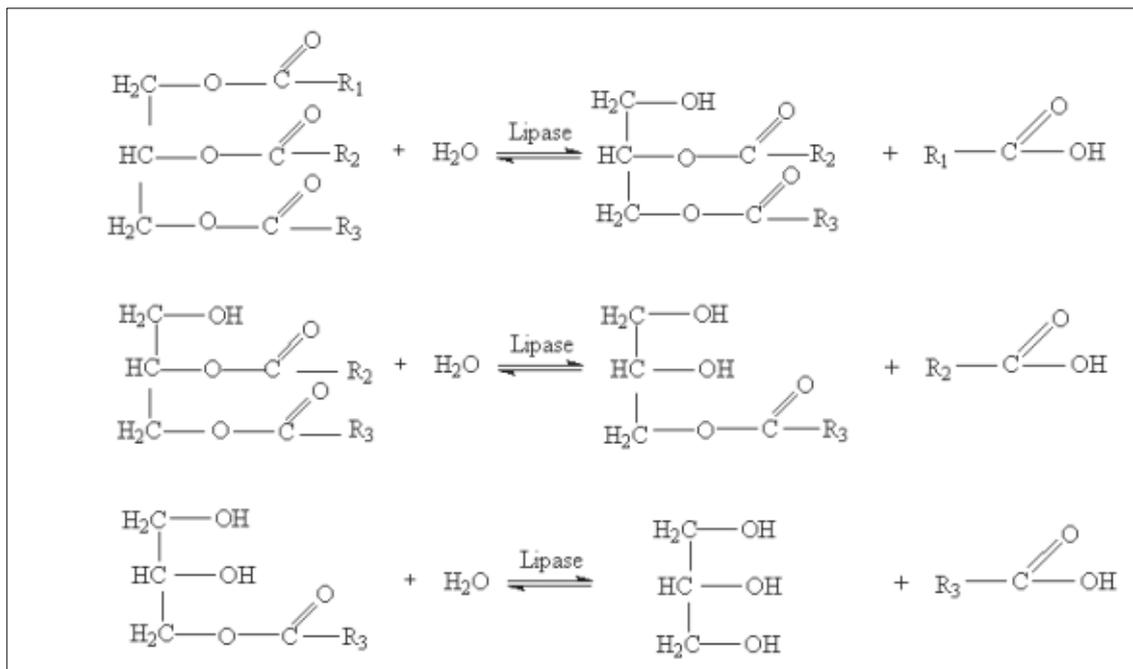


Figura 4: Hidrólise sequencial dos grupos acila do triacilglicerol catalisada por lipases. Fonte: Haraldsson (1991).

O segundo grupo são as enzimas 1,3 específicas, ou seja, elas liberam os ácidos graxos somente nas posições 1 e 3 da cadeia do triacilglicerol. Os componentes finais dessa hidrólise são 2- monoglicerol e AGL (Macrae, 1983). A exposição prolongada dos triacilgliceróis com as lipases 1,3 específicas resultam em sua hidrólise

completa, resultando glicerol e AGL (Figura 5). As enzimas lipolíticas do terceiro grupo tem preferência por ácidos graxos específicos, como a lipase B do fungo *Geotrichum candidum* que possui especificidade pela dupla ligação entre o C9 e C10 do ácido graxo que forma o triacilglicerol (Jaeger et al., 1994).

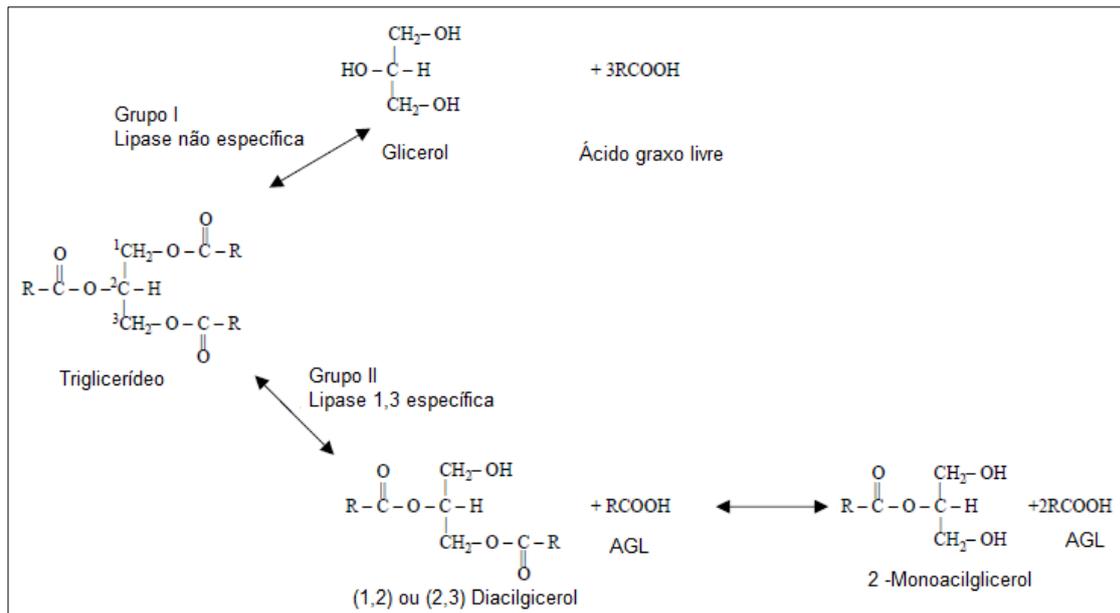


Figura 5: Classificação das lipases baseada na sua especificidade. Fonte: Adaptado de Macrae (1983).

Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de água ( $a_w$ ) do meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (Reis et al., 2009).

### 3.2.4 Lipase endógena do leite

O leite possui uma lipase endógena denominada lipoproteína lipase (LPL). A LPL é um dímero de cadeias de glicoproteínas, contém cerca de 8,3% de carboidratos e possui pH ótimo na faixa de 8-9 (Brockhoff e Jensen, 1974).

A enzima exibe preferência para a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia média (TCM) em comparação com os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). Esta diferença em velocidades de hidrólise foi atribuída a maior solubilidade e mobilidade dos TCM em sistemas de emulsão o que permite uma

hidrólise mais rápida em comparação com os TCL (Deckelbaum et al., 1990).

Além disso, a lipase não demonstrou especificidade em relação ao tipo de ácido graxo, mas é específica para as posições sn-1 e sn-3 dos mono, di e triacilgliceróis (Vilaro et al., 1992).

É amplamente aceito que a pasteurização rápida ( $72^{\circ}C/15$  segundos) inativa quase toda LPL do leite. Dessa forma, a lipase causa pouca ou nenhuma lipólise no leite pasteurizado, assim como em seus derivados (Deeth e Fitz-Gerald, 1994). Porém, segundo Driessen (1989) a enzima contribui para a lipólise em queijo produzido com leite pasteurizado, sendo necessária a temperatura de  $78^{\circ}C$  por 10 segundos para sua total inativação.

A LPL é sintetizada nas células secretoras da glândula mamária e o seu nível no leite irá depender de alguns fatores como estágio de lactação, raça do animal, nutrição, estação do ano, assim como do nível de produção leiteira (Deeth & Fitz-Gerald,

1976). Normalmente o leite bovino apresenta cerca de 0,5–2,0 mg L<sup>-1</sup> de LPL (Jandal, 1996).

De acordo com Chavarri et al. (1998) a atividade de LPL cai significativamente com o progresso da lactação. Além disso, os mesmos autores relataram que a pasteurização rápida é capaz de inativar cerca de 73 a 95% da enzima.

A lipoproteína lipase não está associada com a membrana do glóbulo de gordura do leite e sim com as micelas de caseína (Brockerhoff e Jensen, 1974). As proporções totais da atividade da LPL das diferentes frações do leite foram relatadas por Hohe et al. (1984) como: caseína 73,4%; sêrum 24,1% e membrana do glóbulo de gordura 0,8% .

A associação da enzima com as micelas de caseína são baseadas tanto em ligações hidrofóbicas quanto em ligações eletrostáticas. A remoção do cálcio por agentes desafiadores como resfriamento pode alterar a estrutura micelar e por consequência liberar a LPL para solução (Olivecrona e Bengtsson, 1984). O mesmo ocorre com o aumento da concentração de sais ou devido à adição de heparina. Esses fatores irão romper a interação eletrostática entre as cargas positivas da LPL e negativas da micela de caseína, levando a sua separação (Deeth & Fitz-Gerald, 1994).

A lipase endógena do leite pode formar grandes agregados. Uma característica que é possível devido a grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos presentes na enzima (36%) (Olivecrona & Bengtsson, 1984).

Normalmente a LPL não é ativa contra o glóbulo de gordura, pois a membrana presente no glóbulo o protege da ação enzimática da LPL. Porém, danos nesta membrana durante processamento industrial, como homogeneização, agitação e mudanças de temperaturas, podem iniciar a ação da LPL sobre o glóbulo de gordura resultando em lipólise (Deeth e Fitz-Gerald, 1976; Cartier e Chilliard, 1989; Kon e Saito, 1997).

### **3.2.5 Lipases bacterianas**

Na indústria leiteira nem toda lipólise indesejável é causada pela LPL. Durante o armazenamento em baixas temperaturas bactérias psicrotróficas são capazes de multiplicar e produzir enzimas, como as lipases e proteinases, que também são responsáveis por causar efeitos negativos na qualidade do leite e seus derivados (Sorhaug e Stepaniak, 1997).

As lipases produzidas por bactérias possuem características diferentes da LPL. Uma comparação entre os dois tipos de lipase é ilustrada no Quadro 3.

Quadro 3: Comparação das características da lipoproteína do leite (LPL) e das lipases produzidas por bactérias psicrotróficas. Fonte: Adaptado de Deeth (2006).

<b>LPL do leite</b>	<b>Lipase de bactérias psicrotróficas</b>
Destruída por pasteurização rápida (HTST)	Estável a HTST e ao tratamento térmico UAT
Membrana do glóbulo de gordura age como barreira efetiva	Membrana do glóbulo de gordura não age como barreira efetiva
Lipólise principalmente em leite cru e creme de leite	Lipólise principalmente em produtos estocados (Leite UAT, queijos, manteiga e leite em pó)
Características sensoriais alteradas durante o beneficiamento	Características sensoriais alteradas após o armazenamento

A principal diferença no modo de ação das duas lipases está relacionada à membrana do glóbulo de gordura. Esta não é uma barreira eficiente para evitar a ação da lipase de bactérias psicrotróficas sobre os lipídeos do leite, ao contrário do observado na lipoproteína lipase (Fitz-Gerald e Deeth, 1983).

Além disso, as lipases bacterianas diferem da LPL em relação à estabilidade térmica. A pasteurização rápida é capaz de inativar a enzima endógena do leite, porém as lipases de origem bacteriana são termicamente resistentes (Fitz-Gerald e Deeth, 1983), sendo que a maioria resiste intacta ao intenso tratamento térmico como o UHT (Ultra High Temperature), onde o leite é submetido a uma temperatura de 140°C por 4 segundos. (Christen et al., 1986).

Celestino et al. (1997) confirmaram que as lipases presentes no leite pasteurizado podem reter a atividade mesmo após tratamentos térmicos aplicados durante a produção de leite em pó (pasteurização e spray-drying) e até mesmo após a reconstituição deste leite seguida pelo tratamento UHT. Os autores observaram que a enzima permaneceu ativa no leite UHT reconstituído mesmo após o armazenamento no período de seis meses a temperatura de 25°C.

Uma vez que apenas pequenas quantidades das enzimas resistentes ao tratamento

térmico são produzidas no leite durante seu beneficiamento, os efeitos só são observados em produtos como o leite UHT, manteiga, queijo e leite após um período de armazenamento. O leite contaminado ou os produtos fabricados a partir dele desenvolvem sabores rançosos e podem se tornar inaceitáveis para consumo humano consumo (Deeth, 2006).

Lipases são produzidas concomitantemente com proteinases pela mesma bactéria e são, geralmente, mais termorresistentes que as proteinases (Chen, 2000). Além disso, as lipases possuem maior probabilidade de manter sua atividade no leite em pó durante o armazenamento quando comparadas com as proteinases (Andersson, 1980).

### **3.2.6 Lipases relacionadas à alta contagem de células somáticas**

A mastite bovina é descrita como a doença mais comum na indústria leiteira, resultando em redução da produção de leite, aumento do custo de produção e redução da qualidade do leite (National Mastitis Council, 1996).

A elevada CCS também foi associada a mudanças nos componentes do leite. Vários estudos demonstraram que altas CCS não só reduzem a quantidade de lactose, gordura e caseína do leite (Harmon 1994; Kelly et.al 2000; Somers et.al 2003; Bansal

et. al 2005; Lindmark Mansson et.al, 2006), como também aumentam os níveis de lipólise (Santos et.al, 2003; Gargouri et. al, 2008; Hanus et.al, 2008).

Devido à resposta inflamatória causada pela mastite os componentes do leite, que são sintetizados na glândula mamária, sofrem redução e ocorre influxo de componentes do sangue para o leite (Kitchen, 1981). Esses componentes, incluindo algumas enzimas, irão alterar a composição do leite através da degradação da caseína e da gordura do leite (Grieve e Kitchen 1985).

As concentrações de muitas enzimas ou mesmo a sua atividade enzimática no leite encontram-se aumentadas durante a mastite (Auldíst e Hubble, 1998).

A mastite pode contribuir para a lipólise espontânea. Porém, nesse caso, é necessário distinguir entre a elevada taxa inicial de AGL no leite (durante a secreção) e os AGL liberados durante o armazenamento do leite. O primeiro ocorre devido à infecção associada à inflamação da glândula mamária, ela irá alterar a síntese do leite e um elevado nível de ácidos graxos se mantém não esterificados quando comparado com a glândula mamária sadia (Fitz-Gerald et al., 1981).

