

EMANUELA KARLA FERREIRA RIBEIRO RODRIGUES

**ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE
ESTERILIZADO ADICIONADO DE ESTABILIZANTES DURANTE A
ESTOCAGEM**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: **Prof. Eduardo Robson Duarte**

Montes Claros

2012

Rodrigues, Emanuela Karla Ferreira Ribeiro.

R696a 2013 Alterações nas propriedades físico-químicas do leite esterilizado adicionado de estabilizantes durante a estocagem / Emanuela Karla Ferreira Ribeiro Rodrigues. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2013.

62 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Luiz Carlos Gonçalves Costa Junior, Igor Viana Brandi, Eduardo Robson Duarte, Maximiliano Soares Pinto.

Inclui bibliografia: f. 57-62.

1. Laticínios - Estocagem. 2. Leite - Estabilizante. 3. Sedimentos. I.

Eduardo Robson Duarte. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

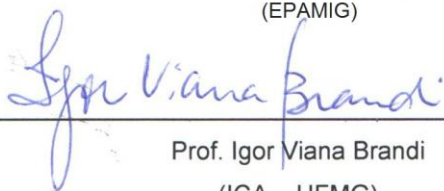
CDU: 637.1

EMANUELA KARLA FERREIRA RIBEIRO RODRIGUES

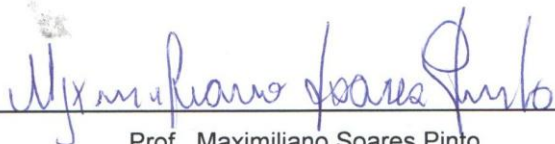
ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE
ESTERILIZADO ADICIONADO DE ESTABILIZANTES DURANTE A
ESTOCAGEM



Prof. Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior
(EPAMIG)



Prof. Igor Viana Brandi
(ICA – UFMG)



Prof. Maximiliano Soares Pinto
Co-orientador (ICA – UFMG)



Prof. Eduardo Robson Duarte
Orientador (ICA – UFMG)

Aprovada em 20 de dezembro de 2012.

Montes Claros

2012

A Deus;
a minha família, em especial aos meus pais,
Manoel Carlos (*in memoriam*) e Dilma;
ao meu esposo Rodrigo e ao meu filho Gabriel
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por mais esta conquista: “*A Ele louvores e Glória...*”

Ao professor Maximiliano Soares Pinto, por possibilitar a realização desta pesquisa, pela orientação e ensinamentos durante esses dois anos.

Ao professor Eduardo Robson Duarte, pelas sugestões e apoio.

Ao professor Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelos ensinamentos transmitidos e pela colaboração essencial desde a concepção do trabalho até a análise dos resultados.

Ao professor Magnel Oliveira Lima, pela valiosa contribuição quanto ao auxílio na interpretação dos resultados estatísticos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório: Cris, Paty, Renata, Priscilla e Bela. Serei eternamente grata pela contribuição de vocês.

Às amigadas conquistadas ao longo desses dois anos: Danny Malveira, Anne Karoene, Bruna Amaral e Thalyta.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à Coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias, pela acolhida e ensinamentos.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA).

À Capes-REUNI, pela bolsa concedida durante esses dois anos de pesquisa.

Ao Rodrigo, meu esposo, pelo seu companheirismo e amor! Gabriel, meu filho, razão da minha vida!

À minha família, pela ajuda constante e o amor incondicional. Em especial, à minha mãe Dilma, pelas suas orações, companheirismo e por me ensinar a não desanimar diante dos problemas que a vida oferece.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Muito obrigada.

RESUMO

Embora poucos trabalhos tenham avaliado as alterações que podem ocorrer no pH do leite, submetido a altas temperaturas, adicionado de citratos e fosfatos, e as interações sobre as propriedades físico-químicas, sobretudo, durante a estocagem, a legislação brasileira permite a adição desses estabilizantes em leite UHT com a finalidade de minimizar a sedimentação e a gelificação que limitam o prazo de validade desse produto lácteo. Neste trabalho foi avaliado o efeito da adição de citrato de sódio (TSC), citrato tripotássico (TKC), fosfato dissódico (DSP) e fosfato dipotássico (DKP) em diferentes concentrações, quanto a concentração de cálcio iônico [Ca^{2+}], a estabilidade ao etanol e a formação de sedimentos sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados em *software* R sendo a variável resposta o pH e as variáveis explicativas (concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e sedimentação) entre os estabilizantes e as concentrações durante a estocagem. Seguido de análise de variância, com aplicação da análise de contraste ($p < 0,05$). Concluiu-se que a adição dos estabilizantes influenciaram o pH do leite esterilizado durante a estocagem. Houve decréscimo no valor de pH ao longo da estocagem para todos os tratamentos, exceto o DSP. As propriedades físico-químicas (concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e sedimentação) afetaram o pH do leite adicionados de estabilizantes, considerados fatores importantes nas alterações de pH. Ocorreram alterações no pH quanto à estabilidade ao etanol, aumentou a resistência alcoólica (40 a 50 dias) seguido de decréscimo progressivo durante o armazenamento para os estabilizantes, exceto DSP. Houve aumento da formação de sedimentos em baixas concentrações de etanol, independe dos estabilizantes adicionados no leite. As concentrações dos estabilizantes não influenciaram na redução do cálcio iônico, no aumento da estabilidade ao etanol e na redução da formação de sedimentos durante a estocagem. As concentrações do TKC não foram diferentes do controle quanto à redução do pH do leite esterilizado ao longo da estocagem, o que sugere a ineficiência deste aditivo quanto ao pH. Os fosfatos são ácidos e apresentaram alterações diferentes no pH do leite. O pH alterou o comportamento da estabilidade ao etanol e do cálcio iônico durante a estocagem, após 60 dias, independente dos estabilizantes nas concentrações avaliadas.

Palavras-chave: Estabilidade térmica. Sedimentos. Cálcio iônico. Citratos. Fosfatos. Leite UHT.

ABSTRACT

Although there are few studies that assess changes that may occur in the pH of milk subjected to high temperatures, added citrate and phosphates, and interactions on the physicochemical properties, especially during storage, Brazilian legislation allows the addition of these stabilizers in milk in order to minimize sedimentation and gelation limiting the shelf life of dairy products. This study evaluated the effect of addition of sodium citrate (TSC), tripotassium citrate (TKC), disodium phosphate (DSP) and dipotassium phosphate (DKP) in different concentrations, as the concentration of ionic calcium [Ca^{2+}], ethanol stability and the sediment formation on the pH of the sterilized milk during storage. The design of the experiment was completely randomized. The data were analyzed in software R is the response variable and the explanatory variables pH (concentration of ionic calcium, ethanol stability and sedimentation) between the stabilizers and the concentrations during storage. Followed by analysis of variance with application of contrast analysis ($p < 0.05$). It was concluded that the addition of the stabilizers affect pH of sterilized milk during storage. There was a decrease in pH during the storage for all treatments except the DSP. The physico-chemical (calcium ion concentration, ethanol stability and sedimentation) affected the pH of the milk added stabilizers, considered important factors in the changes of pH. Alterations in pH on stability ethanol, increased resistance alcohol (40 to 50 days) followed by a progressive decrease during storage stabilizers, except DSP. There was increased formation of sediments at low concentrations of ethanol, independent of added stabilizers in milk. The concentrations of stabilizers not influence the reduction of calcium ion in ethanol at increasing the stability and reducing the formation of sediments during storage. TKC concentrations were not different from control in reducing the pH of the sterilized milk during the storage, which suggests the inefficiency of this additive on the pH. Phosphates are presented acids and various changes in the pH of the milk. The pH changed the behavior of stability to ethanol and ionic calcium during storage, after 60 days, regardless of stabilizing concentrations evaluated.

Keywords: Heat stability. Sediment. Ionic calcium. Citrates. Phosphates. UHT milk.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Aspectos históricos mercadológicos do leite UHT	11
2.2 Aspectos tecnológicos do leite UHT	12
2.3 Constituintes do leite e efeitos sobre o calor	14
2.3.1 Considerações sobre as proteínas do leite	16
2.3.2 Sais no leite	19
2.4 Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite	22
2.4.1 pH	22
2.4.2 Cálcio iônico	24
2.4.3 Estabilidade do etanol	26
2.4.4 Adição de sais estabilizantes	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Materiais	32
3.2 Adição dos estabilizantes e esterilização	32
3.3 Análises realizadas durante a estocagem do leite esterilizado	34
3.3.1 Determinação da concentração de cálcio iônico	34
3.3.2 pH	34
3.3.3 Estabilidade ao etanol	35
3.3.4 Determinação das massas de sedimentos	36
3.4 Delineamento experimental e análise estatística dos dados	36
3.4.1 Efeito da adição dos estabilizantes	37
3.4.2 Efeito da concentração dos estabilizantes	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Efeito da adição dos estabilizantes e das propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem	38

4.2 Efeito da concentração dos estabilizantes quanto às propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem	48
5 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Leite UHT (*ultra high temperature*) ou UAT (*ultra-alta temperatura*) é o produto lácteo com maior aceitação nacional por ter comodidade de estocagem sem refrigeração e prazo de validade longo quando comparado com o leite pasteurizado, o que promoveu aumento significativo da comercialização nos últimos anos (VIANNA *et al.*, 2012). Em 2010, a produção foi 5,430 bilhões de litros, o equivalente a 75,5% do volume total do leite fluido, enquanto o leite pasteurizado representou 24,5% do volume total, o que correspondeu a 1,760 bilhões de litros vendidos (ABLV, 2011).

Face à importância econômica desse leite fluido e o uso de técnicas mais avançadas, como é o processo UHT, é fundamental a exigência por matéria-prima de qualidade capaz de suportar os tratamentos térmicos. Além disso, a instabilidade térmica da matéria-prima pode ocasionar a floculação do leite nas superfícies dos trocadores de calor, bem como a formação de sedimentos e gelificação durante a estocagem, o que pode levar à rejeição pelo consumidor.

Diversos trabalhos têm relacionado o aumento da formação dos sedimentos à perda progressiva de estabilidade protéica no leite submetido a tratamentos térmicos (BOUMPA *et al.*, 2008; KELLY *et al.*, 2006; SILVA, 2004). Quando o leite é aquecido, ocorre a redução do pH, o que diminui as repulsões eletrostáticas, causando desestabilização das micelas de caseínas, com deposição de fosfato de cálcio e aumento da concentração de cálcio iônico (SINGH, 2004). Logo, o pH e cálcio iônico são fatores essenciais para o controle da estabilidade térmica do leite em altas temperaturas (TSIOULPAS *et al.*, 2010; BOUMPA *et al.*, 2008; TSIOULPAS *et al.*, 2007), que também são influenciados pela capacidade tamponante do leite (TSIOULPAS *et al.*, 2010).

A adição de citratos e fosfatos, antes do processo UHT tem sido alternativa para minimizar a sedimentação e a gelificação, que limitam a vida de prateleira do leite UHT (KELLY *et al.*, 2006). Nesse sentido, a legislação brasileira, permite a adição de sais estabilizantes (citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio combinados ou

não) no leite UHT em até 0,1% (BRASIL, 1997). Diversos autores citam que esses agentes quelantes de cálcio aumentam a estabilidade térmica do leite, pois sequestram o cálcio iônico, reduzindo o cálcio disponível, além de unirem com a caseína para estabilizar as micelas, para evitar a precipitação (TSIOULPAS *et al.*, 2010; BOUMPA *et al.*, 2008; GAUCHERON, 2005; PASTORINO, 2003; UDABAGE *et al.*, 2001). A escolha de um estabilizante não é fácil, e esses são considerados eficazes quando reduzem moderadamente o cálcio iônico e não aumentam o pH indevidamente, para evitar o escurecimento, antes e após a esterilização e durante o armazenamento (TSIOULPAS *et al.*, 2010).

Estudos recentes mostram que cada estabilizante pode apresentar efeitos diferentes para o pH, a estabilidade ao etanol, a concentração do cálcio iônico e a sedimentação. A medição de pH, Ca^{2+} e estabilidade ao etanol representam análise efetiva dos efeitos dos estabilizantes no leite (PATHOMRUNGSIYOUNGGUL *et al.*, 2010; TSIOULPAS *et al.*, 2010).