Fitz-Gerald et al. (1981) avaliaram o leite de vacas sadias e vacas com mastite a fim de estabelecer a influência entre a mastite, a atividade da lipase e o nível de AGL no leite. O leite de vacas com mastite apresentaram níveis maiores de AGL quando comparados com leite de vacas sadias, porém o nível de LPL dessas amostras foi menor. Os níveis de AGL se tornaram cada vez maior à medida que a infecção se tornou mais severa. Os elevados níveis de AGL no leite foram atribuídos a maior quantidade de ácidos graxos não esterificados secretados e a maior lipólise durante o armazenamento.

Santos et. al. (2003) realizam estudo com amostras de leite pasteurizado contendo baixa CCS (<100,000 células/mL) e alta CCS (>1,000,000 células/mL) armazenadas a 0,5°C e 6°C durante 61 dias. Os autores observaram que o leite com alta CCS foi mais susceptível a lipólise do que o leite com baixa CCS, resultado também encontrado por Ma et al., 2000.

Além disso, o aumento da concentração de AGL no leite foi observado nas duas temperaturas de armazenamento (0,5°C e 6°C), entretanto os maiores níveis de AGL foram observados no leite pasteurizado submetido a 6°C com alta CCS.

A ocorrência de lipólise em leite pasteurizado durante o armazenamento indica que as enzimas lipolíticas associadas à alta CCS no leite conseguem sobreviver à pasteurização (Bachman et al.,1998; Ma et al., 2000). Em leite proveniente de quartos mamários sadios a principal enzima lipolítica é a LPL (Olivecroma et al., 1992), porém no leite com elevada CCS as lipases provenientes das células somáticas podem contribuir significativamente para a lipólise do leite durante o armazenamento sob refrigeração (Azzara e Dimick, 1985).

Em relação à qualidade sensorial das amostras, foi observado que no leite cru com baixa CCS, armazenado a 0,5°C, com crescimento microbiano controlado, os defeitos sensoriais causados pela lipólise e proteólise das enzimas naturais do leite só serão perceptíveis após 61 dias de armazenamento. Com o armazenado a 6°C eles poderão ser detectados entre 50 e 70 dias de armazenamento. Já o leite com alta CCS armazenado a 0,5°C, entre 50 e 60 dias de armazenamento será possível detectar os defeitos sensoriais e no armazenamento a 6°C esse período reduz para 35 dias (Santos et. al., 2003).

### 3.2.7 Lipases comerciais

O uso de enzimas nas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (Hasan; Shah; Hameed, 2006) sem causar riscos ambientais. Conseqüentemente, a demanda mundial destas enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90% do seu comércio efetuado pelos Estados Unidos, Europa e Japão (Iyer e Ananthanarayan, 2008).

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os microrganismos, embora estas sejam produzidas também por eucariotos superiores (plantas e animais). Tanto microrganismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência (Sharma et al., 2001; Saxena et al., 2003). O uso de microrganismos para obtenção de lipases pode ser justificado, entre outras razões, pela variedade de microrganismos que as produzem, pela possibilidade de manipulação genética, e pelo rápido crescimento dos microrganismos em meios de baixo custo (Hasan et al., 2006).

A estabilidade térmica é uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura. Lipases oriundas de bactérias termofílicas tem papel importante na indústria devido a elevada estabilidade em altas temperaturas (Jaeger; Reetz, 1998). Lipases psicofílicas, também merecem atenção, pois apresentam elevada atividade em temperaturas muito baixas (Joseph et al., 2008).

As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes,

medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (Hasan et al., 2006)

### 3.2.8 Lipases de *Pseudomonas fluorescens*

Através de dados das seqüências dos aminoácidos é possível diferenciar as enzimas bacterianas das enzimas do leite, como a LPL. Seqüências analisadas mostraram que enzimas de *Pseudomonas* sp. possuem grande diversidade e são divididas entre seis famílias (Arpigny e Jaeger, 1999).

Várias lipases conseguem sobreviver ao tratamento térmico durante o beneficiamento do leite, como exemplo as lipases produzidas por *Pseudomonas* e *Bacillus* (Matta e Punj, 1999).

Lipases produzidas por espécies de *Pseudomonas* isoladas de leite cru mantiveram 55-100% de sua atividade após o tratamento térmico de 60°C por 30 min (Law et al., 1976), e 75-100% após tratamento térmico de 100°C por 30 min (Fitz-Gerald et al., 1982). Andersson et al. (1979) observaram que a lipase de *P. fluorescens* SIK W1 apresentou um valor de redução decimal de 23,5 min a temperatura de 100°C.

Shamsuzzaman et al. (1986) reportaram que tratamentos térmicos para produção de leite em pó, como spray-drying, causaram pouco efeito na atividade de lipases produzidas por *P. fluorescens* no leite cru. O aquecimento do leite a temperatura de 70°C por 2 min (equivalente à pasteurização rápida) inativou toda LPL, porém não afetou a atividade da lipase produzida por *Pseudomonas*. Os autores concluíram que os processos de spray-drying e pasteurização rápida não são suficientes para inativar a lipase de *Pseudomonas* e são

capazes de manter sua atividade no leite em pó.

Em estudo realizado por Gokbulut e Arslanoglu (2013) a atividade celular máxima de células em crescimento da bactéria psicrotrófica *Pseudomonas fluorescens* KE38, isolada de amostras do solo, foi observada no quarto dia de incubação a 25°C. Após o quarto dia, que corresponde ao final da fase estacionária de crescimento, a produção da enzima reduziu. No mesmo estudo a atividade da lipase foi analisada na faixa de temperatura de 4°C a 65°C. A atividade máxima foi observada na temperatura de 45°C. A enzima também apresentou atividade em temperaturas mais baixas, mantendo 30% de sua atividade a 20°C. A lipase não se mostrou ativa na temperatura de 0°C.

De acordo com Angkawidjaja e Kanaya (2006) a maioria das lipases produzidas por

microrganismos psicrotróficos Gram-negativos apresentou atividade a temperaturas bem maiores do que a temperatura ótima de crescimento dos microrganismos. Várias lipases produzidas por *Pseudomonas* possuem atividade máxima na faixa de temperatura de 20 a 45°C (Zhang e Zeng, 2008). A 55°C a lipase da *Pseudomonas fluorescens* KE38 perdeu 41,8% de sua atividade máxima e somente 7,4% se manteve a 65°C, dessa forma, temperaturas acima de 55 °C causaram grande impacto na atividade da enzima (Gokbulut e Arslanoglu, 2013). Foi observado também que a lipase exibiu alta atividade a 4°C, mantendo 72% da atividade mesmo após 19 horas de incubação (Gokbuut e Arslanoglu, 2013).

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades das lipases produzidas por *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 1: Propriedades das enzimas lipolíticas de *Pseudomonas fluorescens*. Fonte: Adaptado de Chen et al. (2003).

<b>Enzima (fonte)</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Estabilidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 33 (leite pasteurizado)	50	7,5-8,5	7,6 min/ 50 60°C	Kumura et al. (1993)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AFT 36 (leite cru)	Não reportado	8	0.2 min, 65°C	Fox e Stepaniak (1983)
<i>P. fluorescens</i> 2D (leite cru)	135	8,5	4,2 min/ 120°C	Makhzoum et al. (1996)

### 3.2.9 Interações no leite causadas pelas lipases

A aceitabilidade do consumidor pelos produtos lácteos é determinada principalmente por suas características sensoriais e nutricionais (Ma et al., 2000).

Nos Estados Unidos, o principal motivo da rejeição do consumidor pelo leite está associado à presença de defeitos de sabor (USDA, 2004). Na ilha de Prince Edward, Canadá, foram reportadas perdas econômicas devido ao aumento da incidência de defeitos de sabor do leite em 1999 (Mounchilia et al., 2004). Em 1938, Babcock já procurava associar sabor do leite e sua qualidade. Em sua revisão bibliográfica, alertou que as perdas de leite devido à acidez são menores do que as perdas devido à presença de sabores desagradáveis. Segundo este autor, estudos daquela época destacavam a qualidade do leite baseadas nos constituintes químicos e deixavam em segundo plano a qualidade sensorial.

De forma similar, no Brasil, a indústria de laticínios considera mais importante as análises físico-químicas e microbiológicas do que a análise sensorial para a garantia da qualidade do leite (Scalco, 1999). No entanto, para os consumidores, a percepção da qualidade se dá por uma única avaliação, a de provar o leite, ou seja, a análise sensorial. O leite será percebido como um alimento agradável e satisfatório para o consumidor quando for produzido e processado apropriadamente, sobretudo evitando o aparecimento de defeitos de sabor (Homsey, 2000).

O desenvolvimento de alterações sensoriais no leite ocorre principalmente como resultado da lipólise e proteólise. Essas reações são responsáveis por reduzir a vida de prateleira e qualidade do leite pasteurizado e seus derivados (Ma et al., 2000).

A lipólise é responsável por contribuir tanto com sabores desejáveis quanto com sabores indesejáveis nos produtos lácteos. Os ácidos graxos livres, principalmente os de cadeia curta, liberados pela ação da lipase são responsáveis pelo desenvolvimento de sabores descritos como azedo, picante, metálico e rançoso (Vulfson, 1994).

O leite possui uma concentração de lipídeos na faixa de 37–41 g/L. A hidrólise desses lipídeos para a extensão de tão pouco quanto 0,37-0,82 g/ L pode promover um sabor de ranço ao leite (Olivecrona e Bengtsson, 1991).

Em estudo realizado por Garcia (2010) foram avaliadas as percepções do consumidor quanto ao sabor do leite através do teste de aceitabilidade de amostras com defeitos de sabor. Os resultados demonstraram que os defeitos de sabor ranço, oxidado por luz e oxidado por metal são percebidos como de baixa aceitabilidade.

Porém a lipólise também é responsável por desenvolver sabores desejáveis de vários queijos maturados. O sabor ocorre devido a várias mudanças bioquímicas causadas pela interação entre culturas de bactérias starters, enzimas do leite, do coalho e lipases (Urbach, 1997).

No queijo Emmental níveis moderados de AGL são liberados durante a maturação e possuem uma importante contribuição para características sensoriais como sabor e aroma (Chamba e Perreard, 2002).

Os maiores níveis de lipólise foram observados em queijos maturados com adição de fungos. 5-10% do total de triacilgliceróis são hidrolisados no queijo Camembert e mais de 20% são hidrolisados nos queijos azuis (Gripón, 1993).

### 3.3 Métodos analíticos da gordura do leite

A importância da determinação do teor de gordura do leite decorre do fato de que o pagamento do leite é feito em diversos países pelo seu conteúdo em gordura. Além disso, muitos produtos têm limites mínimo e/ou máximos legais para seu teor de gordura.

Recentemente, uma série de métodos instrumentais rápidos e precisos foi gradualmente introduzida na indústria leiteira (Jankovská et al., 2003). Eles possuem muitas vantagens comparadas a técnicas de bancada, como a determinação simultânea de proteína, gordura e lactose em uma única amostra sem tratamento prévio, rapidez analítica e possibilidade de automatização total do processo (Rodríguez-Otero et al., 1997).

Para a análise de leite, os métodos baseados na turbidez para a determinação de gordura têm sido utilizados há mais tempo, mas a técnica que revolucionou de fato os laboratórios de análise de leite fluido foi a espectroscopia de infravermelho (IV) (Rodríguez-Otero et al., 1997).

A atividade de lipase tem sido determinada através da quantificação dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise mediada pela enzima. Estes produtos podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação. Dentre os métodos que avaliam o desaparecimento do substrato podem ser citados a nefelometria e turbidimetria, tensiometria interfacial, microscopia de força atômica e espectroscopia de infravermelho. (Gupta et al., 2003; Hasan et al., 2009)

#### 3.3.1 Espectroscopia de infravermelho na análise da gordura do leite

##### 3.3.1.1 Princípio

A espectroscopia compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. A energia de certo estado corresponde ao movimento dos elétrons em torno do núcleo. Assim os vários estágios são chamados de estados eletrônicos. Neste caso, as transições eletrônicas estão associadas a mudanças de orbital atômico, spin eletrônico e momento angular total. Já para as moléculas, onde existem as ligações químicas, as transições eletrônicas envolvem mudança de energia dos elétrons de valência, ou seja, variações nas populações eletrônicas de orbitais moleculares. Em razão da existência das ligações químicas, as moléculas também possuem energia vibracional e rotacional (Skoog e Leary, 1992). Geralmente as transições vibracionais estão relacionadas com a região do Infravermelho (Sala, 1996).

A análise espectroscópica explora a interação da radiação eletromagnética com os átomos e as moléculas para fornecer informações químicas qualitativas, quantitativas e físicas (estruturais) através da análise do comprimento de onda ou da frequência do espectro de energia que é absorvido ou emitido (O'Sullivan et al., 1999).

A região do infravermelho é a faixa do espectro eletromagnético que apresenta comprimentos de onda entre 0,78 e 1000 $\mu\text{m}$ . Essa faixa é dividida em três áreas: 1) a região do infravermelho próximo ou NIR (near infra-red), que abrange a faixa de 0,78 a 2,5 $\mu\text{m}$ ; 2) a região média também chamada de MIR (mid infra-red), que vai de 2,5 a 50 $\mu\text{m}$ ; e 3) a faixa que compreende a região de 50 a 1000 $\mu\text{m}$ , denominada de infravermelho alto ou FIR (far infra-red) (Barbosa, 2007). As vibrações fundamentais das moléculas ocorrem,

principalmente, na região MIR (Wehling, 1994). Por esse motivo, tal região é a mais frequentemente utilizada nas análises

eletrônicas. A Tabela 2 apresenta as regiões espectrais do infravermelho.

Tabela 2: Regiões espectrais do infravermelho. Fonte: Adaptado de Williams (1987).

Região	Intervalo de número de onda ( $\nu$ ) – ( $\text{cm}^{-1}$ )	Região de comprimento de onda ( $\lambda$ ) – (nm)	Região de frequência ( $\nu$ ) – (Hz)
<b>Próximo (NIR)</b>	12800-4000	780-2500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
<b>Médio (MIR)</b>	4000-200	2500-5000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
<b>Distante (FIR)</b>	200-10	5000-100000	$3,8 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho é baseado na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose (Biggs *et al.*, 1987). Os grupos carbonila das ligações éster dos triacilgliceróis absorvem radiação no comprimento de onda de  $5,73 \mu\text{m}$ , os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em  $6,46 \mu\text{m}$  e os grupos hidroxila (OH) da lactose em  $9,53 \mu\text{m}$  (IDF, 1991). A quantidade de sólidos totais presente em uma amostra pode ser determinada pelo somatório do conteúdo dos componentes: gordura, proteína e lactose, acrescidos de uma constante de minerais, ou pela absorção de radiação em um comprimento de onda de  $4,3 \mu\text{m}$  dos grupos hidroxila das moléculas de água (Biggs *et al.*, 1987; Silveira, 2002). A relação entre a energia absorvida e a concentração de cada componente é definida pela lei de Lambert Beer que estabelece que a absorvância é diretamente proporcional à concentração do soluto (Biggs *et al.*, 1987).

No caso das proteínas, as diferentes combinações de vibrações das ligações peptídicas resultam em bandas de absorção características desse componente, conhecidas como amida I e amida II. A primeira se encontra na faixa entre  $1600 \text{ cm}^{-1}$  ( $6,3 \mu\text{m}$ ) e  $1700 \text{ cm}^{-1}$  ( $5,9 \mu\text{m}$ ), enquanto a segunda se encontra na faixa

entre  $1550 \text{ cm}^{-1}$  ( $6,5 \mu\text{m}$ ) e  $1570 \text{ cm}^{-1}$  ( $6,4 \mu\text{m}$ ) (Etzion *et al.*, 2004). Tais bandas são de grande importância para a análise de proteínas pelo método da espectroscopia no infravermelho.

Os aparelhos de espectroscopia por infravermelho são baseados, normalmente, na utilização de métodos indiretos de análises, fornecendo resultados percentuais dos constituintes do leite mediante a determinação de parâmetros, tais como a transmissão da luz ou a absorção infravermelha (Cimiano, 1974).

Nos equipamentos a base de análise no infravermelho, a amostra de leite após ser aquecida a  $40^\circ\text{C}$ , é homogeneizada com a finalidade de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Em seguida, ela recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho, quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência curvas de calibração previamente elaboradas no equipamento (Bentley Instruments INC., 1997; Fonseca, 2005).

A análise da composição centesimal dos constituintes de leite cru refrigerado realizada nos laboratórios oficiais da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) é efetuada em

equipamentos eletrônicos com grande capacidade de análise, das marcas, Bentley (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América), Foss (Foss North America, Brampton, Ontario) e Delta Instruments (Delta Instruments an Advanced Instruments Company, Drachten, Holanda). Os equipamentos desses fabricantes realizam a análise por absorção infravermelha com modelos baseados em filtros, sendo os mais recentes baseados em tecnologia de Infravermelho em Transformada Fourier (FTIR) (Oliveira, 2011).

O controle da calibração do equipamento é necessário para que os analisadores de infravermelho apresentem alta precisão e acurácia dos resultados. Uma calibração adequada garante que os equipamentos forneçam resultados semelhantes aos dos métodos de referência (Biggs et al., 1987; Harding, 1995).

Para obter uma calibração adequada, o analisador de infravermelho precisa ser controlado periodicamente para ajuste de zeros, repetibilidade, limpeza eficiente, linearização da curva de calibração e homogeneização (Barbano e Clark, 1989). Além disso, fatores físico-químicos como a composição do leite, a composição dos ácidos graxos da gordura do leite e as condições físicas da gordura do leite também podem afetar o desempenho do equipamento (IDF, 1996). Na calibração, as amostras padrão são introduzidas no instrumento, e a resposta instrumental é registrada. Normalmente, essa resposta é corrigida para o valor obtido com o branco do instrumento. Idealmente, o branco contém todos os componentes da amostra original, exceto o analito. Os dados resultantes são então colocados em um gráfico (curva de calibração) com a resposta do instrumento corrigida *versus* a concentração do analito (Skoog et al., 2002).

Silveira et al. (2005) compararam os resultados de análises feitas por meio de metodologias de referência e analisadores de infravermelho e verificaram que não existe diferença entre os resultados das determinações de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite bovino obtidos por métodos de referência ou por analisadores de infravermelho.

### 3.3.1.2 Espectroscopia de IV baseada em filtros

Os aparelhos para a análise de leite cru baseados na absorção no infravermelho são equipados de instrumentos denominados espectrômetros. Os espectrômetros possuem uma fonte de radiação infravermelha que emite um feixe de luz policromático. Com o auxílio de determinadas metodologias, são produzidos feixes de luz monocromáticos a partir do feixe policromático emitidos pela fonte. Os espectrômetros contêm, ainda, uma cubeta, onde a amostra é irradiada, e um detector. Existem três tipos de espectrômetros: os instrumentos dispersivos, os baseados em filtros e os baseados na transformação de Fourier (Lanher, 1996).

Os instrumentos dispersivos utilizam um monocromador que dispersa a radiação infravermelha em frequências individuais de radiação que, sequencialmente, atravessam a amostra. Dessa forma, a absorção de cada frequência pode ser mensurada. Um detector mensura a quantidade de energia absorvida durante a passagem de cada frequência pela amostra dando origem a um espectro de absorbância. Com os avanços da tecnologia, filtros ópticos (filtros interferenciais) passaram a ser utilizados com o objetivo de aumentar a velocidade de análise. Tais filtros restringem algumas frequências garantindo que apenas os comprimentos de onda desejados passem pela amostra (Wehling, 1994; Harding, 1995). Os

principais comprimentos de onda de interesse para a análise de leite nos instrumentos baseados em filtros são:  $5,7\mu\text{m}$  e  $3,5\mu\text{m}$  para a gordura,  $6,5\mu\text{m}$  para proteína e  $9,6\mu\text{m}$  para lactose (Pinto, 2010).

Para a gordura, os filtros referentes aos comprimentos de onda  $5,75\mu\text{m}$  e  $3,48\mu\text{m}$  são denominados filtro A e filtro B respectivamente. O filtro A está relacionado aos grupos carbonílicos das ligações éster dos triacilgliceróis. Como há apenas um grupo carbonila por ácido graxo, esse tipo de mensuração está relacionado ao número de moléculas de gordura, sem levar em consideração o comprimento da cadeia de carbonos. Em contrapartida, a análise feita com a utilização do filtro B, leva em consideração tanto o tamanho quanto o número de moléculas de gordura na amostra. Isso porque o número de ligações

carbono-hidrogênio (C-H) é diretamente proporcional ao peso molecular (Harding, 1995).

### 3.3.1.3 Espectroscopia de IV por metodologia FTIR

O avanço da espectroscopia no infravermelho médio, como técnica para análise quantitativa, deve se principalmente à combinação da transformada de Fourier e da nova geometria dos espectrofotômetros com a utilização do interferômetro de Michelson, tornando-os mais rápidos (Durig e Sullivan, 1990; Eikrem, 1990; Kalasinsky, 1990; Coates, 1998). Um esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson do espectrofotômetro FTIR pode ser visualizado na Figura 6.

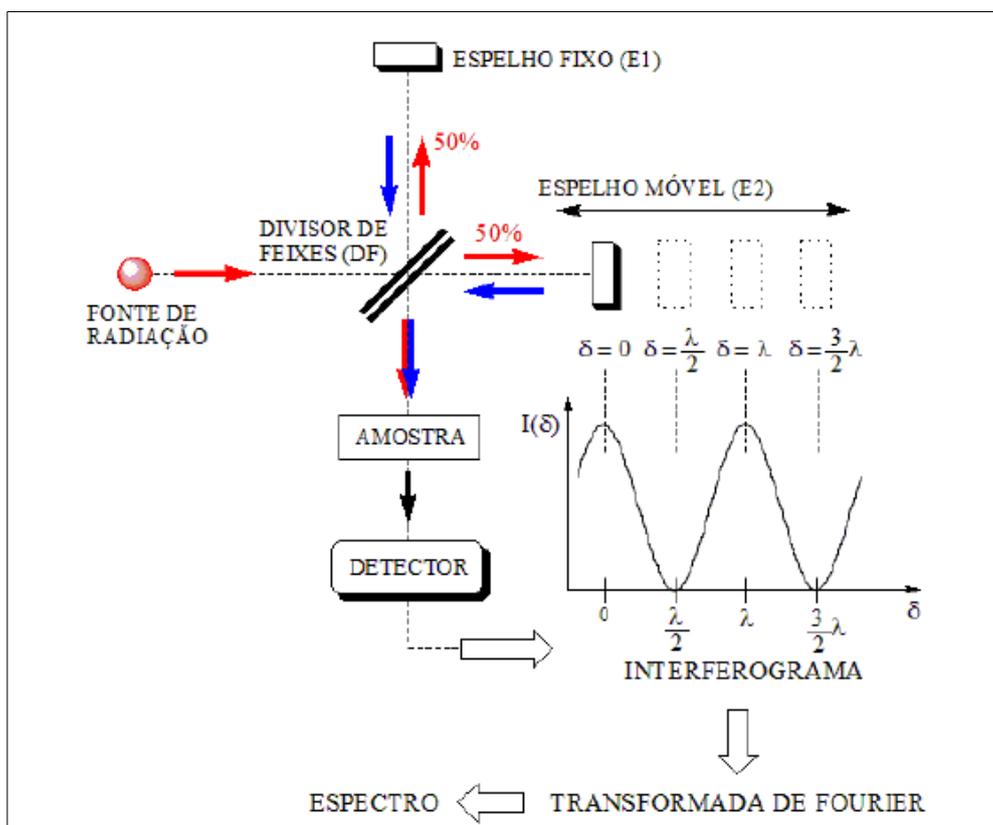


Figura 6: Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson. Fonte: Rodrigues (2012).

O interferômetro de Michelson consiste basicamente de dois espelhos (um fixo e um móvel) e um divisor de feixe (*beam splitter*) que transmite 50% da radiação incidente da fonte para o espelho móvel e reflete os outros 50% para o espelho fixo. Os espelhos, por sua vez, refletem os dois feixes para o divisor, onde se recombina. Se os dois espelhos encontram-se equidistantes do divisor, as amplitudes combinam-se construtivamente. Se o espelho move-se a uma distância de  $\lambda/4$  do divisor, as amplitudes combinam-se destrutivamente. Para a radiação no infravermelho (policromática), a soma de todas as interações construtivas e destrutivas para cada componente resulta num sinal complexo denominado interferograma. Após a aquisição do interferograma, é aplicada a Transformada de Fourier que converte os dados obtidos no interferômetro em um espectro que relaciona a intensidade *versus* frequência (número de onda) (Morgano et al., 2005).

Como uma “impressão digital”, cada molécula tem espectro característico na região do infravermelho, tornando o método viável para identificar diferentes tipos de amostras (análise qualitativa). Os picos presentes no gráfico do espectro correspondem às frequências de vibrações entre os átomos que compõem cada amostra. A altura desses picos corresponde à quantidade de determinada amostra (análise quantitativa) (Morgano et al., 2005).

O espectrofotômetro com transformada de Fourier expõe a amostra a um único pulso de radiação e de medidas de resposta. O sinal resultante, chamado de indução bifásica é uma medida direta da coerência temporal da luz e contém uma rápida decadência composta de todas as possíveis frequências. Como o sinal medido no interferômetro não pode ser interpretado é necessário o uso a técnica matemática chamada de Transformação de Fourier. Esta

transformação é realizada pelo computador (algoritmos de software), apresentando ao usuário as informações desejadas para a análise espectral (Morgano et al., 2005).

### 3.3.1.4 Comparação entre espectroscopia de IV por filtro e por FTIR

Apesar de os instrumentos baseados em filtros serem rotineiramente utilizados para a mensuração de gordura, proteína e lactose, o espectrômetro baseado na transformação de Fourier vem, atualmente, substituindo esses instrumentos. Segundo Inon et al. (2004), FTIR representa uma técnica de grande importância capaz de proporcionar a melhoria das análises baseadas em espectroscopia.

Os espectrômetros de FTIR fornecem uma ampla quantidade de informações espectroscópicas sobre a amostra quando comparados aos instrumentos baseados em filtros. Como todos os sinais da fonte alcançam o detector simultaneamente, o completo espectro do infravermelho médio pode ser obtido em alta resolução em poucos segundos. Essa alta velocidade permite o escaneamento de um grande número de espectros em curto espaço de tempo a fim de atingir uma alta razão sinal/ruído. O aumento da razão sinal/ruído leva a uma maior precisão de análise (Bouis, 1997).

Os equipamentos baseados na espectroscopia por FTIR são capazes de analisar uma amostra de leite em poucos segundos. Eles apresentam alta velocidade analítica mesmo quando é realizada a análise de vários componentes da amostra. A velocidade de análise dos instrumentos baseados em filtros depende do número de componentes que serão analisados. Isso ocorre porque, para esse tipo de análise, cada componente a ser mensurado necessita de um filtro que deve ser colocado entre a fonte de radiação infravermelha e a

amostra. Dessa forma, quanto mais componentes forem analisados, menor será a velocidade de análise dos equipamentos com filtros (van de Voort, 1992).