Poucos relatos na literatura apontam o efeito da adição de estabilizantes em leite, adquiridos de cooperativas, submetido a altas temperaturas e as interações sobre as propriedades físico-químicas, sobretudo, ao longo da estocagem. Pesquisas científicas devem ser conduzidas para assegurar a eficiência do uso de estabilizantes em leite esterilizado para que não ofereçam riscos à saúde do consumidor. A hipótese deste trabalho é que a adição de estabilizantes pode não minimizar os defeitos de sedimentação e alterações no pH durante a estocagem do leite bovino submetido ao processo de esterilização. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o impacto da adição de diferentes estabilizantes quanto às propriedades físico-químicas do leite esterilizado ao longo da estocagem. Os objetivos específicos foram: a) avaliar o efeito da adição dos estabilizantes, quanto a concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e sedimentação sobre o pH do leite esterilizado durante o armazenamento; e b) avaliar o efeito da concentração dos estabilizantes quanto às propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos históricos mercadológicos do leite UHT

Leite UHT (*ultra high temperature*) ou UAT (ultra-alta temperatura) ou longa vida é definido como sendo um fluido homogeneizado e submetido, durante dois a quatro segundos, à temperatura 130°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O leite UHT foi introduzido no Brasil em 1972 após 10 anos do seu lançamento na Europa. A baixa participação no mercado brasileiro até o início da década 90 ocorreu pela falta matéria-prima, carga tributária elevada, comercialização restrita às padarias e baixos investimentos para sua produção (ABLV, 2011).

Com a implantação do Plano Real em 1994, a cadeia agroindustrial do leite sofreu mudanças importantes que possibilitou abertura da economia e liberação de preços e, conseqüentemente, aumento na produção do leite UHT. No período de 1994 a 1997, o aumento do salário mínimo proporcionou maior poder de compra e elevado consumo de lácteos, principalmente aqueles com maior valor agregado, tais como queijos, iogurtes e sobremesas lácteas. O leite longa vida, neste período, triplicou o consumo de 730 milhões de litros para 2,450 bilhões (ABLV, 2011; SILVA 2004).

Significativas mudanças ocorreram no mercado de lácteos que refletiram positivamente para maior participação do leite UHT nos lares brasileiros, dentre estas, a comercialização deste produto nos supermercados. Isto inferiu várias vantagens ao consumidor, tais como praticidade, diversidade e preço competitivo (ABLV, 2011).

Para Révillion (2000), a longevidade comercial do leite UHT, aliado à facilidade de estocagem sem refrigeração, permitiram às indústrias laticinistas manter estoques para aproveitar os ciclos de preços mais favoráveis. Este foi um dos fatores para a consolidação do mercado, principalmente em regiões onde a entressafra (abril a julho) provoca a

diminuição da produção de leite e elevados preços da matéria-prima durante este período.

2.2 Aspectos tecnológicos do leite UHT

O tratamento térmico UHT é uma técnica de conservação de alimentos líquidos por meio da sua exposição ao calor intenso por rápido período de tempo com o objetivo de eliminar os micro-organismos patogênicos e garantir a inativação das enzimas. Pode ser empregado para processar alimentos que contenham partículas pequenas, como alimentos infantis, produtos de tomate, suco de frutas e sobremesas de arroz (LEWIS; DEETH, 2009).

Essa tecnologia foi difundida após o desenvolvimento de um novo sistema de embalagem previamente esterilizada, de fechamento hermético e impermeável à luz e ao oxigênio. Este material promoveria a preservação de alimentos de origem animal ou vegetal sem necessidade de refrigeração, resultando em uma grande evolução na indústria de alimentos e na facilidade para o consumidor armazenar, em temperatura ambiente, diversos produtos por longo período (PRATA, 1998).

Inicialmente, o leite cru é pasteurizado (73° a 75 °C por 15 segundos) seguido de um resfriamento imediato, para eliminar as bactérias psicrotróficas e as enzimas termoestáveis por elas produzidas (BASTOS, 1999). Nesta etapa, deve-se avaliar a acidez, a densidade, a gordura e a crioscopia do leite, visando sua liberação para o tratamento por UHT (PRATA, 1998).

Considerando-se que o método UHT exerce um efeito mais severo no momento do tratamento térmico, exige-se que a matéria-prima possua alta estabilidade térmica. Logo, exposição de leite instável a altas temperaturas pode causar a floculação deste no trocador de calor. Isto ocasiona ineficiência operacional pela perda da troca de calor e interrupções frequentes para efetuar a limpeza dos equipamentos (MACHADO, 2010).

Uma das alternativas para a indústria minimizar os problemas da baixa estabilidade do leite é a adição de citratos e/ou fosfatos em até 0,1% expressos em P_2O_5 após a pasteurização do leite (MACHADO, 2010;

BRASIL, 1997). Esses sais estabilizantes têm a finalidade de sequestrar o cálcio iônico, estabilizar a caseína para evitar a precipitação das micelas, aumentar o pH e reduzir a formação de sedimentos durante a estocagem do leite UHT (TSIOULPAS *et al.*, 2010; GAUCHERON, 2005; PASTORINO, 2003).

Silva (2004) verificou que as indústrias empregam-se normalmente uma quantidade de 40 mg/100mL de citrato de sódio, embora não se deve adicionar quantidades excessivas e desnecessárias, visto que é recomendável o conhecimento prévio do teor natural de citrato no leite cru e de suas variações ao longo das estações do ano.

O leite pasteurizado pode ser submetido a dois processos UHT diferentes, dependendo do sistema que a indústria possui: tratamento direto ou indireto. No sistema direto, o produto entra em contato direto com o meio de aquecimento, seguido de um resfriamento instantâneo em câmara de vácuo e, eventualmente, o resfriamento adicional indireto até atingir a temperatura de envase. O sistema direto é dividido em dois sistemas: de injeção de vapor (vapor injetado no produto) e de infusão de vapor (o produto é introduzido numa câmara de vapor). O sistema de aquecimento direto apresenta uma maior agilidade no processo de aquecimento e resfriamento, o que reduz a possibilidade de mudanças físicas e químicas que poderiam ocorrer durante o tratamento UHT convencional (indireto) (LEWIS; DEETH, 2009; FELLOWS, 2006; SILVA, 2004). Entretanto, o sistema direto possui algumas limitações: é adequado para produtos de baixa viscosidade; o vapor utilizado deve ser de alta qualidade (potável) para evitar o desenvolvimento de sabor e aroma indesejáveis e regeneração da energia é menor que 50% ao contrário do sistema indireto que é maior que 90% o que honera os custos de produção (LEWIS; HEPPEL, 2000).

No sistema indireto, o calor é transferido de um meio de aquecimento para o produto por meio de placas: tubulares ou com superfície raspada. Além disso, é possível combinar os dois sistemas: direto e indireto, de acordo com as exigências do produto e processo. Assim, é mais viável economicamente do que o sistema convencional indireto por causa da melhor regeneração do calor e menores alterações químicas, principalmente, em

relação ao sabor e aroma de “cozido” (LEWIS; HEPPEL, 2000).

O binômio tempo e temperatura é o fator mais importante no tratamento UHT, normalmente emprega-se 135 a 150 °C por 2 a 4 segundos para garantir a “esterilização comercial”, ou seja, para que não haja crescimento microbiano dentro das condições normais de estocagem e não deve ser severo o bastante para causar mudanças químicas que resultam na rejeição do produto em relação a atributos como *flavour* e cor (LEWIS; DEETH, 2009; KELLY *et al.*, 2006). Além disso, temperaturas acima das estabelecidas podem causar problemas tecnológicos, como geleificação, formação de sedimentos, bloqueio da transferência de calor nas superfícies dos trocadores de calor, perda do valor nutricional e escurecimento do produto (BASTOS, 1999).

A esterilização reduz em 9 ciclos logarítmicos os esporos mesofílicos; entretanto, com a descoberta do *Bacillus sporothermodurans*, bactéria não patogênica, altamente resistente ao calor e formadora de esporos, temperaturas mais elevadas têm sido recomendadas no processamento de leite UHT (LEWIS; DEETH, 2009). Bussata *et al.*, (2005) verificaram a presença deste micro-organismo em 56,5% das amostras de leite UHT comercializadas na região do Alto do Uruguai – RS e verificaram que a resistência térmica desta bactéria e a relação quanto ao teor de lipídios tendenciaram a uma maior resistência em leite longa vida integral.

2.3 Constituintes do leite e efeitos sobre o calor

O leite é definido como suspensão coloidal que contém glóbulos de gordura emulsificados, proteínas, carboidratos (principalmente lactose), minerais, vitaminas e enzimas (HUPPERTZ; KELLY, 2009). O fornecimento destes nutrientes e a proteção imunológica são as principais funções biológicas do leite para o crescimento e desenvolvimento adequado do recém-nascido, sendo um alimento completo, de alto valor nutritivo e indiscutível valor biológico. A composição do leite permite grandes possibilidades de processamento industrial para obtenção de diversos produtos para a alimentação humana (LOPES, 2008; SANTOS; FONSECA, 2007).

De acordo com Huppertz e Kelly (2009), entre as raças bovinas existe considerável diferença na composição química do leite, apesar da semelhança entre os constituintes, conforme mostrado na Tabela 1. Qi (2007) verificou que cada fêmea mamífera produz leite com composição adequada para os requisitos nutricionais do seu recém-nascido.

TABELA 1

Composição centesimal do leite de diferentes raças bovinas.

Componentes	Holandesa	Jersey	Pardo-suíça	Ayrshire	Guernsey
Gordura (%)	3,6	5,0	3,8	4,0	4,6
Proteína (%)	3,0	3,7	3,2	3,3	3,5
Lactose (%)	4,6	4,7	4,8	4,6	4,8
Cinzas (%)	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8
EST ¹ (%)	11,9	14,2	12,7	12,7	13,7

¹ Extrato Seco Total

Fonte: Nickerson (1995) citado Huppertz e Kelly (2009).

Segundo Lopes (2008), o produtor deve conhecer a composição do leite, pois esta é uma ferramenta estratégica capaz de fornecer informações de como aplicar os efeitos da alimentação, do manejo reprodutivo e da genética sobre a lactação. É fundamental os laticínios terem o controle das características físico-químicas do leite cru para a fabricação de diferentes produtos lácteos, com rendimentos industriais satisfatórios e que atendam os requisitos da Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006), incluindo o pagamento pela qualidade da matéria-prima.

A lactose, principal carboidrato do leite, é essencial para a produção de derivados lácteos fermentados. Juntamente com os sais minerais é responsável por 50% da pressão osmótica necessária para a formação do leite. A concentração deste dissacarídeo pode ser variável em relação ao estágio de lactação, infecção do úbere, fatores individuais e raça da vaca. Quanto ao estágio de lactação, a lactose diminui progressivamente e significativamente com o aumento da contagem de células somáticas presentes no leite (HUPPERTZ; KELLY, 2009).

Em temperaturas superiores a 100°C, a lactose se decompõe formando ácidos orgânicos, principalmente ácidos fórmicos e lácticos, com liberação de íons H⁺ resultantes da reação de Maillard. Por conseguinte, ocorre a redução do pH e formação das melanoidinas, responsáveis pelas alterações indesejáveis na cor e no *flavour* do leite esterilizado (TISIOULPAS *et al.*, 2010; HUPPERTZ ; KELLY, 2009; WALSTRA ; JENNESS,1984).

Os lipídeos no leite são predominantemente triacilgliceróis (97 – 98 % do total da fração lipídica) e os 2 % restantes compreendem diacilgliceróis, monocilgliceróis, ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróis (principalmente colesteróis) e traços de vitaminas lipossolúveis. Os teores de gordura podem sofrer variações relacionadas à raça, fatores individuais, estágio de lactação, idade, saúde do animal (HUPPERTZ; KELLY, 2009; FOX; MCSWEENEY, 1998). Aproximadamente 95% da fração lipídica do leite estão na forma de glóbulos, sendo que a composição e a estrutura destes não são bem conhecidas, no entanto sabe-se que são constituídos principalmente de lipídios polares ligados à membrana e associados com proteínas (MANSSON, 2008). Esta membrana evita a floculação dos glóbulos e protege a gordura em seu interior contra o ataque de enzimas lipolíticas. O processo UHT praticamente não causa mudanças químicas e físicas na estrutura, nas propriedades e no valor nutricional dos lipídeos do leite (KELLY *et al.*, 2006).

2.3.1 Considerações sobre as proteínas no leite

Tradicionalmente, o teor de gordura tem sido considerado parâmetro para o pagamento do leite por qualidade. Contudo, a proteína láctea tornou-se o componente mais valorizado, nos últimos anos na maioria dos países, em função das suas propriedades únicas para a elaboração dos derivados lácteos, o que tem requerido uma atenção considerável por parte dos pesquisadores e pela indústria. Alterações nas propriedades das proteínas, tais como insolubilidade do leite em pó causada pela desnaturação térmica do leite ou aumento da solubilidade das proteínas do queijo durante a maturação são exemplos de aspectos importantes na industrialização destes produtos (FOX; MCSWEENEY, 1998).