O fato de a espectroscopia FTIR fazer melhor uso das informações contidas no espectro de absorção no infravermelho possibilita a análise de determinados componentes químicos que não poderiam ser analisados, diretamente, pelos métodos baseados em filtros. Entretanto, para a análise dessas informações é necessário o uso de técnicas de análise multivariadas, como a regressão de componentes principais (PCR) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Essas técnicas são comumente utilizadas em FTIR para analisar o espectro completo de uma mistura e, automaticamente, determinar, via técnicas de correlação, qual porção do espectro está relacionada ao componente de interesse (Hewavitharana & Brakel, 1997).

Os instrumentos baseados em filtros utilizam métodos de análise univariável. Nesses métodos, somente a absorbância de uma frequência é associada à concentração, enquanto que as técnicas de análise multivariada usam simultaneamente duas ou mais frequências. A precisão dos métodos univariáveis é dependente da capacidade para identificar uma única banda isolada para cada componente. Os métodos multivariáveis, entretanto, podem ser utilizados igualmente quando estão sobrepostas informações espectrais de vários componentes em várias regiões espectrais selecionadas (Helfer et al. 2006).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras

As amostras de leite cru foram coletadas da Fazenda experimental Professor Hélio Barbosa da UFMG, no município de

Igarapé. As coletas foram realizadas durante seis semanas consecutivas, aos sábados. Para cada repetição, 10 litros de leite cru foram obtidos da primeira ordenha da manhã, das primeiras vacas da linha de ordenha (aproximadamente oito vacas) e diretamente da ordenhadeira, para evitar que o leite se misturasse com o leite já presente no tanque de expansão.

Os primeiros animais da linha de ordenha possuem maior produção de leite, baixa CCS, ausência de mastite clínica e não utilizam nenhum tipo de medicamento. O leite foi armazenado em um galão de 10 litros e logo após a coleta foi submetido à pasteurização lenta (65°C por 30 minutos) com a finalidade de eliminar a atividade da lipase natural do leite (LPL) e reduzir a microbiota. Logo após a pasteurização o leite adicionado do conservante bronopol<sup>®</sup> foi acondicionado à temperatura de 4°C. As análises foram realizadas após 24 horas da pasteurização.

### 4.2 Local de análise das amostras

As amostras foram analisadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), integrante da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL).

### 4.3 Delineamento das análises

O delineamento foi baseado em um esquema fatorial de 4x4x7x2 totalizando seis repetições em blocos inteiramente casualizados. A lipase de *Pseudomonas fluoresces* (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, 20.000U/g; código EC: 232.619-9) foi adicionada às amostras em três concentrações diferentes: 100U, 300U, 600U e as amostras sem adição de lipase foram consideradas controle, totalizando quatro tratamentos. Após a adição da lipase as amostras foram incubadas em quatro temperaturas: 7°C, 20°C, 30°C e 40°C. A leitura foi realizada nos períodos de 0 (zero), 3, 6, 24, 48 e 96

horas. As amostras incubadas a temperatura de 7°C permaneceram na estufa por até 168 horas, totalizando sete períodos de leitura. Os dois métodos de leitura por espectroscopia foram nos equipamentos com tecnologia por filtro e por FTIR (Equipamentos Bentley 2000 e LactoScope FTIR respectivamente). A Figura 7 ilustra o esquema fatorial descrito.

Com a finalidade de realizar um controle da microbiota foram realizadas também análises de CBT. Amostras de leite, sem adição de lipase, foram adicionadas do conservante azidiol® e incubadas nas mesmas temperaturas e períodos das amostras descritas acima.

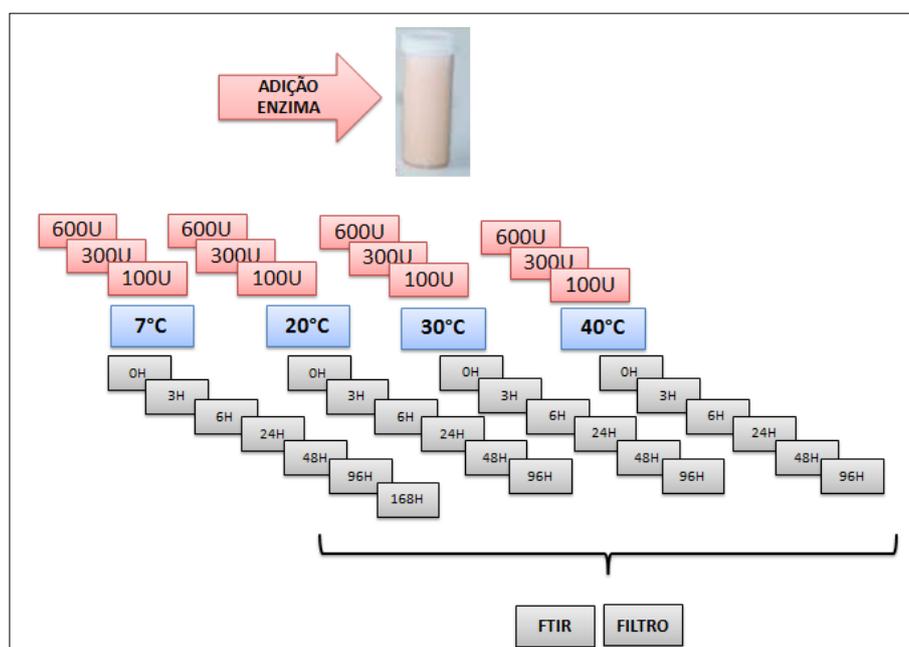


Figura 7: Esquema fatorial 4 x 4 x 7 x 2 das amostras com adição de enzima.

#### 4.4 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi iniciado 24 horas após a pasteurização lenta (65°C/ 30 min) e armazenamento do leite a 4°C.

Com base na concentração de 20.000U/g foi estimada a utilização de 5mg/L de enzima para concentração de 100U, 15mg/L para a concentração de 300U e 30mg/L de enzima para a concentração de 600U. Foram utilizados 2 litros de leite para cada concentração, com isso a quantidade de cada enzima utilizada para

as concentrações de 100U, 300U e 600U foram: 10mg, 30mg e 60mg respectivamente, totalizando 100mg de enzima. Essa quantidade de enzima foi diluída em 2 ml de água destilada para facilitar sua adição no leite.

Os 10 litros de leite foram homogeneizados por 15 minutos e seis litros de leite foram divididos em três frascos de dois litros. No primeiro frasco, correspondente as amostras com concentração de 100U da enzima, foram adicionados 200µL da diluição, no

segundo frasco, correspondente às amostras com concentração de 300U da enzima, foram adicionados 600 $\mu$ L da diluição. No último frasco, correspondente as amostras com concentração de 600U da enzima, foram adicionados 1200 $\mu$ L da enzima diluída. Os três frascos foram homogeneizados delicadamente por 5 minutos e distribuídos em 42 frascos de 40 ml para cada concentração. Totalizando 126 frascos de 40 ml para as três concentrações.

O restante do leite homogeneizado, sem adição de enzima, foi distribuído em 44 frascos de 40 ml e foram consideradas amostras controle.

Seis frascos contendo amostras com adição de 100U, 300U e 600U de enzima e dois frascos de amostra controle foram analisados nos dois equipamentos ao mesmo tempo logo após o preparo, considerado tempo 0 hora. As demais amostras foram incubadas estufas BOD a 7°C, 20°C, 30°C e 40°C.

As amostras de leite enviadas aos laboratórios originadas do controle leiteiro realizado nas fazendas, onde o leite de cada animal é coletado separadamente, nem sempre são mantidas na refrigeração e muitas vezes demoram mais de 48 horas para serem enviadas aos laboratórios. Dessa forma, as temperaturas descritas acima tem o principal objetivo de se aproximar da realidade do campo onde as temperaturas podem variar bastante, podendo alcançar até 40°C.

Após cada período de incubação (3h, 6h, 24h, 48h, 96h e 168h) as amostras eram distribuídas em duas racks, uma para cada equipamento, e mantidas em banho-maria a 40°C por 15 minutos, de acordo com a especificação dos equipamentos. Antes de serem analisadas as racks foram homogeneizadas e as alíquotas correspondentes às amostras foram analisadas simultaneamente nos dois equipamentos. A Figura 8 ilustra a ordem de leitura das racks em cada período.

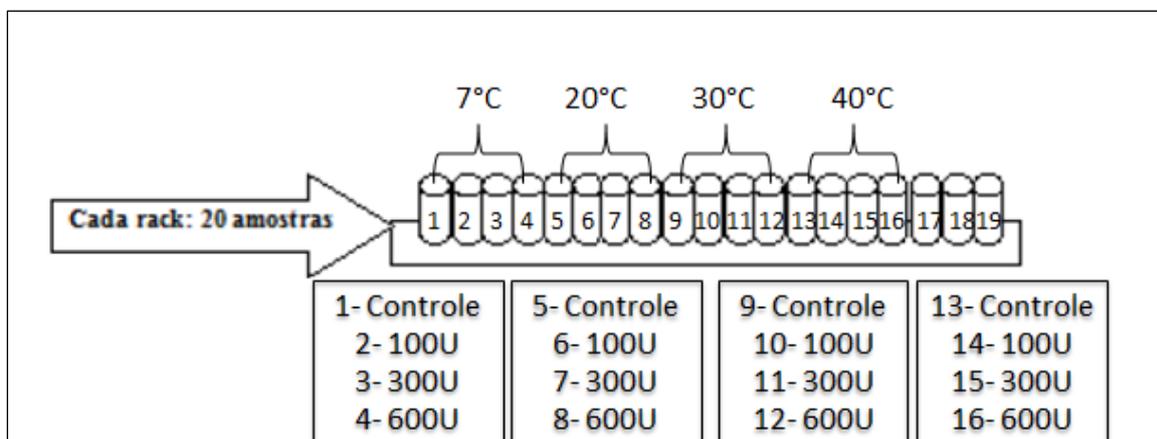


Figura 8: Ordem de leitura das amostras em cada período

#### 4.5 Análises estatísticas

Foi realizada a análise descritiva dos dados. Para a análise dos resultados utilizou-se o delineamento em parcelas

subdivididas, em que cada amostra assumiu o papel de um bloco e os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 4 x 4 x 7 x 2, sendo quatro concentrações de enzima (controle, 100 U, 300 U e 600 U), quatro temperaturas de incubação nas parcelas e o fatorial 7 X 2 (sete tempos de análise e dois métodos de espectroscopia no infravermelho) nas subparcelas. Foram realizadas a análise de variância e a comparação das médias usando-se o teste de Duncan (1998).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeitos das interações do tempo e concentração de lipase sobre a leitura do teor de gordura nos equipamentos de IV por filtro e FTIR

As interações do tempo e concentração de enzima na leitura do teor de gordura pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR estão representadas na tabela 3.

Tabela 3. Interações do tempo e concentração de lipase na leitura das médias do teor de gordura pelos equipamentos de IV baseados em filtros e FTIR

Tempo	FILTRO				FTIR			
	CONCENTRAÇÃO				CONCENTRAÇÃO			
	100U	300U	600U	Controle	100U	300U	600U	Controle
0	2,93	2,91	2,87	2,95	2,96	2,96	2,96	2,98
3	2,87	2,81	2,76	2,95	2,93	2,91	2,87	2,95
6	2,83	2,75	2,69	2,94	2,93	2,91	2,87	2,95
24	2,62	2,445	2,32	2,85	2,79	2,68	2,60	2,86
48	2,46	2,28	2,18	2,86	2,67	2,57	2,52	2,80
96	2,32	2,15	1,99	2,87	2,55	2,46	2,42	2,80
168	2,42	2,17	2,08	2,78	2,65	2,46	2,52	2,79

As amostras controle, sem adição de enzimas, apresentaram as maiores médias (2,88g/100g) de leitura do teor gordura ao longo do tempo quando comparadas as amostras com adição da lipase (Tabela 4), porém também apresentaram queda na leitura ao longo do tempo. Vários fatores podem estar associados a essa queda nas amostras controle. Dentre eles, a presença da lipase natural do leite (LPL) e as lipases relacionadas às células somáticas. As lipases de origem microbiana provavelmente não foram responsáveis por esse decréscimo, pois as amostras de leite que foram analisadas em relação à CBT apresentaram baixas contagens bacterianas durante os períodos de incubação.

É amplamente aceito que a pasteurização rápida (72°C/15 segundos) inativa quase toda LPL do leite. Dessa forma, a lipase

causa pouca ou nenhuma lipólise no leite pasteurizado, assim como em seus derivados (Deeth e Fitz-Gerald, 1994). Porém, segundo Driessen (1989) a enzima contribui para a lipólise em queijo produzido com leite pasteurizado, sendo necessária a temperatura de 78°C por 10 segundos para sua total inativação. Segundo Santos et al. (2003) as enzimas lipolíticas relacionadas as células somáticas podem continuar ativas após a pasteurização.

As amostras com adição de 600U de lipase apresentaram a menor média de leitura dos teores de gordura (2,55g/100g) e diferiu estatisticamente das amostras com adição de 100U e controle (Tabela 4). Os resultados demonstram que, quanto maior a concentração de lipase nas amostras de leite menor o teor de gordura estimado pelos

equipamentos no infravermelho com base em filtros e FTIR.

Tabela 4. Efeito da concentração da lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre a leitura da média do teor gordura nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Componente/Concentração	Controle	100U	300U	600U
<b>Gordura</b>	2,88 <sup>(a)</sup>	2,70 <sup>(b)</sup>	2,60 <sup>(b,c)</sup>	2,53 <sup>(c)</sup>

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Duncan

Os períodos de 24, 48, 96 e 168 horas foram estatisticamente semelhantes conforme mostra a Tabela 5. A partir de 24 horas a gordura sofreu uma queda significativa e a menor média foi observada

no período de 168 horas de incubação (2,44). Os resultados estão em concordância com Santos et al. (2003), onde foi observado que a lipólise foi afetada significativamente ( $p < 0,05$ ) pela temperatura e tempo de armazenamento.

Tabela 5. Efeito do tempo de incubação sobre a leitura das médias do teor de gordura nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Componente/Tempo	0 h	3h	6h	24h	48h	96h	168h
<b>Gordura</b>	2,94 <sup>(a)</sup>	2,88 <sup>(a,b)</sup>	2,86 <sup>(a,b)</sup>	2,64 <sup>(b,c)</sup>	2,54 <sup>(c)</sup>	2,48 <sup>(c)</sup>	2,44 <sup>(c)</sup>

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Duncan

Os resultados demonstram que, quanto maior a concentração de lipase e o período de incubação menor o teor de gordura

estimado pelos equipamentos no por filtro e FTIR (Figura 9).

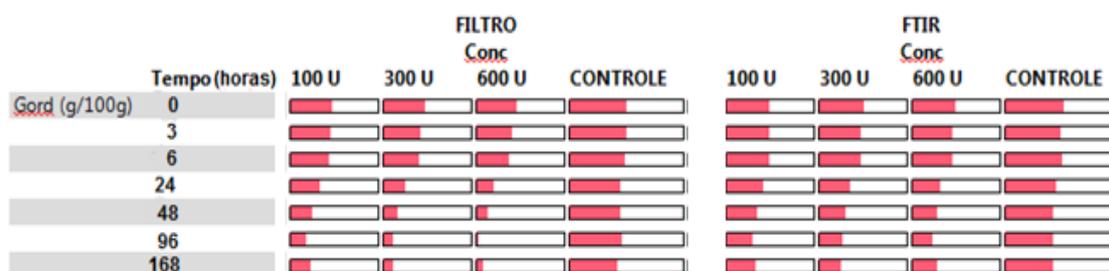


Figura 9: Efeito da concentração de lipase e período de incubação sobre as médias de gordura captadas pelos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Estes resultados podem ser explicados pelo modo de ação da lipase, que hidrolisa os triacilgliceróis a diglicerídeos e monoglicerídeos resultando em glicerol e ácidos graxos livres. Com uma maior quantidade de enzima na amostra maior será a hidrólise dos triacilgliceróis e,

consequentemente, maior liberação e quantidade de ácidos graxos livres presentes nas amostras.

O modo de leitura dos componentes do leite pelos equipamentos de IV é baseado na capacidade de absorção de radiação em diferentes comprimentos de ondas dos

grupos químicos específicos. Os grupos carbonila das ligações éster dos triacilgliceróis absorvem a radiação IV no comprimento de onda de 5,73 $\mu$ m. Dessa forma, devido à hidrólise dos triacilgliceróis pela lipase, ocorre alteração dos grupos químicos presentes na gordura do leite, causando aumento dos ácidos graxos livres. Esse aumento é responsável pela leitura incorreta do teor de gordura pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR, causando uma redução da leitura da gordura.

A redução da leitura dos teores de gordura ocorre principalmente devido a menor absorção da luz IV pelos grupos carbonila, que sofreram lise devido à lipase. Vários fatores afetam a frequência de absorção das carbonilas, dentre eles destacam-se fatores estruturais (Barbosa, 2008).

Os resultados demonstram a importância do tempo de armazenamento na análise correta do leite, onde um maior período entre a coleta e a análise pode causar leituras incorretas da gordura do leite,

prejudicando a interpretação correta da qualidade do leite.

Pinto, Martins e Vanetti (2006) isolaram bactérias psicotróficas provenientes de tanques de refrigeração individual, coletivo e do silo de uma indústria processadora de leite. O leite cru refrigerado mantido no silo industrial apresentou contagens bacterianas significativamente superiores as do leite mantido em tanques individuais e coletivos, podendo-se observar que o armazenamento do leite cru por períodos prolongados pode comprometer a sua qualidade microbiológica e tecnológica.

## 5.2 Efeitos das interações do tempo e a concentração de lipase sobre a leitura do teor de proteína nos equipamentos de IV por filtro e FTIR

A Tabela 6 demonstra as interações entre tempo e concentração de enzima na leitura do teor de proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR.

Tabela 6: Interações do tempo e concentração de lipase na leitura das médias o teor de proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR

Tempo	FILTRO				FTIR			
	CONCENTRAÇÃO				CONCENTRAÇÃO			
	100U	300U	600U	Controle	100U	300U	600U	Controle
<b>0</b>	3,37	3,37	3,40	3,34	3,37	3,40	3,41	3,36
<b>3</b>	3,38	3,42	3,45	3,32	3,42	3,45	3,48	3,37
<b>6</b>	3,43	3,47	3,51	3,35	3,43	3,47	3,50	3,37
<b>24</b>	3,57	3,67	3,76	3,38	3,53	3,59	3,60	3,36
<b>48</b>	3,62	3,75	3,83	3,35	3,71	3,77	3,80	3,50
<b>96</b>	3,70	3,84	3,90	3,37	3,60	3,65	3,72	3,36
<b>168</b>	3,65	3,81	3,92	3,43	3,65	3,85	3,89	3,44

Foi observado aumento da leitura do teor de proteína em todas as amostras ao longo do tempo. As amostras com adição de enzima apresentaram um

aumento maior da leitura do teor de proteína quando comparado às amostras controle (Figura 10).

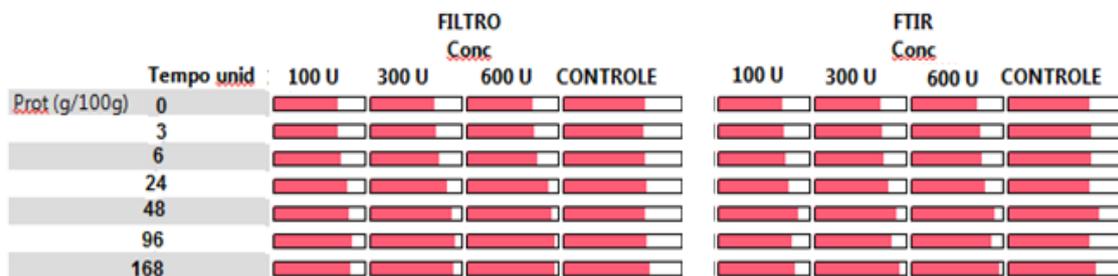


Figura 10: Efeito da concentração de lipase e período de incubação sobre as médias do teor de proteína captadas pelos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

O aumento da leitura da proteína ocorre devido à absorção da radiação IV pelos ânions carboxilatos dos ácidos graxos livres liberados por consequência da ação da lipase sobre os triacilgliceróis do leite (Silverstein e Bassler, 1967). Esses ânions absorvem a luz IV na faixa de comprimento de onda de 6,06  $\mu\text{m}$  a 6,45  $\mu\text{m}$ , região próxima de leitura da proteína pelos equipamentos. Os resultados encontrados estão de acordo com Robertson et al.

(1981), Kerkhof et al. (1982) e Van de Voort et al. (1987).

As amostras controle apresentaram a menor média de proteína (3,37g/100g), enquanto que as amostras com adição de 600U de lipase apresentaram a maior média (3,65g/100g). Todas as amostras apresentaram diferenças estatísticas em relação à concentração de lipase (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito da concentração da lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre a leitura da média do teor de proteína nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Componente/Concentração	Controle	100U	300U	600U
Proteína	3,37 <sup>(a)</sup>	3,54 <sup>(b)</sup>	3,60 <sup>(c)</sup>	3,65 <sup>(d)</sup>

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Duncan

Os diferentes períodos de incubação demonstraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a leitura do teor de proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR. Os períodos de incubação de 0, 3 e 6 horas foram semelhantes estatisticamente. O período de 24 horas diferiu estatisticamente

dos demais períodos. A leitura no período de 48 horas apresentou uma média maior (3,67g/100g) quando comparada com a leitura de 96 horas (3,64g/100g), indicando uma tendência de redução da leitura da proteína (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito do tempo de incubação sobre a leitura das médias do teor de proteína nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Componente/Tempo	0 h	3h	6h	24h	48h	96h	168h
Proteína	3,38 <sup>(a)</sup>	3,41 <sup>(a)</sup>	3,44 <sup>(a)</sup>	3,56 <sup>(b)</sup>	3,67 <sup>(c)</sup>	3,64 <sup>(c)</sup>	3,70 <sup>(c)</sup>

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Duncan

De acordo com Santos et al. (2003) o efeito do tempo de armazenamento na queda da leitura da proteína no leite pasteurizado indica atividade proteolítica contínua mesmo após a pasteurização. O leite utilizado no trabalho continha conservante bronopol, que inibe o crescimento microbiano, dessa forma não houve contribuição de proteases bacterianas para a redução da leitura da proteína. As causas da proteólise podem ser variadas, dentre elas a alta concentração de plasmina e plasminogênio advindos das células somáticas (Santos et al., 2003). Além disso, Valero et al. (2001) reportaram uma maior taxa de proteólise em leite contendo 1% de gordura quando comparado em leite contendo 3,25% de gordura. Os autores observaram maiores níveis de proteólise no leite UHT desnatado quando comparado com o leite UHT integral. A hipótese da redução da proteólise devido ao aumento do teor de gordura se deve ao fato que há alteração na disponibilidade da caseína causada pela homogeneização do leite. As micelas de caseína se agregam a interface dos glóbulos de gordura, como resultado da homogeneização, limitando o acesso de proteases a caseína.

No período de 168 horas a média da leitura da proteína (3,70) se apresentou maior que o período de 96 horas (3,64). Este fato pode ser explicado pelo fato de que na leitura de 168 horas ocorreu somente nas amostras incubadas a 7°C. De acordo com Santos et al. (2003) a temperatura de incubação e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na proteólise no leite pasteurizado, onde foi demonstrado que com a aumento da temperatura de armazenamento houve aumento da taxa de proteólise.

### 5.3 Efeitos da temperatura na leitura da gordura e proteína pelos equipamentos IV por filtro e FTIR

As diferentes temperaturas de incubação demonstraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a leitura da gordura e proteína pelos equipamentos de IV por filtro e FTIR.

Em relação à leitura da gordura, as temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C foram semelhantes estatisticamente entre si. Houve uma queda na leitura do teor de gordura à medida que a temperatura de incubação aumentou (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito da temperatura de incubação sobre a leitura das médias dos teores de gordura e proteína nos equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR

Componente/Temperatura	Controle	7°C	20°C	30°C	40°C
<b>Gordura</b>	2,94 <sup>(a)</sup>	2,81 <sup>(a)</sup>	2,65 <sup>(b)</sup>	2,59 <sup>(b)</sup>	2,59 <sup>(b)</sup>
<b>Proteína</b>	3,38 <sup>(a)</sup>	3,48 <sup>(b)</sup>	3,56 <sup>(c)</sup>	3,58 <sup>(c)</sup>	3,59 <sup>(c)</sup>

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Duncan

A temperatura ótima de ação da enzima utilizada é de 55°C. Em estudo realizado por Martins (2015) a lipase LipM produzida por *Pseudomonas fluorescens* foi isolada de leite cru, purificada e caracterizada. Segundo o autor a lipase apresentou

atividade máxima a 25°C e pH ótimo de 7,0.

As amostras incubadas a temperatura de 7°C foram semelhantes estatisticamente as amostras analisadas a 0 hora.

Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Abdou e Ohashi (1996). Os autores isolaram a bactéria *Pseudomonas fluorescens* de leite cru e avaliaram sua atividade lipolítica ao longo do tempo em diferentes temperaturas. Os autores observaram que a atividade lipolítica da bactéria apareceu após 12 horas à temperatura de 6°C, enquanto que à temperatura de 30°C a lipólise foi mais acentuada em 6 horas de incubação. A lipase exibiu temperatura ótima a 40°C e ainda manteve um pouco de sua atividade a 5°C. Além disso, os autores relataram que a lipase se manteve estável a 65°C por 5 minutos e a 105°C e 115°C por 5 segundos. Estes resultados demonstram a importância da temperatura de armazenamento das amostras de leite destinadas as análises de composição. Com o armazenamento inadequado dessas amostras, a temperatura ambiente, a leitura dos componentes pelos equipamentos poderá ser prejudicada devido à lipólise causada durante o período entre a coleta e a análise do leite. Além da importância da temperatura, deve-se ressaltar a importância das boas práticas de produção do leite, a fim de evitar a contaminação do leite por bactérias, principalmente psicrotróficas.

Em relação ao teor de proteína as amostras incubadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C foram semelhantes estatisticamente (Tabela 6), sendo que a temperatura de 40°C apresentou a maior média de leitura do teor de proteína (3,59g/100g) quando comparada com as amostras controle. A Tabela 6 demonstra a tendência de aumento da leitura da proteína à medida que a temperatura de incubação aumenta.

Além disso, os resultados demonstram uma relação inversamente proporcional entre a leitura dos teores de gordura e a leitura dos teores de proteína, com aumento da leitura dos teores de proteína à medida que a leitura da gordura reduz devido a ação enzimática durante o período de incubação.

Esse fato pode ser explicado pela leitura incorreta do teor de proteína devido ao aumento dos AGL nas amostras à medida que a temperatura aumenta. Os resultados estão de acordo com Kaylegian et al. (2007). Os autores observaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na leitura incorreta da proteína com o aumento do AGL no leite.