A fração nitrogenada do leite é constituída pelas caseínas, pelas proteínas do soro e pelos compostos nitrogenados não proteicos. As caseínas, grupo de fosfoproteínas específicas do leite, correspondem aproximadamente 80 % (m/m) da fração total. Apresentam uma conformação quaternária e anfipática (porção hidrofóbica que se interioriza na estrutura micelar e uma porção hidrofílica superficial). Esta conformação micelar permite a associação com as submicelas tornando-as insolúveis em água e as caseínas ainda podem funcionar como bons agentes emulsificantes (HORNE, 2009; FOX; BRODKORB, 2008; SILVA, 2004). São moléculas altamente hidratadas, denominadas micelas de caseínas, que consistem 94 % de caseínas e 6 % de constituintes de baixa massa molecular denominado fosfato de cálcio coloidal, este é composto de cálcio, fosfato, pequena quantidade de citrato e magnésio, além de traços de outras substâncias (DE KRUIF; HOLT, 2003).

As quatro principais caseínas do leite bovino são α_1 , α_2 , β e κ e representam respectivamente 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas. A α_1 -caseína não possui cisteína, susceptível ao efeito das proteases e precipitável na presença de íons cálcio; α_2 -caseína é altamente hidrofílica, fosforilada e sensível ao cálcio iônico; β -caseína apresenta maior quantidade de prolina, sensível ao cálcio, porém, em menores níveis do que as caseínas α ; κ -caseína é uma glicoproteína de difícil solubilização, estável na presença de íons cálcio e atua como estabilizadora da micela e a γ -caseína é o resultado da ação proteolítica da β -caseína e representa aproximadamente 3% do valor total das caseínas (FOX, 2003).

As micelas de caseína têm função importante nas propriedades físico-químicas do leite e derivados, por isso, os efeitos sobre a sua estrutura, composição e processamento têm sido estudados constantemente. Nos últimos 40 anos, vários modelos da estrutura micelar das caseínas foram propostos por diversos autores com base nas propriedades físico-químicas, estudos de agregação e microscopia eletrônica das micelas, porém, a estrutura exata das subunidades e das micelas de caseínas ainda não foram determinadas (FOX ; BRODKORB, 2008).

Há dois modelos descritos na literatura que parecem ser mais consistentes. O primeiro é denominado modelo das submicelas proposto pelos pesquisadores Schmidt (1982) e Walstra (1990 e 1999), onde há o conceito de “capa-núcleo” em que as subunidades de α -s₁ e β -caseína formariam núcleos termodinamicamente estáveis em roseta cobertos por camadas periféricas de κ -caseína (FIG. 1a). Um segundo modelo é representado por uma estrutura aberta (FIG. 1b), os estudos de Dalgleish *et al.*, (2004) mostraram com detalhes a superfície micelar da caseína por meio de micrografias eletrônicas e revelaram que a estrutura é complexa, não possui revestimento, não é lisa e não há evidência de submicelas. Ambos os modelos permitem a associação das moléculas através de ligações de fosfato de cálcio coloidal e interações hidrofóbicas (QI, 2007; RISSO *et al.*, 2007) e confirmam a presença da fração κ -caseína na superfície e a falta desta no seu interior, o que confere estabilidade à micela de caseína (DE KRUIF; HOLT, 2003).

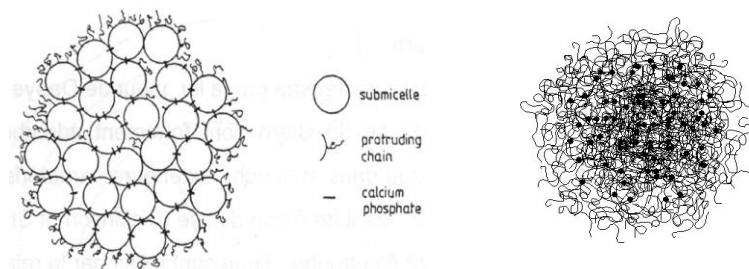


FIGURA 1 – (a) modelo das sub-micelas à esquerda e (b) modelo da estrutura aberta à direita.

Fonte: GAUCHERON (2005).

As soroproteínas correspondem a 20% (m/m) da fração total das proteínas do leite. Apresentam alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto, elevado valor nutritivo. No soro de leite bovino, predomina a β -lactoglobulina (β -LG) que possuem duas principais variantes genéticas β -LGA e β -LGB. A α -lactoalbumina (α -LA) é outra soroproteína, porém somente a variante B tem sido encontrada em leite de raças bovinas ocidentais (DE KRUIF; HOLT, 2003).

O leite submetido a altas temperaturas causa ligeiro aumento da micela da caseína devido à associação das soroproteínas desnaturadas juntamente com o fosfato de cálcio. A temperatura, tempo de processo e pH são responsáveis por esse fenômeno que pode ocasionar defeitos no leite UHT durante a estocagem, principalmente se for aquecido pelo sistema de injeção a vapor, o qual pode ser eliminado pelo processo de homogeneização após o tratamento térmico em altas temperaturas (KELLY *et al.*, 2006).

Além disso, em temperaturas acima de 80 °C, ocorre a desnaturação da β -lactoglobulina que interage com a κ -caseína, o que reduz a susceptibilidade do leite à coagulação. Esta reação irreversível é um dos efeitos principais do processo UHT que controla a maioria das propriedades do leite e derivados. Formação de grupos sulfidrílicos responsáveis pelo *flavor* cozido, incrustações nos trocadores de calor pela β -lactoglobulina e ação da plasmina, são exemplos de compostos que devem ser inativados sob ação do calor para que não haja perda da qualidade dos produtos UHT. Vale ressaltar que as modificações da superfície micelar que ocorrem a 100 °C comprometem a estabilidade térmica; por isso, recomenda-se que o pré-aquecimento para produtos UHT não deve ultrapassar 90 °C (SILVA, 2004).

2.3.2 Sais no leite

As propriedades das caseínas estão relacionadas às suas interações com os minerais presentes no leite, principalmente cálcio e fósforo. Nessa revisão, a palavra “minerais” será aplicada apenas às espécies iônicas de baixa massa molecular que estão em concentrações relevantes incluindo os minerais orgânicos, por exemplo, os citratos que participam do equilíbrio dos minerais no leite (TAB. 2) (LUCEY; HORNE, 2009).

TABELA 2

Concentrações dos principais íons encontrados no leite de vaca.

Íons	Concentração Média (mM)	Varição
Potássio	37	34,5 – 40
Cálcio	30	25 – 35
Fósforo (total)	30	24 – 35
Fósforo (inorgânico)	23	
Cloreto	28	22,5 – 39,5
Sódio	22	15 – 26
Citrato (ácido cítrico)	9	
Carbonato (CO ₂)	4,5	
Sulfato	1	

Fonte: Fox; McSweeney (1998).

Os minerais correspondem à menor fração no leite, aproximadamente 8 – 9 g.L⁻¹. Determinam várias propriedades do leite, incluindo a formação e estabilidade das micelas de caseínas, capacidade tamponante ácido-base e propriedades coligativas, tais como pressão osmótica, pressão de vapor, ponto de congelamento e ponto de ebulição. Sob o aspecto tecnológico, os minerais impactam na estabilidade protéica durante o processamento (estabilidade ao etanol, coagulação enzimática e térmica), na textura de vários géis e queijos e na funcionalidade e estabilidade de emulsões (LUCEY; HORNE, 2009; GAUCHERON, 2005).

Além disso, os minerais estão integrados às micelas protéicas, isolados ou interligados dependendo da sua capacidade de ligação. Distribuem-se em duas fases distintas: a fase solúvel ou livre e a fase coloidal ligada à micela caseínica (TAB. 3) (GAUCHERON, 2005). Esses sais se mantêm em constante equilíbrio, passando uma fase para outra dependendo das condições ambientais como temperatura, pH, concentração salina, entre outros (LUCEY; HORNE, 2009; WALSTRA; JENNESS, 1984).

O magnésio e o cálcio apresentam-se em baixas concentrações como íons livres, uma vez que estão associados em grande parte com o fosfato e citrato. A baixa quantidade de fosfato de cálcio na fase solúvel é por causa da baixa solubilidade desses sais (TAB. 4). Na fase solúvel, os íons não são

totalmente livres em solução, são dependes das diferentes ligações (afinidade) que podem ocorrer entre cátions e ânions e da solubilidade dos sais (GAUCHERON, 2005).

TABELA 3

Distribuição aproximada de sais entre as fases coloidais e solúveis.

	Coloidal (%)	Solúvel (%)
Cálcio	69	31
Cloreto	5	95
Citrato	14	86
Fosfato inorgânico	53	47
Magnésio	47	53
Potássio	6	94
Sódio	5	95

Fonte: Lucey; Horne (2009).

TABELA 4

Valores calculados da maioria das ligações entre cálcio e magnésio no leite.

Tipo de ligações	Concentração (mmol.L ⁻¹)
Cálcio	
[Ca ²⁺]	2,0
[CaCit]	6,9
[CaPO ₄]	0,6
Caseína	19,4
α-lactoalbumina	0,5
Magnésio	
[Mg ²⁺]	0,8
[MgCit]	2,0
[MgPO ₄]	0,3
Caseína	1,9

Fonte: Lucey; Horne (2009) adaptada de Neville (2005)

O fosfato de cálcio coloidal é integrante da estrutura micelar caseínica. Assim, dependendo das condições físico-químicas, essa estrutura pode ser mais ou menos destruída pela dissociação das caseínas e dos sais. Por outro lado, é comum modificar as condições físico-químicas para fins de estudo, para ter melhor entendimento das mudanças induzidas e das propriedades dos minerais especialmente às interações entre sais de fosfato de cálcio e as moléculas de caseína (GAUCHERON, 2005).

Durante o aquecimento por indução o fosfato de cálcio coloidal é formado, o qual ocorre a ressolubilização quando o leite é resfriado imediatamente, o que não ocorre com a esterilização (ON-NOM *et al.*, 2010; LUCEY; HORNE, 2009). Os sedimentos encontrados sobre as superfícies dos trocadores de calor UHT são ricos em fosfato de cálcio. Há possibilidade que os tratamentos térmicos severos (120°C/15 minutos) causem mudanças no fosfato de cálcio coloidal devido à alteração no perfil tamponante ácido-básico. Nestas condições, as caseínas não são capazes de prevenir a precipitação de fosfato de cálcio (HOLT, 1995).

2.4 Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite

Estabilidade térmica é a capacidade que o leite tem de suportar o efeito do calor sem a formação de grumos (SINGH, 2004). Tratamentos térmicos severos, excesso de íons cálcio, pH, hidrólise enzimática da κ -caseína, adição de etanol são fatores responsáveis pela instabilidade da caseína (O'CONNELL *et al.*, 2006; SINGH, 2004).

2.4.1 pH

Discussões sobre estabilidade térmica são complexas, uma vez que o pH sob o efeito do calor induzido pode promover dois padrões distintos. No tipo A, o tempo de coagulação térmica *versus* o pH apresenta o intervalo mínimo e o máximo em torno de 6,7 e 7,0, respectivamente; a estabilidade térmica diminui no lado ácido do valor máximo e aumenta no lado alcalino do valor mínimo. O padrão tipo B não exhibe um valor mínimo e a estabilidade

térmica aumenta progressivamente ao longo do pH, sendo o intervalo de pH entre 6,4 a 7,4 (KELLY *et al.*, 2006).

A máxima estabilidade térmica do leite se dá em pH próximo de 6,7 devido a agregação das soroproteínas (albumina e globulina) sobre a superfície micelar. Quando o pH ultrapassa 6,9, há a dissociação das soroproteínas e também da κ -caseína, o que promove a redução da estabilidade térmica (SINGH, 2004). O pH abaixo de 6,5 reduz a força iônica para a manutenção da estrutura micelar, o que determina um deslocamento do cálcio da fase coloidal para a fase solúvel com aumento do cálcio iônico.

A acidificação do leite solubiliza o fosfato de cálcio coloidal, é intensa em pH abaixo de 5,6 e torna-se completamente solubilizado em pH 5,0. Entretanto, quando o pH aumenta, ocorre a formação adicional do fosfato de cálcio coloidal (LUCEY; HORNE, 2009).

Outro fator importante entre pH e temperatura é que o valor do pH não é o mesmo em todas as amostras, porque isso depende da capacidade tamponante do leite. Tais fatores influenciam nessas diferenças, como as frações e concentrações das caseínas e nas quantidades de citratos e fosfatos no leite (ON-NOM *et al.*, 2010). Silva (2004) ressalta que para comparar a estabilidade ao calor de distintos lotes de leite, deve-se determiná-los aos seus vários valores de pH, incluindo o de máxima estabilidade.