O aumento da quantidade de AGL presente no leite está associado com o defeito sensorial de ranço (Ma et al., 2000). Em estudo realizado por Santos et al. (2003), 34% dos integrantes do teste sensorial foram capazes de detectar o ranço no leite com 2% de gordura, causado pela ação de lipases, com 0,25 meq/kg de AGL.

#### **5.4 Efeitos dos equipamentos de IV por filtro e FTIR sobre a leitura da gordura e proteína**

Os diferentes métodos de IV demonstraram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a leitura da gordura, porém não demonstraram efeito significativo ( $p > 0,05$ ) sobre a leitura da proteína.

O equipamento de IV por filtro apresentou uma maior redução na leitura da gordura quando comparado ao equipamento por FTIR.

No equipamento de IV por filtros há uma restrição de algumas frequências garantindo que apenas os comprimentos de onda desejados passem pela amostra (Wehling, 1994; Harding, 1995). Os filtros referentes à leitura da gordura possuem comprimentos de onda na faixa de 5,75µm e 3,48µm, denominados filtro A e filtro B respectivamente. O filtro A está relacionado à leitura dos grupos carbonila das ligações éster dos triacilgliceróis. Como há apenas um grupo carbonila por ácido graxo, esse tipo de mensuração está relacionado ao número de moléculas de gordura, sem levar em consideração o comprimento da cadeia

de carbonos. Em contrapartida, a análise feita com a utilização do filtro B, leva em consideração tanto o tamanho quanto o número de moléculas de gordura na amostra. Isso porque o número de ligações carbono-hidrogênio (C-H) é diretamente proporcional ao peso molecular (Harding, 1995).

Como consequência da hidrólise dos triacilgliceróis causada pela lipase há formação de AGL e glicerol. Com isso há redução dos grupos carbonila e consequentemente redução do número de insaturações, afetando a leitura no filtro A. Fato também encontrado por Robertson (1981), onde foi observado que a lipólise no leite reduziu em 0,033% a leitura pelo filtro A.

O equipamento de espectroscopia no IV por FTIR produz um espectro completo das amostras devido as diferentes intensidades de luz IV que incidem sobre as amostras causadas pela presença do divisor de feixes, pelo espelho móvel e pelo espelho fixo. Além disso, a ausência de filtros específicos permite o escaneamento de um grande número de espectros em curto espaço de tempo a fim de atingir uma alta razão sinal/ruído. O aumento da razão sinal/ruído leva a uma maior precisão de análise (Bouis, 1997; Hewavitharana & Brakel, 1997). Os instrumentos baseados em filtros utilizam métodos de análise univariável. Nesses métodos, somente a absorvância de uma frequência é associada à concentração, enquanto que as técnicas de análise multivariada, encontradas nos equipamentos baseados em FTIR, usam simultaneamente duas ou mais frequências. A precisão dos métodos univariáveis é dependente da capacidade para identificar uma única banda isolada para cada componente. Os métodos multivariáveis, entretanto, podem ser utilizados igualmente quando estão sobrepostas informações espectrais de vários componentes em várias regiões espectrais selecionadas (Helfer et al.

2006). Dessa forma, a leitura incorreta da gordura pelo equipamento de IV por FTIR é menor quando comparada ao equipamento por filtro.

Segundo IDF (2013) a liberação de ácidos graxos livres pela adição de lipase no leite altera a leitura da composição pelos equipamentos de espectroscopia no IV. Um aumento na lipólise do leite no valor de 1meq/100g de gordura é responsável por alterar em 0,022% a leitura do teor de gordura no filtro A e 0,006% no filtro B, para uma amostra contendo 3,5% de gordura.

Esses resultados interferem diretamente no pagamento do leite ao produtor, onde a matéria prima é avaliada de acordo com sua qualidade. Esta qualidade é estabelecida pela CCS, CBT e pela composição, onde este último parâmetro é o mais utilizado como base de pagamento aos produtores pelas indústrias beneficiadoras do leite. No programa de pagamento por qualidade do leite o produtor é bonificado ou penalizado, de acordo com os valores estabelecidos para os indicadores composicionais. Com isso, se há interferência negativa na leitura da gordura causada pela lipólise o produtor será penalizado no pagamento pela baixa gordura captada pelos equipamentos.

### **5.5 Efeitos das interações entre concentração, temperatura, tempo e equipamentos na leitura da gordura**

Em todas as temperaturas a leitura da gordura apresentou redução à medida que a concentração de lipase aumentou, sendo que a temperatura de 40°C e a concentração de lipase de 600U foi a que apresentou a maior variação da leitura da gordura ao longo do tempo.

A 7°C após 24 horas a leitura da gordura apresentou queda significativa nos tratamentos correspondentes às adições de 100U, 300U e 600U de lipase. Em relação

ao controle, a leitura da gordura se manteve constante e apresentou queda a partir de 96 horas.

A 20°C e 30°C houve queda significativa da leitura da gordura em todas as concentrações de lipase a partir de 24 horas de incubação. As amostras controle também apresentaram queda na leitura da gordura nas duas temperaturas a partir de 24 horas. Na temperatura de 40°C a queda na leitura dos teores de gordura foi a mais

significativa das quatro temperaturas de incubação, onde a concentração de 600U apresentou a maior variação. As amostras controle não apresentaram queda significativa na temperatura de 40°C.

Houve diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre a leitura da gordura dos dois equipamentos, porém não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre todas as interações.

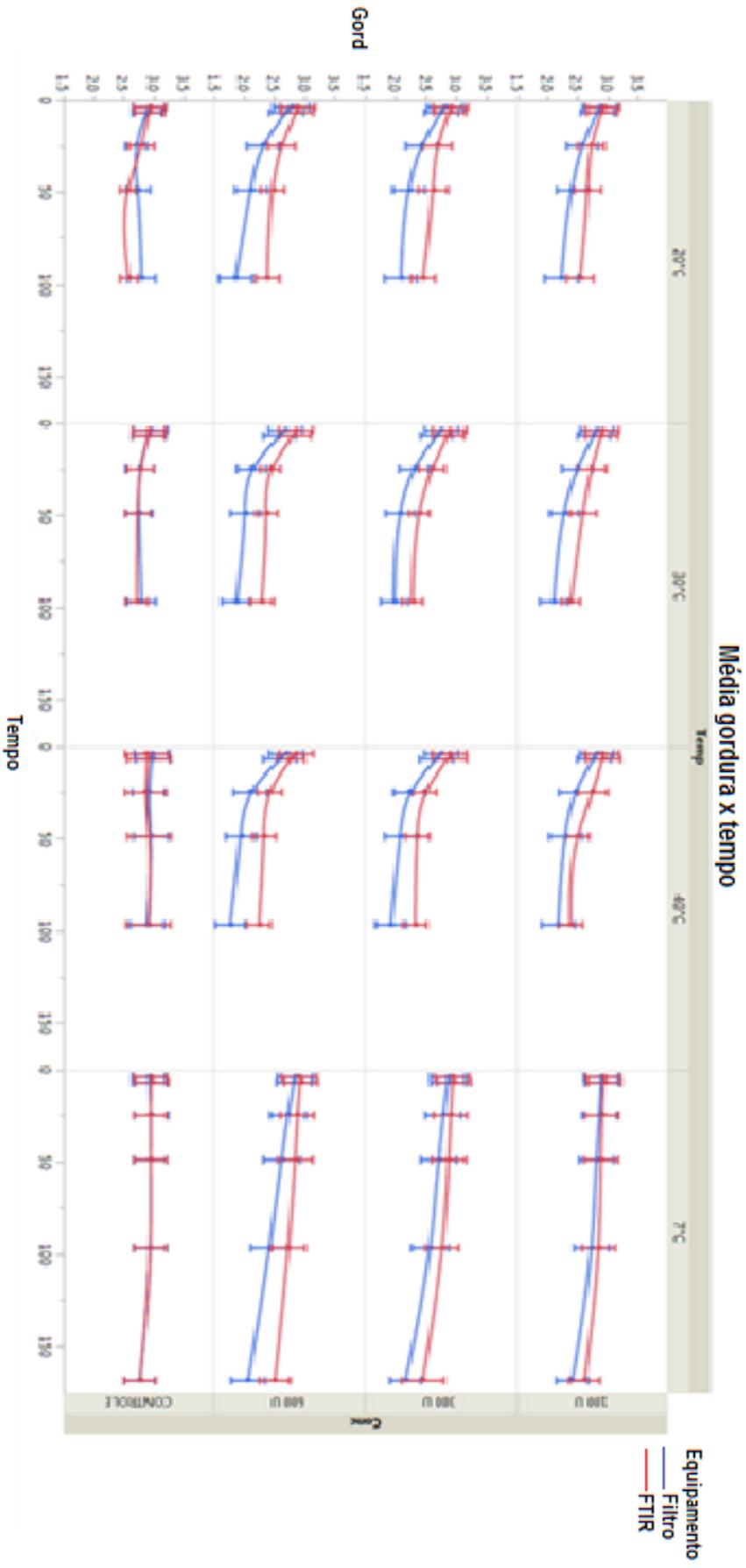


Figura 11: Efeito da interação das concentrações de lipase, equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR e temperaturas de incubação sobre as leituras das médias do teor de gordura.

A temperatura de 40°C de incubação e a concentração de 600U apresentaram as maiores variações na leitura da gordura, principalmente no equipamento por filtro.

### **5.6 Efeitos das interações entre concentração, temperatura, tempo e equipamentos na leitura da proteína**

Entre as interações realizadas houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) somente na interação entre concentração de lipase e tempo de incubação.

A concentração de 600U de lipase apresentou a maior variação da leitura da proteína ao longo do tempo em todas as temperaturas de incubação. Houve aumento da leitura deste componente até o período de 48 horas deste e a temperatura de 40°C foi a que apresentou maior efeito entre as quatro temperaturas de incubação. Em todas as amostras controle houve queda da leitura da proteína a partir de 48 horas.

Na temperatura de 7°C todas as amostras adicionadas de lipase apresentaram aumento da leitura de proteína ao longo do

tempo. Esse resultado pode ser explicado pela presença de AGL nas amostras incubadas a 7°C, onde a lipólise ocorre de maneira mais lenta, promovendo a leitura incorreta dos compostos liberados no leite em decorrência da ação da lipase sobre os triacilgliceróis.

Nas demais temperaturas as amostras controle apresentaram queda na leitura após 48 horas. Estes resultados estão em concordância com Santos et al. (2003).

Não houve diferença estatística significativa da leitura da proteína entre os diferentes equipamentos (Figura 12).

Nos dois equipamentos houve a leitura incorreta da proteína, provavelmente devido aos ânions carboxilatos dos AGL que podem interferir na leitura deste componente de forma semelhante nos dois equipamentos (Silverstein e Bassler, 1967). Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos ânions possuírem comprimentos de ondas na mesma faixa de leitura da proteína nos dois equipamentos.

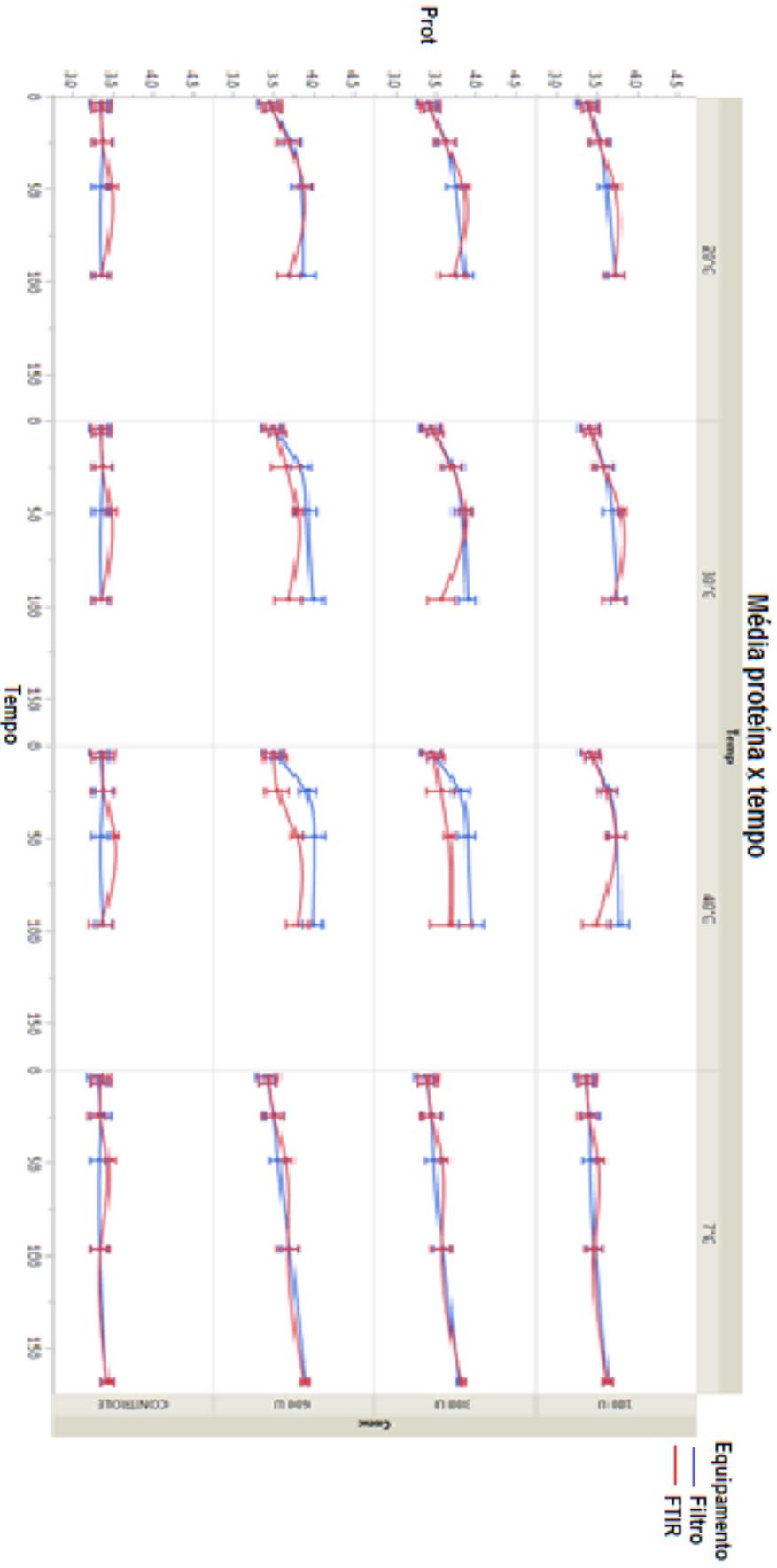


Figura 12: Efeitos da interação entre concentrações de lipase, equipamentos de espectroscopia no IV por filtro e FTIR, diferentes temperaturas de incubação sobre a leitura das médias do teor de proteína ao longo do tempo.