A adição de fosfatos no leite aumenta o tempo de coagulação térmica, enquanto reduz o fosfato solúvel e altera o padrão de pH para valores alcalinos. Já a adição de citrato altera o valor máximo para valores mais ácidos e o tempo de coagulação térmica não retorna para valores alcalinos (SINGH, 2004). Segundo Singh *et al.*, (1995), quando o pH natural do leite estiver mais alto que a faixa de estabilidade máxima (6,7 a 6,9), o fosfato di-hidrogenado de sódio é o mais recomendado. Caso o pH estiver abaixo da estabilidade mínima o citrato de sódio ou fosfato dissódico devem ser adicionado ao leite. Existem poucos trabalhos que avaliam as alterações que podem ocorrer no pH do leite, submetido a altas temperaturas, adicionado de citratos e fosfatos e as interações sobre as propriedades físico-químicas, sobretudo ao longo da estocagem.

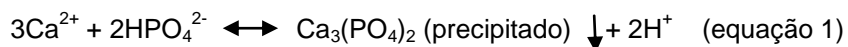
Os estudos de Chandrapala *et al.*, (2010) verificaram que as alterações do pH e a atividade do cálcio em leite submetido a 90°C seguido de resfriamento a 25°C são reversíveis e sugerem que essas alterações são em função da composição do leite. E o conhecimento do leite antes do aquecimento por si só não é suficiente para prever mudanças que ocorrem durante o aquecimento. Para Singh (2004) não existe relação entre o pH inicial e a interação entre abaixamento do pH durante o aquecimento. A energia de ativação da coagulação térmica, aparentemente, é igual à de produção de ácido (SILVA, 2004). Todavia, a redução do pH do leite, provavelmente, reduz as repulsões eletrostáticas por causa da desestabilização gradual do sistema da micela de caseína (SINGH, 2004). Assim, a estabilidade coloidal das micelas de caseínas é um importante fator, uma vez que a redução do pH e elevação da atividade de Ca^{2+} pode ser preservada até certo ponto (WALSTRA; JENNESS, 1984).

O decréscimo do pH durante o armazenamento e após o aquecimento pode ser atribuído aos ácidos fórmicos e lácticos, que liberam íons H^+ resultantes da reação de Maillard, à desnaturação das soroproteínas, à defosforilação das caseínas e insolubilização do fosfato de cálcio com produção de H_3O^+ na fase aquosa (AL-SADI; DEETH, 2008; SINGH, 2004; SILVA, 2004).

2.4.2 Cálcio iônico

O cálcio presente no leite bovino distribui-se em três fases. Aproximadamente 70% apresentam-se na fase coloidal, associados com fósforo na formação do fosfato de cálcio, ligados às micelas de caseínas do leite. Cerca de 20% estão na fase solúvel, formando sais de cálcio; e os 10% restantes, na fase iônica, ou seja, íons de cálcio livre (LIN *et al.*, 2006). Este cátion bivalente é o mais abundante no leite e tem a finalidade de neutralizar negativamente a superfície das micelas de caseínas. No entanto, outros cátions também podem estar envolvidos, como H (pH), Na, K, Mg (LEWIS, 2011).

A influência do cálcio iônico na estabilidade térmica e nas características superficiais e reológicas das proteínas do leite foi citada por Walstra e Jenness (1984). As micelas de caseínas, em pH normal (6,6 - 6,8), apresentam-se negativamente carregadas, essas cargas são fundamentais para sua estabilização em solução. As cargas das micelas são controladas pela quantidade de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio iônico no sistema. À medida que aumenta a quantidade do cálcio total, aumenta a quantidade de cálcio ligado e reduzem as cargas negativas das micelas, diminuindo assim a barreira energética para a coagulação. Se o nível de cálcio reduz, aumentam as cargas negativas das micelas e a repulsão entre elas, o que dificulta a coagulação. Portanto, o equilíbrio entre as três fases de cálcio no leite é muito importante para a estabilidade do leite (RIBEIRO *et al.*, 2010; HORNE; PARKER, 1981). O equilíbrio entre o fosfato de cálcio insolúvel e o cálcio iônico pode ser representado pela equação 1.



Em altas temperaturas, o pH do leite é muito menor, fundamentalmente, em consequência da maior dissociação da água, da precipitação do fosfato tricálcico e da produção de ácido (SILVA, 2004). Contudo, a redução do pH no leite resulta no aumento da concentração do Ca^{2+} (LEWIS, 2011), o que pode ocasionar desequilíbrio salino. Para que seja restaurado o equilíbrio, ocorre o deslocamento dos íons Ca^{2+} da fase solúvel para a fase coloidal, o que afeta a estabilidade térmica do leite (SILVA, 2004). Assim, o Ca^{2+} pode ser influenciado pela quantidade e tipos de caseínas, pelos fosfatos e citratos e pelo pH do leite. A literatura sobre estabilidade térmica é vasta, embora seja relativamente escassa sobre o papel específico do Ca^2 (LEWIS, 2011).

Tsioulpas *et al.*, (2007) encontraram em 234 amostras de leite cru bovino uma variação de Ca^{2+} entre 1,05 a 5,29 mM, sendo a média 1,88 mM e o desvio padrão igual a 0,4 mM. Esses resultados foram obtidos de leite rebanhos individuais e foram coletadas amostras do colostro, pós-colostro e período inicial da lactação para investigar como a composição do leite, as

propriedades físicas, estabilidade e aptidão para o processamento mudariam entre esses períodos. Esses autores sugerem que a concentração de Ca^{2+} juntamente com a estabilidade ao etanol, pH e teor de proteínas podem ser úteis para identificar o ponto de transição do colostro para o período inicial da lactação.

Chavez *et al.*, (2004) constataram variações de cálcio iônico no leite cru (1,84 a 2,59 mM) e 30% das amostras foram instáveis ao álcool a 72% com pH na faixa de 6,67 a 6,69. Contudo, em intervalos de pH 6,70 a 6,72, as amostras foram estáveis e com variações de cálcio iônico entre 1,66 a 2,04 mM.

Estudos mostram as variações do Ca^{2+} entre as espécies mamíferas. Os valores encontrados de Ca^{2+} do leite de cabra são maiores que o leite bovino, logo o leite caprino possui baixa estabilidade térmica (Boumpa *et al.*, 2008). O leite humano possui o menor valor de Ca^{2+} , seguido do bovino, caprino, ovino e roedores (SILANIKOVE *et al.*, 2003).

On-Nom *et al.*, (2010) utilizaram a diálise e ultrafiltração para fracionar os cátions bivalentes solúveis e analisaram o cálcio iônico e o pH no leite em temperaturas 20, 80, 100, 110 e 120 °C. Constataram que quando o leite é aquecido, tanto o pH como o cálcio iônico diminuem e não houve diferenças notáveis em relação aos tratamentos térmicos (pasteurizado e UHT), embora estes processos tivessem tido um efeito mínimo sobre a separação dos minerais presente no leite. Em relação à esterilização, pode ocorrer aumento ou redução do Ca^{2+} .

2.4.3 Estabilidade ao etanol

O emprego do teste do álcool iniciou-se na Europa central, no início do século XX, com citações oficiais a partir de 1915. O objetivo inicial era avaliação da qualidade do leite para venda ao varejo. Posteriormente, o teste foi aceito como indicador de acidez, mistura do leite com colostro ou leite proveniente de animais com mastite. A estabilidade ao etanol mostrou-se útil para seleção de leite a ser concentrado e, mais além, para avaliação da estabilidade do leite ao aquecimento. Por volta de 1980, estudos apontaram o

valor do teste pela similaridade observada entre a instabilidade induzida pelo etanol e a instabilidade induzida pelo processamento UHT (HORNE, 1992).

A estabilidade do leite frente ao álcool é um teste rápido e serve como indicador de acidez e da estabilidade térmica do leite (SILVA *et al.*, 2012). Deve ser realizada sempre que ocorrer a mistura de leites durante toda a cadeia produtiva, como nos resfriadores comunitários, na coleta pelos caminhões tanque e na recepção pela indústria (BRASIL, 2006). O objetivo desta prova é criar uma situação de estresse à proteína por meio de solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pelos tratamentos térmicos na indústria (O'CONNELL *et al.*, 2006). Esse teste permite a verificação da formação de coágulos pela ação do etanol, sendo resultado da caseína desnaturada associada com cálcio e fosfato de cálcio e outras proteínas (HORNE, 1992). Acidez elevada do leite, causada pelo crescimento de bactérias e produção de ácido láctico, produzirá um resultado positivo no teste, ocasionada pela coagulação do leite quando misturado com uma solução alcoólica, embora o pH preciso em que isto ocorre não seja o mesmo para todo tipo de leite (HORNE, 1992).

Atualmente, a graduação mínima de etanol exigida é 72% (v/v) (BRASIL, 2006); no entanto, graduações de 76, 78 e até 80 % têm sido praticadas por diversas indústrias, na expectativa de selecionar leite de melhor qualidade. Enquanto no Brasil a graduação alcoólica tende a aumentar, em diversos países como os da União Europeia, EUA e Canadá, o teste foi abandonado devido à melhora na qualidade microbiológica do leite. Além disso, outros fatores foram relacionados à instabilidade do leite ao álcool como a estação do ano, dieta e estágio da lactação (BRITO *et al.*, 2009).

Trabalhos recentes aplicam o teste de estabilidade ao etanol para verificar se adição de estabilizantes promoveu o aumento da estabilidade térmica do leite (TSIOULPAS *et al.*, 2010; BOUMPA *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2006).

2.4.4 Adição de sais estabilizantes

Sais estabilizantes ou quelantes (sequestrantes) de cálcio, tais como citratos e fosfatos, são frequentemente adicionados no leite e derivados para modificar suas propriedades físicas (KALIAPPAN; LUCEY, 2011), formando complexos estáveis por meio de ligações iônicas com os metais ou metais alcalinos terrosos (FOX; MCSWEENEY, 1998). Esses sais podem aumentar a estabilidade térmica do leite (TSIOULPAS *et al.*, 2010), diminuir a floculação nos trocadores de calor (PRAKASH *et al.*, 2007), minimizar a formação de sedimentos e gelificação de produtos UHT (BOUMPA *et al.*, 2008; WALSTRA *et al.*, 1999), aumentar a elasticidade e derretimento em queijos (BRICKLEY *et al.*, 2009; PASTORINO *et al.*, 2003) e aumentar a firmeza dos géis em produtos fermentados (OZCAN-YILSAY *et al.*, 2007).

Quando adicionados no leite, os sais quelantes reduzem a concentração de cálcio iônico e o fosfato coloidal de cálcio. Logo, ocasionam a dissociação da micela de caseína (OZCAN-YILSAY *et al.*, 2007; GAUCHERON, 2005). Estudos mostram que o fosfato coloidal de cálcio pode ser removido das micelas sem causar a dissociação protéica e altos níveis de cálcio são removidos causando a desintegração micelar (LUCEY; HORNE, 2009; UDABAGE *et al.*, 2001). Ao comparar a habilidade dos agentes sequestrarem o cálcio, os fosfatos e citratos seguem a seguinte ordem: longas cadeias de fosfatos > tripolifosfatos > pirofosfatos > citratos > ortofosfatos (LUCEY; HORNE, 2009).

O ácido fosfórico é um ácido inorgânico amplamente usado na indústria de alimentos. Tem como funções o poder acidificante, proporciona um sabor ácido, apresenta capacidade tamponante e complexa com cátions metálicos que podem promover a degradação dos produtos. É muito usado na produção de queijo para ajustar o pH. Os ácidos cítricos e fosfóricos são classificados pelo FDA como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, são considerados seguros para uso em alimentos. Os fosfatos são compostos preparados a partir do ácido fosfórico, parcialmente ou totalmente neutralizado com íons de metais alcalinos, predominantemente sódio, potássio e cálcio. Devido às várias funções dos fosfatos, foram encontradas

numerosas utilizações de aditivos alimentares pelas indústrias de alimentos (DZIEZAK, 1990).

O cálcio, magnésio, cobre e ferro podem causar danos em alimentos pela formação de precipitados indesejáveis ou participando de reações químicas que levam à descoloração e ao desenvolvimento de *flavour* indesejável. Os fosfatos podem inativar esses íons através da precipitação ou sequestro. Segundo Dziezak (1990), em laticínios, os fosfatos estão entre os mais importantes ingredientes. Quando usados em concentrações bem abaixo de 5%, desempenham uma variedade de funções que, além da emulsificação, neutralização, estabilização e sequestro de metais, promovem o controle da coagulação proteica e a dispersão de proteínas. A adição de fosfato dissódico estabiliza a caseína do leite impedindo sua coagulação; assim o leite pode não formar gel e alterações reológicas durante a estocagem. O fosfato dissódico previne, também, o desenvolvimento do “*flavour cozido*”.