## 6. CONCLUSÃO

A lipólise interferiu negativamente a leitura da gordura nos equipamentos de infravermelho por filtro e FTIR.

No equipamento por filtro a variação negativa da leitura da gordura foi maior quando comparada ao FTIR, demonstrando que a técnica espectroscópica de FTIR reduz a interferência da lipólise na mensuração dos teores de gordura quando comparada a espectroscopia por filtro.

A lipólise alterou a leitura da proteína pelos equipamentos de filtro e FTIR de forma semelhante.

Foi demonstrada a importância da temperatura e do tempo de armazenamento das amostras destinadas as análises de controle leiteiro e de qualidade pelos laboratórios credenciados. As amostras devem ser armazenadas sob refrigeração e analisadas no menor tempo possível, já que após 24 horas houve queda significativa da leitura dos teores de gordura das amostras com adição de lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, M. A.; OHASHI, T. Lipolytic activity of a psychrotrophic *Pseudomonas fluorescens* isolated of raw milk and properties of its extracellular lipase. *Japanese Journal of Dairy and Food Science*, v. 45, 1996.

AIRES-BARROS, M. R.; TAIPA, M. A., & CABRAL, J. M. S. Isolation and purification of lipases. In P. WOOLEY, &

S. PETERSEN (Ed.). *Lipases: Their structure, biochemistry, and application*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994. 243–270.

ALVES, C. *Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais*. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDERSSON, R. E. Microbial lipolysis at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 39, n. 1, p.36–40, 1980.

ANDERSSON, R. E.; HEDLUND, C. B.; JONSSON; U. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, v. 62, n. 3, p. 361–367, 1979.

ANGKAWIDJAJ C.; KANAYA S. (2006). Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol Life Sci*. v.63, p.2804–2817, 2006.

ANTHONSEN, H. W.; BAPTISTA, A.; DRABL S. F.; MARTEL, P.; et. al. Lipases and esterases: A review of their sequences, structure and evolution. In M. R. EL-GEWELY (Ed.), *Biotechnology annual review*, 1995 New York, USA: Elsevier Science Publishers, 1995, p.315–371.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotólicas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS,

2003, Juiz de Fora. *Anais... Juiz de Fora: CBQL*, 2003. p.105-115.

ARCURI, E. F.; et al. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F., SILVA, P. D. L., BRITO, M. A.V. P. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v.38, p.2250–2255, 2008

ARPINGY, J. L.; Jaeger, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal*, v.343, n. 1, p. 177–183, 1999.

AULDIST, M.J.; HUBLLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Austr. J. Dairy Technol.*, v.53, p.28-36, 1998.

AZZARA, C.D.; DIMICK, P.S. Lipolytic enzyme activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. *Journal of Dairy Science*, v.68, 1804–1812, 1985.

BABCOCK, C. J. Feed Flavors in Milk and Milk Production. *Journal of Dairy Science*, v. 21, n. 10, p. 661-668, 1938.

BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase catalysed modification of milk fat. *Biotechnology Advances*, v. 16, p. 309–341, 1998

BANSAL, B.K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N.T.; et al. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *J. Dairy Res*, v. 72, p. 144–52, 2005.

BANKS, W. Milk lipids. In Utilizations of milk fat. Bulletin 260 (pp. 3–6). Brussels: International Dairy Federation, 1991.

BARBANO, D.M.; CLARK, J.L. Symposium: Instrumental methods for measuring components of milk- Infrared milk analysis - challenges for the future. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.1627-1636, 1989.

BARBOSA, L. C. A.. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189 p.

BEHMER, M. L. A., *Tecnologia do Leite – Produção, Industrialização e Análise*. SP, Nobel, 1985.

BEISSON, F.; TISS, A., RIVIERE, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: A critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 102, n. 2, p. 133–153, 2000.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Somacount 300 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.

BIGGS, D. A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L. O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infrared absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.2008, p.21-29, 1987.

BOUIS, P. Qualitative optical spectroscopic methods. In: SETTLE, F. (Ed). *Handbook of Instrumental techniques for analytical chemistry*; 1997. p. 243-283.

BRASIL. Instrução normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, *Brasília*, Seção1, p. 13, 21 de setembro de 2002.

BRASIL. Instrução normativa n.62, de 30 de dezembro de 2011. Regulamentos técnicos de produção, identidade,

qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, *Brasília*, Seção1, p. 6, 30 de dezembro de 2011.

BROCKERHOFF, H.; Jensen, R. G. Lipolytic enzymes. VII. In: Milk lipases. New York, USA: Academic Press, 1974. p. 118–129.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; et al. Composição do Leite. *Agência de Informação EMBRAPA Agronegócio do Leite*. EMBRAPA, 2009.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J. O.; NICOLAU, E. S.; et al. Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no Estado de Goiás. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UFP, 2004, p.301-306.

BURCHARD, J. F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.16-19.

CARDOSO M. *Percepção das empresas de lácteos sobre programas de pagamento por qualidade do leite e evolução dos indicadores de qualidade higiênico sanitário*. 2012. Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

CARTIER, P.; CHILLIARD, Y. Lipase redistribution in cows' milk during induced lipolysis I: Activation by agitation, temperature change, blood serum and heparin. *J. Dairy Res.*, v.56, p.699–709, 1989.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *International Dairy Journal*, v.7, n. 2/3, p. 129–140, 1997.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; et al. Características microbiológicas de leite cru e beneficiado em Belo Horizonte (MG). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.46, n.6, p.713-721, 1994.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Boas práticas de coleta e transporte de leite. *Anais do 11º Congresso Pan-Americano do Leite (FEPALE)*, Belo Horizonte, MG, 2010.

CHAMBA, J.-F.; PERREA, E. Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Le Lait*, 82, 33–44, 2002.

CHAVARRI, F.; SANTISTEBAN, A.; VIRTO, M.; DE RENOBLES, M. Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2926–2932, 1998.

CHEFTEL, J. P.; CHEFTEL, H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. In: *Los principales sistemas bioquímicos alimentarios - comportamiento durante los tratamientos*. Zaragoza: Ed. Acirbia, 1992, v.1, cap.2, p.43-63

CHEN, L. *Thermophilic enzymes and their impact on milk powder during storage*. 2000. Ph.D. thesis. Hamilton, New Zealand: University of Waikato.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders.

*International Dairy Journal*, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

CHIRSTEN, G. L.; WANG, W. C.; REN, T.J. Comparison of the heat resistance of bacterial lipases and proteases and the effect on ultra-high temperature milk quality. *Journal of Dairy Science*, v.69, 2769–2778, 1986.

CHRISTIE, W. W. (1995). Composition and structure of milk lipids. In FOX P. F. (Ed.), *Advanced dairy chemistry—2—Lipids*. London: Chapman & Hall. 1995. p. 1–36.

CIESLAK, A.; KOWALCYK, J.; CZAUDERNA, M.; et al. Enhancing unsaturated fatty acids in ewe's milk by feeding rapeseed or linseed oil, *Czech Journal of Animal Science*. v. 55, n. 11, p. 496-504, 2010.

CIMIANO, P. C. Panorama geral dos métodos instrumentais para análise dos constituintes do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.29, n.176, p. 16-22, 1974.

COUSIN, M.A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology of milk*. London: Applied Science Publishers, 1991. p.119-163.

COATES, J. Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for infrared and Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.33, p.267-425, 1998.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*. v.47, 1992.

CRUZ, A. G; et al. Pré requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada.

*Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1. p. 104-109, 2006.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotólicas. *Indústria de Laticínios*, p. 71-73, 2000.

DECKELBAUM, R. J.; HAMILTO, J. A.; MOSAR, A.; et al. Medium-chain versus long chain triacylglycerol emulsion hydrolysis by lipoprotein lipase and hepatic lipase: Implications for the mechanisms of lipase action. *Biochemistry*, v.29, p. 1136–1142. 1990.

DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk, *International Dairy Journal*, v.16, n.6, p. 555-562. 2006

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C. H. Factors governing the susceptibility of milk to spontaneous lipolysis. In: PROCEEDINGS OF THE LIPOLYSIS SYMPOSIUM. 1975. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. IDF Bulletin. n 86. p. 24–34.

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C. H. Lipolysis in dairy products: A review. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 31, n.6, p. 53–63, 1976.

DEETH, H. C.; TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55, p. 153–168, 2000.

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *Journal of Dairy Research*, v.64, p.271-280, 1997.

DRAAIYER, J.; DUGDILL, B., BENNETT, A., MOUNSEY, J. Milk testing and payment systems. Resource

Book: a practical guide to assist milk producer groups. Rome: FAO, 2009. 77 p.

Driessen, F. M. Heat-induced changes in milk. Brussels: International Dairy Federation. . Bulletin 238, 1989.

DURIG, J. R.; SULLIVAN, J. F. Vibrational spectroscopy, Fourier transforms and analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.4, p.104-106, 1990.

EIKREM, L. O. Process Fourier transform infrared spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.4, p.107-109, 1990.

EMBRAPA. GADO DE LEITE. *Estatísticas do leite*. Juiz de Fora, 2009. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br>>. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2016.

ENEROTH, A.; et al. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*, v.10, p.325-331, 2000.

ETZION, Y.; LINKER, R.; COGAN, U.; et al. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared / attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of dairy science*, v. 87, p. 2779-2788, 2004.

FAGUNDES, M. C.; FISCHEN, V.; DA SILVA, W. P. et al. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Anais... XXI Congresso Nacional de Laticínios*. Juiz de Fora, 2004. p.290-293.

FITZ-GERALD, C. H.; DEETH, H. C. Factors influencing lipolysis by skim milk cultures of some psychrotrophic

microorganisms. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 38, p. 97–103, 1983.

FITZ-GERALD, C. H.; DEETH, H. C., COGHILL, D. M. Low temperature inactivation of lipases from psychrotrophic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 37, n. 6, p. 51–54, 1982.

FITZ-GERALD, C. H.; DEETH, H. C.; KITCHEN, B.J. The relationship between the levels of free fatty acids, lipoprotein lipase, carboxylesterase, *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, somatic cell count and other mastitis indices in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, v. 48, n. 02, p. 253-265, 1982.

FOLMER, D. M.; SOUTO, L. I. M. Avaliação das condições de Boas Práticas na coleta e transporte de Leite Cru a granel. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v. 13, n. 3, p. 386-393. 2010.

FONSECA, C. S. P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FONSECA, L. F. L.; CARVALHO, M. P. L.; *Política & Derivados*. São Paulo: Quiron Livros, 2004. 181p.

FONSECA, L. F. L.; PEREIRA, C. C.; CARVALHO, M. P. L. Qualidade microbiológica do leite. In: INTERLEITE - SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 4, 1999, Caxambu. *Anais...* São Paulo: Instituto Fernando Costa, 1999, p. 36-43.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FONSECA, L. M.; RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; et al. Situação

- da qualidade do leite cru em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3, Recife. *Anais...* CCS-Gráfica: 2008.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. 2000.
- FOX, P. F.; STEPANIAK, L. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *Journal of Dairy Research*, v. 50, n.1, p.77–89, 1983.
- GARCIA O.A.; AUGUSTO C. P. P.; FERREIRA M. S. K.; et al. Study of the degree of importance and acceptability of milk samples with off flavors. *Braz. J. Food Technol.* V. 6, p. 91-97, 2010.
- GARGOURI, A.; HAMED, H., ELFEKI, A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with lipolysis. *Livestok Sicence*, v.113, p. 274–9, 2008.
- GÖKBULUT A.A., ARSLANOGLU A. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from psychrotolerant *Pseudomonas fluorescens* KE38. *Turk J Biol.* v.37, p.538-546, 2013.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELLI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. UFRGS, Porto Alegre, 2001. 72p.
- GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Proteolysis in milk: The significance of proteinases originating from milk leucocytes and comparison of the action of leucocyte bacterial and natural milk proteinases on casein. *J.Dairy Res*, v.52, p.101-112, 1985.
- GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. *Journal of Food Protection*, v.59, n.9, p.790-792, 1990.
- GRIPON, J. C. (1993). Mould-ripened cheeses. In P. F. FOX (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. 2 ed. London: Chapman & Hall. 1993, v. 2, p. 111–136.
- GUIMARÃES, C. P. A.; MESQUITA, A. J. M.; COELHO, K. O.; et al. Influência da adoção do pagamento por qualidade sobre a contagem bacteriana total do leite cru. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE (CBQL), Goiás. *Anais...* Goiânia. p.1-3, 2006.
- GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 37, p. 63-71, 2003.
- HANUŠ, O.; VEGRICH, J.; FRELICH, J.; MACEK, A.; BIELKA, M.; LOUDA, F.; JANOU, L. Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. *Czech Journal Animal Science*, v.53, 17–30, 2008.
- Haraldsson, G. G.; Marine Lipids Biotechnology 1991, 7, 337.
- HARALDSSON, G.G., The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. *Marine lipids Biotechnology*, v.118, 155-170, 2004.
- HARDING, F. Milk quality. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165 p.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2103–12, 1994.