Segundo Pinheiro e Mosquim (1991), o ácido cítrico existe no leite como íon citrato, em pH 6,6, e contribui muito pouco para o poder tamponante do leite. O citrato encontra-se completamente neutralizado em pH próximo a 4,8, devido à formação de complexos pouco dissociáveis com cálcio e magnésio. Aproximadamente 90% do citrato é solúvel, permanecendo no soro do leite; o restante (10%) encontra-se na forma coloidal.

Em presença de citrato de sódio, o aquecimento do leite leva à desagregação das micelas de fosfocaseinato de cálcio com concomitante aumento do pH (OZCAN-YILSAY *et al.*, 2007). Ocorrem profundas modificações no equilíbrio salino, reduzindo a concentração de íons cálcio insolúveis, convertendo-os para a forma solúvel não ionizada de citrato de cálcio. Os citratos são comumente adicionados a leites que vão ser submetidos a tratamentos térmicos UHT, porém altos níveis de citrato podem causar a desintegração das micelas de caseína. É aconselhável fazer os testes de balanceamento salino (PINHEIRO e MOSQUIM, 1991). A legislação brasileira permite a adição dos estabilizantes citrato de sódio e fosfatos de sódio (monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio)

separados ou em combinação em uma quantidade não superior a 0,1% (BRASIL, 1997). Estabilizantes eficazes promovem uma redução moderada do cálcio iônico e não aumentam o pH indevidamente para evitar o escurecimento antes e após a esterilização durante o armazenamento (TSIOULPAS *et al.*, 2010).

Sindhu e Tayal (1984) verificaram que a adição de citrato de sódio no leite de búfala reduziu o tempo de coagulação térmica do leite à medida que aumentou a concentração desse aditivo, o que pode ser atribuído ao aumento do pH do leite para valores na faixa mínima de estabilidade. Entretanto, se o pH do leite de búfala fosse reajustado para o valor normal, o citrato de sódio poderia aumentar a estabilidade do leite e do concentrado. Esses resultados corroboram com os estudos de Sweetsur e Muir (1980) que encontraram que adição de citrato de sódio e fosfato de sódio a 0,1 % reduziram a estabilidade térmica em leite desnatado bovino e consideraram os ortofosfatos os estabilizantes mais efetivos.

Boumpa *et al.*, (2008) estudaram os efeitos dos estabilizantes hexametáfosfato, citrato trissódico e ortofosfato dissódico de hidrogênio no leite de cabra UHT e constataram a redução do cálcio iônico e da formação de sedimentos com aumento do pH e da estabilidade ao etanol. Tsioulpas *et al.*, (2010) verificaram que o fosfato dissódico foi o mais efetivo em relação a sedimentação do leite esterilizado bovino, embora não tenha este aditivo apresentado redução da formação de sedimentos no leite de cabra UHT nos estudos de Boumpa *et al.*, (2008).

Lin *et al.*, (2006) notaram que amostras instáveis ao etanol 75° GL apresentavam níveis de cálcio iônico mais altos do que as amostras estáveis. A estabilidade do etanol obteve maior relação com a concentração de cálcio iônico do que com estágios de lactação ou valores do pH.

Tsioulpas *et al.*, (2010) constataram comportamento similar entre o fosfato dissódico e o citrato de sódio quanto a redução do cálcio iônico e o aumento do pH no leite esterilizado, sendo que este último causou um escurecimento excessivo durante o armazenamento. Logo, a medição de pH e Ca^{2+} fornecem uma análise efetiva dos efeitos dos estabilizantes no leite (PATHOMRUNGSIYOUNGGUL *et al.*, 2010). Ressalta-se que esses estudos

foram realizados com leite cru provenientes de rebanhos individuais e poucos estudos na literatura consultada apontam o efeito da adição de estabilizantes em leite adquiridos de cooperativas, uma vez que o processamento de leite cru, refrigerado por períodos maiores que sete dias, pode comprometer a qualidade dos produtos derivados do leite (VIANNA *et al.*, 2012).

A Associação Brasileira das Pequenas e Médias Cooperativas e Empresas de Laticínios alerta que o uso de estabilizantes deve ser revisto pelos órgãos regulamentadores, pois esses sais elevam o nível de sódio no leite (LÁCTEOS SEGUROS, 2011) e impossibilita a realização do teste de alcalinidade de cinzas no leite UHT por possuir estabilizantes com sódio. Este teste é de fácil operação e baixo custo, é aplicado somente no leite cru e pasteurizado para detecção de substâncias fraudulentas, tais como carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e hidróxido de sódio (MILAGRES, 2008; BRASIL, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

O leite pasteurizado desnatado tipo C foi adquirido na Associação Regional dos Produtores de Leite do Norte de Minas (ASSPROLEITE), localizada em Montes Claros – MG, em 22 de junho de 2012, no mesmo dia em que ocorreu a pasteurização da matéria-prima. O material foi transportado em caminhão de baú isotérmico a 4 °C (+/-1 °C) para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. O tempo de transporte foi de, aproximadamente, 15 minutos. Em seguida, as embalagens de leite foram mantidas a 5 °C (+/-1 °C) e, no dia seguinte, realizou-se a preparação e esterilização das amostras.

Os estabilizantes utilizados no experimento foram: citrato trissódico (TSC), citrato tripotássico (TKC), fosfato de dissódico (DSP) e fosfato de dipotássico (DKP), considerados substâncias puras analiticamente. Foram adquiridos do laboratório SYNTH em Diadema – SP.

3.2 Adição dos estabilizantes e esterilização

Em cada pote de vidro tipo “*baby foods*” (70,5mm x 86,5mm), devidamente higienizado e identificado, adicionou-se 120 mL de leite pasteurizado desnatado a 20 °C (+/-1 °C). Seis amostras foram produzidas para cada concentração (0,05% e 0,10%, m/v) para cada estabilizante (citrato trissódico (TSC), citrato tripotássico (TKC), fosfato de dissódico (DSP) e fosfato de dipotássico (DKP)) para cada tempo (10, 30, 60 e 120 dias) e igualmente para a amostra controle (sem estabilizantes), totalizando 288 amostras. Assim, o termo “amostra” corresponde ao recipiente (pote de vidro) contendo o leite desnatado pasteurizado adicionado de um estabilizante na concentração estabelecida e amostra “controle” sem adição de estabilizantes (FIG. 2).



FIGURA 2 – Amostras adicionadas de estabilizantes
Fonte: Da autora.

Na sequência, as amostras hermeticamente fechadas com tampa metálica, foram alocadas em autoclave vertical, modelo CS da PRISMATEC (FIG. 3) e esterilizadas a 121 °C por 15 minutos (TSIOULPAS *et al.*, 2010). Em seguida, foram seladas com papel filme, acondicionadas em caixas de papelão, identificadas e mantidas em temperatura ambiente por 120 dias.



FIGURA 3 – Acondicionamento das amostras na autoclave antes da esterilização
Fonte: Da autora.

3.3 Análises realizadas durante a estocagem do leite esterilizado

As amostras foram analisadas em triplicata, quanto ao pH, estabilidade ao etanol, cálcio iônico e sedimentação, para cada tempo de estocagem. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. Os experimentos ocorreram entre o período de junho a outubro de 2012.

3.3.1 Determinação da concentração de cálcio iônico

O cálcio iônico foi determinado por método eletroquímico-potenciométrico conforme metodologia citada por TANAKA *et al.*, (2011). Utilizou-se o eletrodo de íon seletivo para cálcio da marca Orion (Ionplus Combinação ISE *Thermo Fisher Scientific Inc. Beverly, EUA*). Antes da realização dos experimentos, a membrana do eletrodo permaneceu por 48h em solução padronizada de cloreto de cálcio a 2,5 mM.

O eletrodo foi calibrado com cinco soluções-padrão de 0,4 mM a 25,0 mM e para cada 20 mL de cada solução padrão adicionou-se 0,4 mL de ISA (*ionic strength adjustor*) – solução de ajuste iônico de cloreto de potássio. De acordo com as instruções do manual, a inclinação da reta apresentou a equação linear $y = -80,01 + 25,55x$, no intervalo de 25 a 30 mV e $R^2 = 0,99$. Esse procedimento de calibração foi realizado antes da realização das análises para cada tempo de estocagem.

Para a determinação da concentração de cálcio iônico no leite esterilizado, adicionou-se 25 mL de leite a 20 °C (+/- 1°C), a 0,5 mL de ISA, homogeneizou-se e, posteriormente, imergiu-se o eletrodo na amostra. A leitura foi realizada em ppm e convertida em mM.

3.3.2 pH

A medição do pH foi realizada em potenciômetro digital (modelo 8520, Hanna Portugal), em amostras analisadas a 20 °C (+/-1 °C). Antes de se iniciar as medições, o equipamento foi calibrado com soluções padrão pH 7,00 e pH 4,00 (TSIOULPAS *et al.*, 2010).

3.3.3 Estabilidade ao etanol

A metodologia utilizada para a avaliação do leite esterilizado quanto à estabilidade ao etanol foi a descrita por Tsioulpas *et al.*, (2007). Soluções padronizadas de etanol P.A., de concentrações sequenciais de 68% (v/v) a 100% (v/v), foram preparadas com intervalos de 2% (v/v) e aferidas com auxílio do alcoômetro Gay-Lussac. Adicionou-se uma placa de Petri juntamente com 2 mL da amostra (20°C +/- 1°C), com auxílio de pipeta graduada e adição de 2 mL da solução etanol padronizada (68% v/v) a 20°C +/- 1°C (FIG. 4). Em seguida, misturou-se, realizando movimentos circulares na placa de Petri contra a superfície escura da bancada, e observou-se a ocorrência de grumos ao inclinar a placa de Petri (FIG. 5). Para as amostras que não apresentaram grumos, repetiu-se a técnica empregando solução de etanol de maior concentração até que ocorresse a coagulação. O resultado foi expresso em % v/v em que primeiro ocorreu formação de grumos nas amostras. As análises foram realizadas a 20°C +/- 1 °C.



FIGURA 4 – Adição de etanol nas amostras
Fonte: Da autora.



FIGURA 5 – Homogeneização das amostras
Fonte: Da autora.

3.3.4 Determinação da massa de sedimentos

Para determinação da massa de sedimentos, utilizou-se o método gravimétrico citado por Silva (2004) baseada em procedimentos de Ramsey e Swartzel (1984). A técnica foi padronizada com abertura do pote de vidro, escoando todo o leite cuidadosamente, invertendo as embalagens e mantendo-as em posição vertical por 10 minutos, a fim de permitir que o leite escoe das paredes internas e do fundo. Quando necessário, adicionou-se pequenas quantidades de água destilada, com auxílio de pisseta, para remoção de eventual resíduo. Manteve-se a embalagem em posição vertical com o bocal de abertura para cima, à temperatura ambiente por 48 horas, pesou-se a embalagem. Anotou-se. Posteriormente, removeu-se, cuidadosamente e completamente o sedimento seco com auxílio de espátula de ponta fina, pesou-se e anotou-se o valor da embalagem sem sedimento para se obter a massa de sedimentos pela diferença entre as duas pesagens.

3.4 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Realizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 3, ou seja, quatro estabilizantes e três concentrações (incluindo o tratamento controle). Aplicou-se o modelo linear de regressão múltipla considerando a variável resposta o pH e as variáveis

explicativas (concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e sedimentação) entre os estabilizantes e as concentrações durante a estocagem (10, 30, 60 e 120 dias).

3.4.1 Efeito da adição dos estabilizantes

Para avaliar o efeito da adição dos estabilizantes e propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado foi construído um modelo de regressão múltipla linear assumindo o pH como variável resposta e os parâmetros físico-químicos como variáveis explicativas. Para análise de variância (ANOVA), utilizou-se a distribuição de erros *Gaussian* e identidade como função de ligação, assumindo um limiar de significância de 0,05. E análise de contraste considerando as variáveis com mais de dois níveis (tratamentos) caso um deles diferissem dos demais. Empregou-se o programa de análise estatística R versão 2.15 (TEAM, 2012).

3.4.2 Efeito da concentração dos estabilizantes

Para avaliar o efeito da concentração dos estabilizantes quanto às variáveis físico-químicas e alterações ocorridas no pH foi construído um modelo de regressão múltipla linear, assumindo o pH como variável resposta e as variáveis físico-químicas como variáveis explicativas. Posteriormente, realizou-se análise de variância, assumindo a distribuição de erros *Gaussian* e identidade como função de ligação utilizando nível de significância $\alpha = 0,05$. Efetuou-se análise de contraste considerando as variáveis com mais de dois níveis (tratamentos) caso um deles diferissem dos demais. O programa de análise estatística utilizado foi o R versão 2.5 (TEAM, 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da adição dos estabilizantes e das propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem

A Tabela 5 apresenta os resultados das alterações ocorridas no pH e nos parâmetros físico-químicos do leite esterilizado, na presença de diferentes estabilizantes ($R^2 = 0,936$).

TABELA 5

Resultados da adição dos estabilizantes e às propriedades físico-químicas do leite esterilizado sobre o pH.

	GL ⁽¹⁾	Variância ⁽²⁾	p ⁽³⁾
Estabilizantes	3	68,89	<0,0001
Sedimentação	1	12,46	0,0012
Estabilidade ao etanol	1	98,38	<0,0001
Cálcio lônico	1	4,49	0,0414
Tempo de armazenamento	1	120,76	<0,0001
Sedimentação x etanol	1	13,51	0,0008
Sedimentação x tempo	1	2,10	0,1564
Etanol x tempo	1	12,72	0,0011
Tempo x tratamento	3	8,62	0,0002
Erro	0,04		
Total	34		

Nota: ⁽¹⁾Grau de Liberdade; ⁽²⁾Teste F (ANOVA); ⁽³⁾p<0,05.

Fonte: Da autora.

A adição dos estabilizantes, o tempo de estocagem e a interação entre esses parâmetros influenciaram significativamente o pH (TAB. 5). Observa-se, no Gráfico 1, a partir da adição de 0,05% de cada aditivo, a redução do pH do leite esterilizado ao longo do tempo de estocagem, com exceção do DSP, que aumentou gradualmente. O TSC e TKC contribuíram para que o leite permanecesse na faixa mínima de estabilidade (6,40 a 6,60), ou seja, pH com valores moderadamente ácidos, conforme sugerido por Singh (2004).

As amostras que continham DKP e DSP apresentaram pH abaixo de 6,30. Singh (2004) reporta que adição de fosfatos no leite aumenta o tempo de coagulação térmica e o pH permanece em valores alcalinos. Entretanto, os resultados deste trabalho mostraram que os fosfatos alteraram o pH para valores ácidos. Singh *et al.*, (1995) verificaram que os fosfatos ácidos devem ser adicionados ao leite quando o pH natural estiver acima do valor máximo da estabilidade (6,70 a 6,90), logo, recomenda-se o fosfato de sódio di-hidrogenado (DSHP). Caso o pH natural do leite estiver mais baixo do que a estabilidade máxima, deve-se adicionar o TSC e DSP.

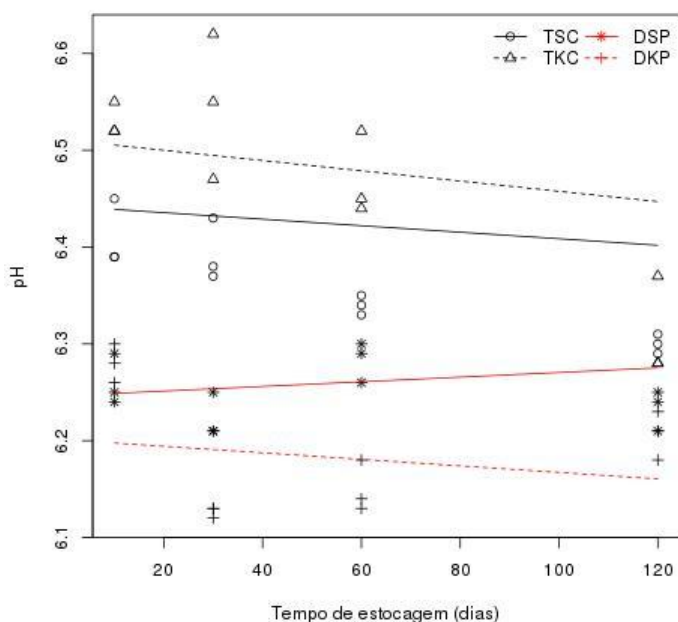


GRÁFICO 1 – Influência da adição dos estabilizantes durante a estocagem sobre o pH do leite esterilizado.

Fonte: Da autora.

Além disso, o decréscimo do pH durante o armazenamento também pode ser atribuído aos ácidos fórmicos e lácticos resultantes da reação de Maillard que liberam íons H^+ , à desnaturação das soroproteínas, à defosforilação da caseína (VIANNA *et al.*, 2012; AL-SAADI; DEETH, 2008), à precipitação do fosfato coloidal de cálcio e à desidratação das micelas (FOX;

MCSWEENEY, 1998). Estudos também evidenciaram a redução do pH quando o leite é submetido à altas temperaturas e adicionado de sais estabilizantes (TSIOULPAS *et al.*, 2010; BOUMPA *et al.*, 2008). A pasteurização rápida (73-75°C/15s) e o tratamento UHT (135°C/2 a 4 s) promovem o retorno do pH original do leite após o resfriamento, o que não acontece para o leite esterilizado (121°C/15 min) que o torna ainda mais baixo (ON-NOM *et al.*, 2010). A esterilização pode reduzir o pH a valores abaixo de 6,0 (WALSTRA; JENNESS, 1984); porém, isso não ocorreu no presente estudo.

Outro fator que influenciou o pH do leite esterilizado, nesse estudo, foi a concentração de cálcio iônico $[Ca^{2+}]$ (TAB. 4). Todavia, não foi significativa a interação entre os parâmetros: estabilidade ao etanol ($F_{[1,22]} = 0,8503$, $p = 0,3664$)¹, sedimentação ($F_{[1,22]} = 4,0011$, $p = 0,0579$) e tempo de estocagem ($F_{[1,22]} = 0,0016$, $p = 0,9685$). Observa-se no Gráfico 2, que à medida que $[Ca^{2+}]$ diminuiu, o pH do leite esterilizado aumentou, mesmo com adição de estabilizantes. Os resultados deste trabalho corroboram com diversos estudos que indicam que as variações entre o pH e os níveis de cálcio iônico são inversamente proporcionais (LEWIS, 2011; TSIOULPAS *et al.*, 2010; PATHOMRUNGSIYOUNGGUL *et al.*, 2010; TSIOULPAS *et al.*, 2007).

Quando ocorre a diminuição da $[Ca^{2+}]$, aumenta-se as cargas negativas das micelas e a repulsão entre elas, o que dificulta a coagulação. Inversamente, pH abaixo de 6,5 reduz a força iônica para a manutenção da estrutura micelar, o que determina deslocamento do cálcio da fase coloidal para a solúvel com aumento do cálcio iônico. Logo, as cargas negativas das micelas são reduzidas, o que diminui a barreira energética para a coagulação (RIBEIRO *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2006; SINGH, 2004).

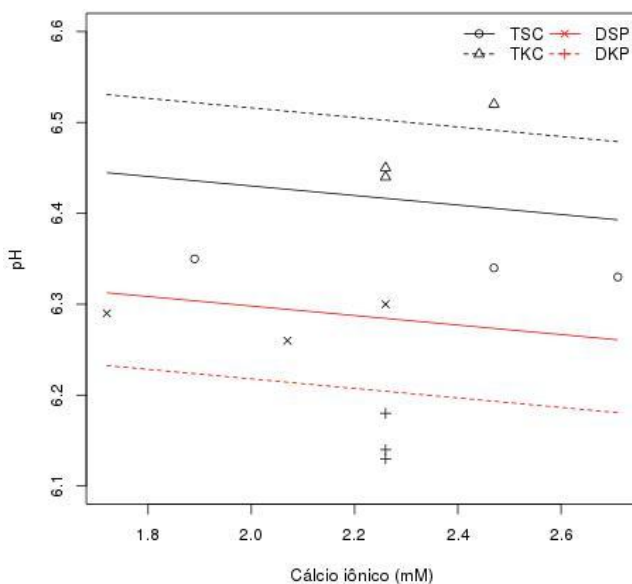


GRÁFICO 2 – Efeito da concentração de cálcio iônico sobre o pH do leite esterilizado adicionado de 0,05% dos estabilizantes citrato trissódico (TSC), citrato tripotássico (TKC), fosfato de dissódico (DSP) e fosfato de dipotássico (DKP), no tempo de 120 dias.
Fonte: Da autora.

Diante disso, evidencia-se a relação existente entre a $[Ca^{2+}]$ e pH como fatores que influenciam a estabilidade térmica do leite. No presente estudo, pôde-se verificar, no Gráfico 3, a redução do pH (sinalizada pelas cores verdes) à medida que a $[Ca^{2+}]$ aumenta em baixas concentrações de etanol. Esse padrão foi o mesmo para todos os estabilizantes avaliados, embora a interação entre a $[Ca^{2+}]$ e a estabilidade ao etanol não tenha sido significativa ($F_{[1,22]} = 0,8503$, $p = 0,3664$). Resultados semelhantes foram encontrados para estudos com leite bovino (MACHADO *et al.*, 2010; TSIOLPAS *et al.*, 2010) e leite caprino (BOUMPA *et al.*, 2008).

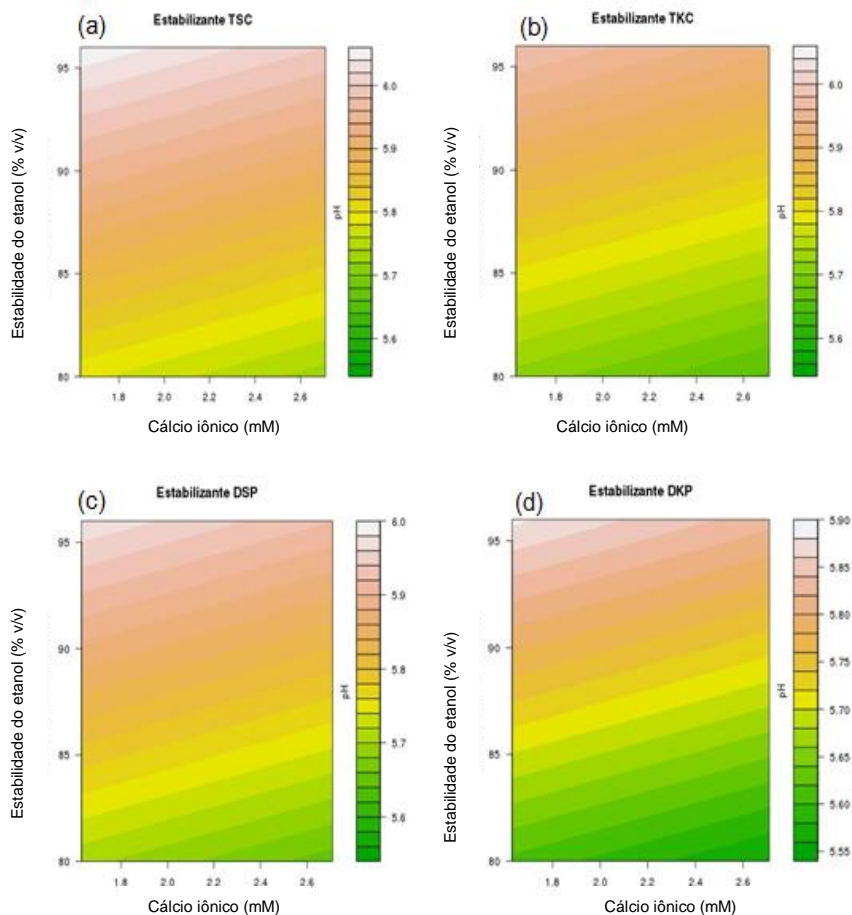


GRÁFICO 3 – Relação entre estabilidade ao etanol e concentração de cálcio iônico sobre o pH do leite esterilizado adicionado de 0,05% de estabilizantes: (a) TSC - citrato trissódico, (b) TKC - citrato tripotássico, (c) DSP - fosfato de dissódico e (d) DKP - fosfato de dipotássico, no tempo de 120 dias.

Fonte: Da autora.

Níveis elevados de cálcio iônico estão associados com baixa estabilidade térmica do leite (BOUMPA *et al.*, 2008; HORNE; MUIR, 1990); logo, menor será a concentração de etanol necessária para promover a precipitação do fosfato de cálcio coloidal (LUCEY; HORNE, 2009). A insolubilização desse sal libera íons H^+ , o que promove a redução do pH (LEWIS, 2011; SINGH, 2004).

Observa-se no Gráfico 4 que TSC, TKC e DKP aumentaram a estabilidade ao etanol do leite esterilizado até 40 a 50 dias. Entretanto, a partir deste período, houve a queda da resistência alcoólica e do pH durante

a estocagem. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Melo Junior (2005) e Silva (2004) para leite UHT com adição de citrato de sódio. Esses autores citam que o aumento inicial da estabilidade ao etanol deve-se à solubilização gradativa dos componentes do leite principalmente os sais, incluindo adição do citrato, para promover a estabilidade das micelas de caseína. A queda da resistência alcoólica, a partir de 50 dias de estocagem, pode ser atribuída pela desestabilização natural da caseína, causando desarranjos moleculares ocasionadas por proteases microbianas de psicrotóxicos, plasmina gerada por ativadores do plasminogênio produzidas por células somáticas ou ainda pela redução do pH.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que essa modificação da estabilidade ao etanol pode ter sido causada pela redução do pH durante a estocagem, uma vez que a interação entre estabilidade ao etanol e tempo de estocagem influenciaram significativamente o pH (TAB. 1).