- HARMON, J. R. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.7-15.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HELPER, G. A.; FERRAO, M.F.; FERREIRA, C.V.; et al. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 779-786, 2006.
- HEWAVITHARANA, A. K.; BRAKEL, B. Fourier Transform Infrared Spectrometric Method for the Rapid Determination of Casein in Raw Milk. *Analyst*, v. 122, p. 701-704, 1997.
- HOHE, K. A.; DIMICK, P. S.; KILARA, A. Milk lipoprotein lipase distribution in the major fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v.68, n.5, p. 1067–1073, 1984.
- HOMSEY, C. Discovering Dairy Flavors. *Food Product Design*, 2000
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, p. 155-170, 2004.
- HURLEY, P. I.; COLEMAN, C. R.; IRELAND, E. H.; et al. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 7, p. 805-812, 2006.
- International Dairy Federation (IDF). *Payment systems for ex-farm milk*. Brussels: International Dairy Federation, 2006. 106 p. Bulletin 403, 2006.
- International Dairy Federation. *Standard 100B:1991: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C*. Bruxelas, 1991, 3 f.
- International Dairy Federation (IDF). *International Standard FIL-IDF 1<sup>a</sup>*, 1969.
- International Dairy Federation (IDF). *International Standard 141 C*, 2013.
- INON, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 513, p. 401-412, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. *Indicadores IBGE, Estatística da produção pecuária*, Setembro de 2015.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1019-1032, 2008.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; et al. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, n.1, p. 29–63, 1994.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; et al. Bacterial lipases for biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, p. 3-12, 1997

- JANDAL, J. M. (1996). Effects of some thermal, chemical and mechanical treatments on lipase activity in Shammi goat milk. *Small Ruminant Research*, v. 20, n. 1, p. 275, 1996.
- JANKOVSKÁ, R.; ŠUSTOVÁ, K. Analysis of Cow Milk by Near-infrared Spectroscopy. *Czech Journal of Food Science*, v.21, p.123–128, 2003.
- JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; Clark, R. M. Determination of lipase specificity. *Lipids*, v.18, n.3, p. 239–252, 1983.
- JENSEN, R. G.; FERRIS, A. M.; LAMMI-KEEFE, C. J. The composition of milkfat. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 9, p. 3228–3243. 1991
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 457–470, 2008.
- JÚNIOR, T. P. E.; LOPES, A. M.; MENDES, R. J. Effect of payment for milk quality on the profitability of dairy farming. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 70, n. 1, p. 24–34, 2015.
- KALASINSKY, K. S. Industrial applications of vibrational spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.3, p.83–89, 1990.
- KAYLEGIAN, K. E.; LYNCH, J.M.; FLEMING, J. R.; BARBANO, D. M. Lipolysis and Proteolysis of Modified and Producer Milks used for Calibration of Mid-Infrared Milk Analyzers. *J. Dairy Sci*, v. 90, p.602–615, 2007.
- KEHRLI, M.E., SHUSTER, D.E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.77, p. 619–27, 1994.
- KELLY, A.L, TIERNAN D., O’SULLIVAN, C., JOYCE, P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *Journal of Dairy Science*, v.4, p. 83–300, 2000.
- KITCHEN, B.J. Reviews of the progress of dairy Science: Milk compositional changes and related diagnostics tests. *Journal Dairy Research*, v.48, p. 167–188, 1981.
- KON, H.; SAITO, Z. Factors causing temperature activation of lipolysis in cow’s milk. *Milchwissenschaft*, v.52, n.8, p. 435–440, 1997.
- KERKHOF, M.; KOOPS, M. F., J.; NEETER, R.; et al. Routine testing of farm tank milk with the Milko-Scan 203. I. Calibration procedure and small-scale experiments. *Neth. Milk Dairy J*, v. 36, p. 115–133, 1982.
- KUMURA, H., MIKAWA, K.; SAITO, Z. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Journal of Dairy Research*, v. 60, n. 2, p. 229–237, 1993.
- LANHER, B. S. Evaluation of Aegys MI 600 Fourier transform infrared milk analyzer for analysis of fat, protein, lactose, and solids nonfat: a compilation of eight independent studies. *Journal of AOAC International*, v. 79, p. 1388–1399, 1996.
- LAW, B. A.; SHARPE, M. E.; CHAPMAN, H. R. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43(3), 459–468, 1976.
- LINDMARK-MANSSON, H., BRANNING, C., ALDEN, G., PAULSSON, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte

populations and milk components in bovine udder quarter milk. *International Dairy Journal*, v.16, 717–27, 2006.

LORENZETTI, D. K. *Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul*. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MA, Y., RYAN, C., BARBANO, D.M., GALTON, D.M., RUDAN, M.A., BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v.83, p. 264–274, 2000.

MACRAE, A. R. (1983). Extracellular microbial lipases. In W. M. FOGARTY (Ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. New York, USA: Applied Science Publishers. 1983, p. 225–249.

MARTINS, L. M.; PINTO, M. U.; RIEDEL, K.; et al. Milk deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* O41 isolatade from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 207-217, 2015.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, v.52, n. 2, p. 59–62, 1999.

MACHADO, P.F. Pagamento do leite por qualidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2008, Recife. *Anais...* Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. p.183-191.

MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D.; COLDEBELLA, A. et al. Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste – São Paulo. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO

PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p. 39-45.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MAKHZOUM, A.; OWUSU-APERTEN, R. K.; KNAPP, J. S. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *International Dairy Journal*, v. 6, n. 5, p. 459–472, 1996.

MCPHERSON, A. V.; KITCHEN, B. J. (1983). Reviews of the progress of dairy science: The bovine milk-fat globule membrane-its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 50, p. 107–133, 1983.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUZA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, v. 80, p. 293–324, 2000.

MILLER, B.; PUHAN, Z. Lipolysierbare/Fett als Indikator für die Fettschädigung in der Rohmilk, *Schweiz Milchwissenschaft Forschung*, v. 15, n.1, p. 10-17, 1985.

MOLIMARD, P.; SPINNLER, H. E. Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169–184, 1996.

MONARDES, H. Programas de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE,

1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.40-43.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F. et al. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.25-31, 2005.

MOUNCHILIA, A.; WICHTELA, J. J.; DOHOOA, I. R.; et al. Risk factors for milk off-flavours in dairy herds from Prince Edward Island, Canada. *Preventive Veterinary Medicine, Prince Edward Island*, v. 64, p. 133-145, 2004.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: factors influencing raw and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v.49, p.24-32, 1996.

National Mastitis Council. 1996. *Current concepts of bovine mastitis*, 4th ed. NMC. Madison, WI.

NIELSEN, S. S. Plasmin system microbial proteases in Milk: Characteristics, roles and relationship. *J. Agri. Food Chem*, v. 50, p. 6628-6634, 2002.

NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 63, n. 1, p.41-46, 2010.

OLIVEIRA, M. C.P. P. *Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite*. Dissertação mestrado Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2011.

OUATTARA, G. C.; JEON, I. J.; HARTTHAKUR, R. A.; SCHMIDT, K. A. Fatty acids released from milk fat by lipoprotein

lipase and lipolytic psychrotrophs. *Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology*, v.68, n. 8, p. 659–664, 2004.

O’SULLIVAN, D. W.; HEIKES, B. G.; LEE, M.; et al. Distribution of hydrogen peroxide and methylhydroperoxide over the Pacific and South Atlantic Oceans. *Journal of Geophysical Research*, n. 104, 1999.

PARODI, P. W. Detection of synthetic and adulterated butterfat 3. Triacylglycerol and fatty acid analysis. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 26, p. 155–158, 1971.

PEREIRA, J. F. N. *Comparação de métodos de enumeração e de estimativa de micro-organismos psicotróficos em leite cru e avaliação do método de Moseley*. 2002. 36 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PICININ, L. C. A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 2003. 89 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.28-35.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Ed. Milkbizz, 2002. 188p.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; et al. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF J. W.; BUSS, H. Qualidade de leite. In BITENCOURT, D.; PEGORARO, L.M.C; GOMES J.F. Sistemas de pecuária de leite: uma visão do clima temperado. Pelotas: Embrapa clima temperado, p. 175-195, 2000.

ROBERTSON, N. H.; DIXN, A.; NOWERS J. H.; et al. The influence of lipolysis, pH and homogenization on infrared readings for fat, protein and lactose. *S. Afr. J. Dairy Technol*, v.13, p. 3–7, 1981

RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of dairy products by nearinfrared spectroscopy: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, n.8 p. 2815–2818, 1997.

RODRIGUES L. N. *Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaco de cana de-acucar pré-tratados para a produção de etanol celulósico*. Dissertação (Mestrado em física). Universidade Federal de Juiz de Fora. 2012

SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho, 1.ed. Unesp: São Paulo, 223p., 1996.

SALOMÃO, C. S. V. *Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru*. 2012, 49f. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicotróficos em leite. *Revista Higiene*

*Alimentar*, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.

SANTOS, E. L.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L.R. Psicotróficos: Consequências de sua presença em leites e queijos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*. v. 33, n.2, p. 129-138, 1999.

SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R. et al. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. *Ciência Rural*, v.36, n.5, p. 1486- 1493, 2006.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2491- 2503, 2003.

SANTOS, M. V., MA, Y., CAPLAN, Z., BARBANO, D. M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, v.86, 1601–1607, 2003.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, v.52, p. 1-18, 2003.

SCALCO, A. R. *Diagnóstico, Análise e Proposições para a Gestão da Qualidade na Agroindústria de Laticínios do Estado de São Paulo*. 1999. 149 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.* v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHAMSUZZAMAN, K.; MODLER, W.; MCKELLAR, R. C. Survival of lipase

during manufacture of nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science*, v.70, n. 4, p. 746–751, 1986.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHIMIZU, S.; KOJIMA, Y.; KOBAYASHI, M. A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: Gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. *J Biosci Bioeng*, v. 96, p.242–249, 2003.

SHIPE, W. F. Analysis and control of milkflavor. In G. CHARALAMBOUS (Ed.), *The analysis and control of less desirable flavors in foods and beverages*. New York, USA: Academic Press. 1980. 201–239.

SIDHU, P.; SHARMA, R.; SONI, S. K.; GUPTA, J. K. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. *Folia Microbiology*, v.43, n.1, p. 51–54, 1998.

SILVA, N.M.A. *Influência da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total do leite cru no rendimento da produção de queijos utilizando a metodologia em escala reduzida*, 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVEIRA, T. M. L. *Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino*. 2002. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER G. C. 1967. Carboxylate anion. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.

SKOOG, D. A.; LEARY, J.J. Principles of Instrumental Analysis, 4.ed., Saunders: London, 1992.

SOMERS, J.M.; O'BRIEN, B.; MEANEY, W.J.; KELYY, A.L. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. *J.Dairy Res*, v.70, p. 45–50, 2003.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 35-37, 1997.

STEAD, D. Microbial lipases: Their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research*, v. 53, n. 3, p. 481–505, 1986.

STRYER, L. Biochemistry (3rd ed.). New York: W.H. Freeman and Company. 1988.

TOUSOVÁ, R.; STÁDNÍK, L.; DUCHÁČEK, J. Effect of season and time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat, *Czech Journal of Food Sciences*, v.31, n.1, p. 20-26, 2013.

TREVISAN, H.C. Lipases. In SAID, S e PIETRO R.C.L.R. (ed) *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap 7. P-115-135.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. Judging and Scoring Milk and Cheese. Farmers' Bulletin, Washington, n. 2259.

URBACH, G. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology*, v. 50, p. 79–89, 1997.

- VAN DE VOORT, F. R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, v.25, p. 397-403, 1992.
- VAN DE VOORT, F. R.; KERMASHA, S.; SMITH, J. P.; et al. A study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. *J. Dairy Sci*, v. 70, p. 1515–1523, 1987
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Milk and Milk products: Technology, chemistry and microbiology*. Londres: Chapman & Hall, 1994. p. 1-34.
- VUFSON, E. N. Industrial applications of lipases. In P. WOOLEY, S. B. PETERSEN (Eds.), *Lipases: Their structure, biochemistry and application*. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1994. P. 271–313.
- VYLETELOVÁ, M.; FICNAR, J.; HANUS, O. Effects of lipolytic enzymes *Pseudomonas fluorescens* on liberation of fatty acids from milk fat, *Czech Journal of Food Science*, v.18, n. 5, p. 175-182, 2000.
- VYLETELOVÁ, M.; HANUS, O.; PÁCOVÁ, Z.; et al. Frequency of Bacillus bacteria in raw cow's milk and its relation to other hygienic parameters. *Czech Journal of Animal Science*, v. 46, p. 260-267, 2001.
- WEHLING, R. L. *Introduction to the chemical analysis of foods*. S. Suzanne Nielsen. 1994.
- WILLIAMS, P. C. Commercial Near-Infrared Reflectance Analyzers. In: WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H. (Ed) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987. p.1074-142.
- WIKING, L.; NIELSEN, J.H.; BAVIUS, A. K.; et al. Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition, *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 3, p. 1004-1009, 2006.
- ZHANG J. W.; ZENG, R. Y. Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp 7323. *Mar Biotechnol*, v.10, p. 612–621, 2008.
- ZECCONI, A., BRONZO, V., PICCININI, R., SPREAFICO, G., RUFO, G. Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes. *J Dairy Res*, v.61, 271–9, 1994.