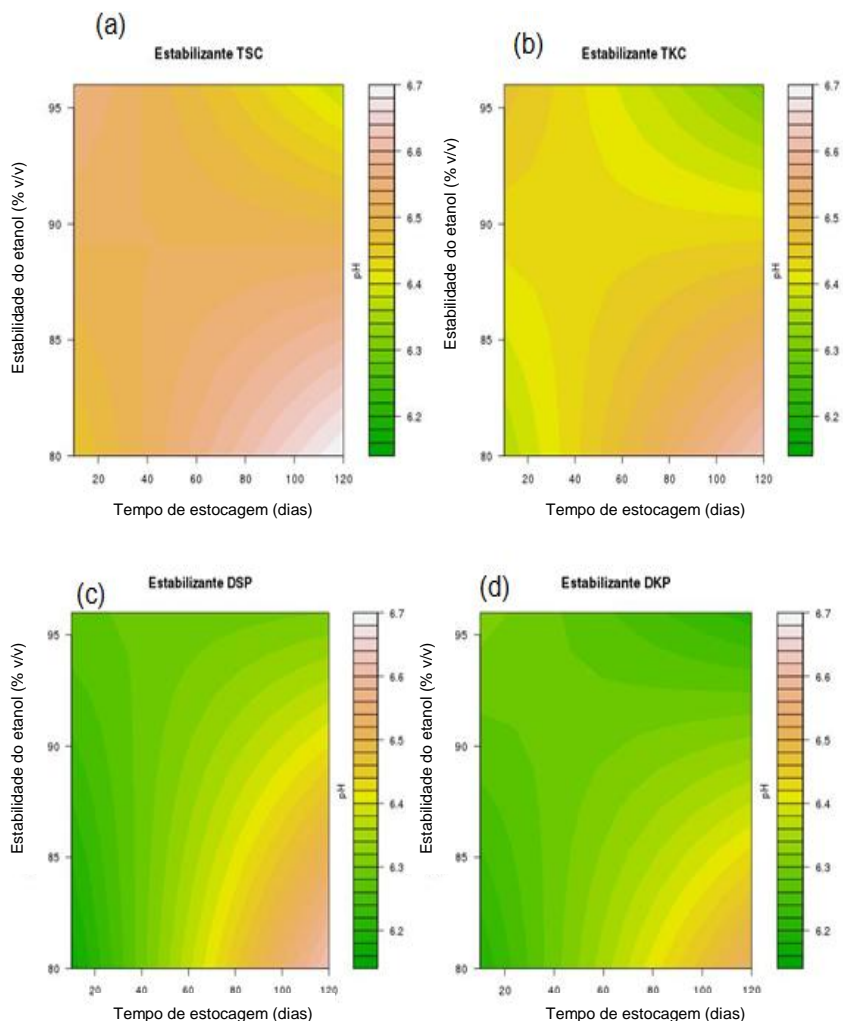


GRÁFICO 4 – Estabilidade ao etanol do leite esterilizado com a adição de (a) TSC - citrato trissódico, (b) TKC - citrato tripotássico, (c) DSP - fosfato de dissódico (d) TKC - citrato tripotássico quanto ao tempo de estocagem e pH.

Fonte: Da autora

Embora a interação entre estabilizantes e estabilidade ao etanol não influenciaram o pH ($F_{[1,22]} = 0,8503$, $p = 0,3664$), verifica-se que o TSC e TKC apresentaram redução no pH, mantendo-se na faixa de 6,40 a 6,50. Enquanto, o DKP apresentou valores de pH menores que 6,20. Valores baixos de pH resultam em menor quantidade de etanol necessário para a precipitação do fosfato coloidal de cálcio (LUCEY; HORNE, 2009). Apesar de ocorrer redução da estabilidade ao etanol durante o armazenamento para

esses aditivos, o menor valor encontrado foi 80 %, ou seja, 17,6 % maior que o valor estabelecido pela legislação brasileira (estável a 68%) para leite UHT (BRASIL, 1997).

As alterações ocorridas no pH com adição de DSP apresentaram diferente dos demais estabilizantes, uma vez que se aumentou moderadamente o pH e a estabilidade do leite esterilizado ao longo do armazenamento (GRÁF. 4c), atingindo valores acima de 90% de etanol. O aumento da estabilidade térmica resultante da adição de estabilizantes, principalmente o DSP, pode estar relacionado com o mecanismo revisado por Lucey e Horne (2009). Para os autores, o etanol, antes de promover a precipitação do fosfato de cálcio coloidal deve, primeiramente, reduzir o cálcio iônico e as ligações de caseinato de cálcio e interromper as ligações de fosfato com as nanopartículas. Essas moderadas perdas promovem aumento de cargas negativas sobre micelas de caseínas e da camada de estabilização estérica. Por conseguinte, uma concentração maior de etanol é necessária para precipitar o fosfato de cálcio ligado às caseínas.

Outro mecanismo da desestabilização das caseínas por ação do etanol está vinculado ao efeito desnaturante do álcool, o qual promove redução na constante dielétrica da mistura, eliminando a barreira de energia que previne a coagulação. Caso a constante dielétrica for reduzida até um valor de pH crítico, as micelas de caseína precipitam (LUCEY; HORNE, 2009; SILVA 2004).

Pesquisas recentes mostram o comportamento do leite cru e esterilizado com e sem estabilizantes avaliando o pH, estabilidade ao etanol e cálcio iônico. Tsioulpas *et al.*, (2010) investigaram a adição de citratos e fosfatos no leite bovino esterilizado e avaliaram o pH, cálcio iônico, sedimentação e potencial zeta, durante a estocagem por seis meses. Segundo esse estudo, o TSC e DSP reduziram o cálcio iônico, aumentaram o pH e a estabilidade ao etanol, embora apresentaram excessivo escurecimento durante o armazenamento e estocagem. As amostras que continham 3,2 mM de hexametáfosfato de sódio (SHMP) e 4,5 mM CaCl_2 coagularam após a esterilização. O fosfato de sódio di-hidrogenado (SDHP) minimizou o escurecimento durante a estocagem, reduziu o pH e apresentou

pouco efeito sobre a $[Ca^{2+}]$. Segundo Boumpa *et al.*, (2008), o DSP foi o estabilizante mais efetivo no controle da sedimentação, embora não foi no leite de cabra UHT.

Boumpa *et al.*, (2008) investigaram ainda o efeito da adição de fosfatos e citratos sobre a estabilidade ao etanol e cálcio iônico em leite UHT de cabra e constataram um coeficiente significativo ($R^2 = 0,85$). Segundo esses pesquisadores, o teste de estabilidade ao etanol é um parâmetro capaz de verificar a alteração na concentração do cálcio iônico ocasionado pela adição de sais quelantes do cálcio.

Além disso, os resultados do presente estudo mostraram que a interação entre sedimentação e o tempo de estocagem não foi significativa. Entretanto, sedimentação e sua interação com estabilidade ao etanol afetaram o pH do leite esterilizado (TAB. 1). Pode-se verificar no Gráfico 5 que, considerando adição de 0,05 % dos estabilizantes, à medida que ocorreu a formação dos sedimentos, o leite esterilizado ficou mais acidificado (cores esverdeadas) e menor foi a concentração de etanol necessária para ocorrer a coagulação, independente do estabilizante adicionado ao leite.

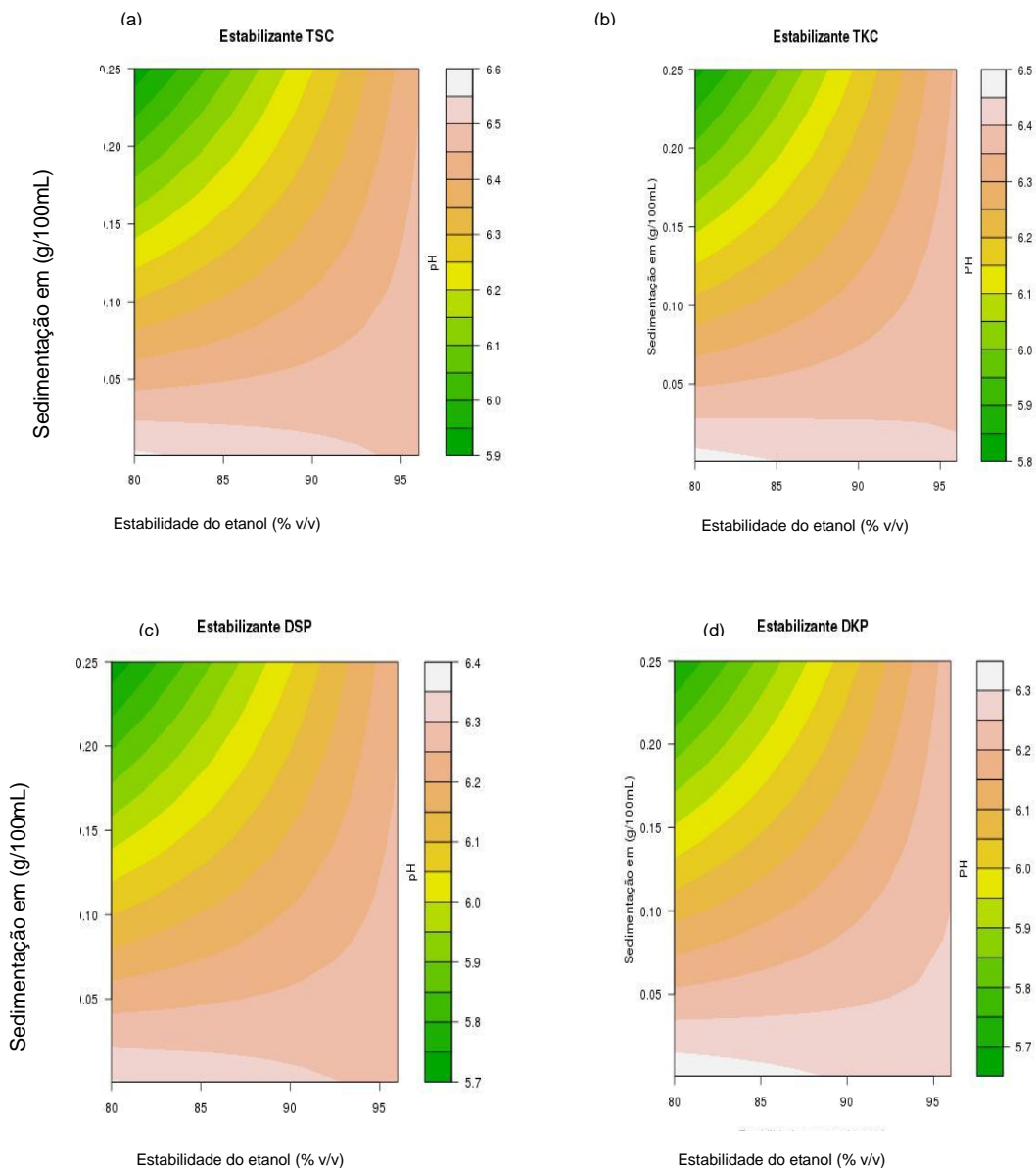


GRÁFICO 5 – Efeito da adição do TSC - citrato trissódico (a), TKC - citrato tripotássico (b), DSP - fosfato de dissódico (c) e DKP - fosfato de dipotássico (d) quanto a sedimentação, estabilidade ao etanol e pH no tempo de 120 dias.
Fonte: Da autora.

4.2 Efeito da concentração dos estabilizantes quanto às propriedades físico-químicas sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem

A Tabela 6 apresenta as médias do pH, concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e formação de sedimentos das amostras de leite esterilizado adicionado com diferentes concentrações de estabilizantes, durante o armazenamento por 120 dias. Pode-se observar que a $[Ca^{2+}]$ diminuiu à medida que aumentou concentração dos estabilizantes, ao longo da estocagem.

A concentração ($F_{[8,77]} = 108,6498; p < 0,0001$)¹, o tempo de armazenamento ($F_{[1,77]} = 411,2813; p < 0,0001$) e a interação ($F_{[8,77]} = 0,00874; p < 0,0001$) entre esses fatores influenciaram significativamente o pH do leite esterilizado. Observou-se no Gráfico 6 e Tabela 6 a redução do pH do leite esterilizado, mesmo em diferentes concentrações de TSC, TKC e, inclusive, para o controle, durante a estocagem. As amostras com DSP a 0,05% e 0,10% apresentaram pequena elevação do pH até 60 dias, a partir desse período, os valores permaneceram estáveis. O DKP a 0,05 % praticamente não reduziu o pH durante a estocagem, somente após a adição do estabilizante e esterilização.

TABELA 6

Médias e desvios padrão das propriedades físico-químicas do leite esterilizado (n = 288).

Amostra,%	Cálcio iônico (mM)	pH	Estabilidade ao etanol (%v/v)	Sedimentos (g/100 mL)
10 dias				
Controle	2,96 ± 0,12	6,36 ± 0,10	89,67 ± 3,70	0,10 ± 0,26
TSC ² , 0,05	2,38 ± 0,11	6,53 ± 0,02	92,00 ± 0,00	0,15 ± 0,12
TSC, 0,10	2,07 ± 0,18	6,58 ± 0,05	90,00 ± 0,00	0,08 ± 0,02
TKC, 0,05	2,58 ± 0,12	6,41 ± 0,03	90,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00
TKC, 0,10	2,32 ± 0,21	6,45 ± 0,00	94,67 ± 1,15	0,03 ± 0,02
DSP, 0,05	2,44 ± 0,00	6,26 ± 0,03	96,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00
DSP, 0,10	2,01 ± 0,10	6,27 ± 0,02	94,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02
DKP, 0,05	2,58 ± 0,12	6,28 ± 0,02	92,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
DKP, 0,10	2,19 ± 0,10	6,16 ± 0,01	80,67 ± 1,15	0,01 ± 0,01
30 dias				
Controle	2,36 ± 0,08	6,34 ± 0,13	86,33 ± 1,44	0,05 ± 0,01
TSC, 0,05	1,68 ± 0,09	6,55 ± 0,08	92,67 ± 1,15	0,04 ± 0,00
TSC, 0,10	1,80 ± 0,02	6,52 ± 0,08	92,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01
TKC, 0,05	2,12 ± 0,27	6,39 ± 0,03	91,33 ± 1,15	0,06 ± 0,01
TKC, 0,10	1,75 ± 0,10	6,42 ± 0,01	92,00 ± 2,00	0,06 ± 0,01
DSP, 0,05	2,06 ± 0,24	6,22 ± 0,02	88,00 ± 0,00	0,05 ± 0,02
DSP, 0,10	1,78 ± 0,00	6,27 ± 0,01	94,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01
DKP, 0,05	2,00 ± 0,17	6,13 ± 0,01	81,53 ± 2,31	0,08 ± 0,00
DKP, 0,10	1,73 ± 0,09	6,09 ± 0,01	82,67 ± 1,15	0,07 ± 0,02
60 dias				
Controle	2,56 ± 0,28	6,34 ± 0,07	89,33 ± 2,99	0,04 ± 0,01
TSC, 0,05	2,33 ± 0,12	6,47 ± 0,04	94,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01
TSC, 0,10	2,01 ± 0,10	6,49 ± 0,01	95,33 ± 1,15	0,05 ± 0,00
TKC, 0,05	2,36 ± 0,12	6,34 ± 0,01	89,33 ± 3,06	0,08 ± 0,04
TKC, 0,10	2,20 ± 0,11	6,42 ± 0,06	93,33 ± 3,06	0,04 ± 0,00
DSP, 0,05	2,02 ± 0,27	6,28 ± 0,02	90,00 ± 0,00	0,05 ± 0,01
DSP, 0,10	1,78 ± 0,10	6,28 ± 0,02	91,33 ± 1,15	0,10 ± 0,01
DKP, 0,05	2,71 ± 0,25	6,15 ± 0,03	87,33 ± 1,15	0,08 ± 0,01
DKP, 0,10	2,26 ± 0,00	6,16 ± 0,04	86,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01
120 dias				
Controle	2,18 ± 0,15	6,23 ± 0,08	93,33 ± 2,31	0,04 ± 0,01
TSC, 0,05	1,91 ± 0,12	6,31 ± 0,05	96,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01
TSC, 0,10	1,73 ± 0,10	6,29 ± 0,01	96,67 ± 1,15	0,04 ± 0,01
TKC, 0,05	1,86 ± 0,12	6,30 ± 0,01	92,67 ± 1,15	0,05 ± 0,01
TKC, 0,10	1,69 ± 0,11	6,25 ± 0,01	93,33 ± 1,15	0,08 ± 0,01
DSP, 0,05	1,95 ± 0,27	6,23 ± 0,02	94,67 ± 2,31	0,06 ± 0,01
DSP, 0,10	1,45 ± 0,10	6,21 ± 0,03	95,33 ± 1,15	0,07 ± 0,03
DKP, 0,05	1,91 ± 0,25	6,21 ± 0,03	92,00 ± 0,00	0,05 ± 0,00
DKP, 0,10	1,60 ± 0,00	6,09 ± 0,03	90,00 ± 0,00	0,08 ± 0,00

Nota: ¹ tempo de estocagem ² estabilizantes: citrato trissódico (TSC), citrato tripotássico (TKC), fosfato dissódico (DSP) e fosfato dipotássico (DKP).

Fonte: Da autora.

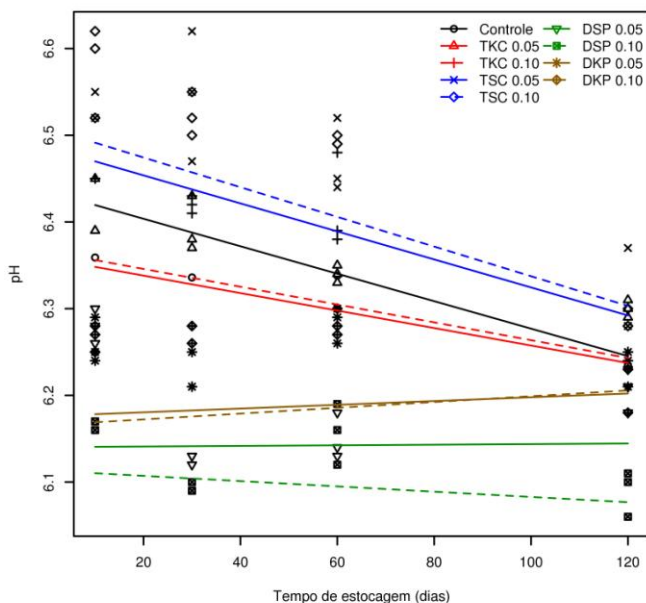


GRÁFICO 6 – Influência da concentração dos estabilizantes durante a estocagem sobre o pH do leite esterilizado.
Fonte: Da autora.

O leite esterilizado com TSC apresentou maior pH comparado com os demais estabilizantes e as concentrações não diferiram ($p>0,05$) (TAB. 7). Esse aditivo aumentou o pH em 0,12 unidades comparado com o controle. Este efeito tamponante do TSC contribuiu para que o leite permanecesse na faixa mínima de estabilidade térmica (6,40 a 6,60). As concentrações de TKC foram iguais estatisticamente quando adicionadas no leite esterilizado e a média do pH foi igual à amostra controle. Logo, os resultados deste trabalho mostraram que o TKC não possuiu efeito tamponante, durante o armazenamento. Já o DSP, manteve o pH praticamente estável, um vez que as concentrações não diferiram ($p>0,05$). Para o DKP, as concentrações foram diferentes. Ambos promoveram pH abaixo da faixa mínima de estabilidade térmica (GRÁF. 8). Assim, à medida que aumentou a concentração de DKP, menor foi o pH do leite, o que sugere sobre esse estabilizante característica acidulante. Quando comparado com o controle, o DKP a 0,10% reduziu o pH em 0,23 unidades.

TABELA 7

Médias de pH do leite esterilizado com adição de estabilizantes em diferentes concentrações durante 120 dias.

Amostras, %	Médias
Controle	6,35 a
TSC, 0,05	6,47 b
TSC, 0,10	6,47 b
TKC, 0,05	6,35 a
TKC, 0,10	6,35 a
DSP, 0,05	6,25 c
DSP, 0,10	6,25 c
DKP, 0,05	6,19 d
DKP, 0,10	6,12 e

Nota: Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si pela Análise de Contraste ($p \geq 0,05$).

Fonte: Da autora.

A concentração de cálcio iônico [Ca^{2+}] ($F_{[1,77]} = 175,8313$; $p < 0,0001$) afetou o pH do leite esterilizado, entretanto a interação desse parâmetro não sofreu influência quanto ao tempo de estocagem ($F_{[1,77]} = 0,1597$; $p = 0,6905$). Observou-se no Gráfico 7 que o pH do leite esterilizado apresentou comportamentos diferentes quando relacionado com [Ca^{2+}] durante a estocagem. Até 60 dias, ocorreu a redução do pH para todos os tratamentos e o controle, posteriormente, manteve-se estável no tempo de 60 dias e, 120 dias, o pH elevou-se (GRÁF. 9).

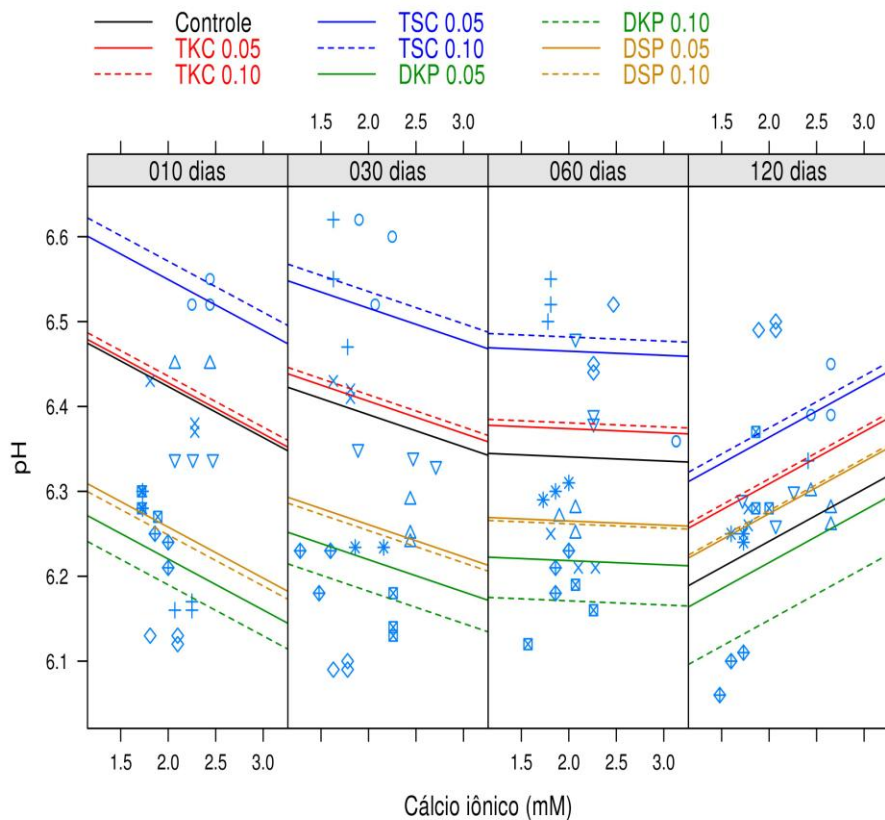


GRÁFICO 7 - Efeito da concentração dos estabilizantes e a $[Ca^{2+}]$ sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem.

Fonte: Da autora.

Neste estudo, as concentrações dos estabilizantes também não interferiram quanto ao teor de cálcio iônico presente no leite esterilizado ($F_{[8,69]} = 0,9360$ $p = 0,4929$). Diante desses resultados, pôde-se observar a interação existente entre o pH e a $[Ca^{2+}]$ e a baixa capacidade sequestrante de Ca^{2+} dos estabilizantes nas concentrações avaliadas (GRAF. 8). Os valores de $[Ca^{2+}]$, neste estudo, variaram entre 1,0 a 3,0 mM, dentro dos padrões citados por Lewis (2011). Segundo esse autor, valores acima desse intervalo podem indicar leite acidificado ou enriquecido com cálcio.

A estabilidade ao etanol ($F_{[1,77]} = 305,3994$; $p < 0,0001$) e a interação deste parâmetro com o tempo de armazenamento ($F_{[1,77]} = 62,7960$; $p < 0,0001$) influenciaram o pH do leite esterilizado (GRAF. 8). Entretanto, não foi

observada interação entre resistência alcoólica e concentração ($F_{[8,69]} = 0,2448$; $p = 0,9806$). Pôde-se verificar, no presente estudo, que as amostras não coagularam em diferentes concentrações de estabilizantes e resistiram ao efeito da esterilização e ao tempo de estocagem, incluindo o controle.

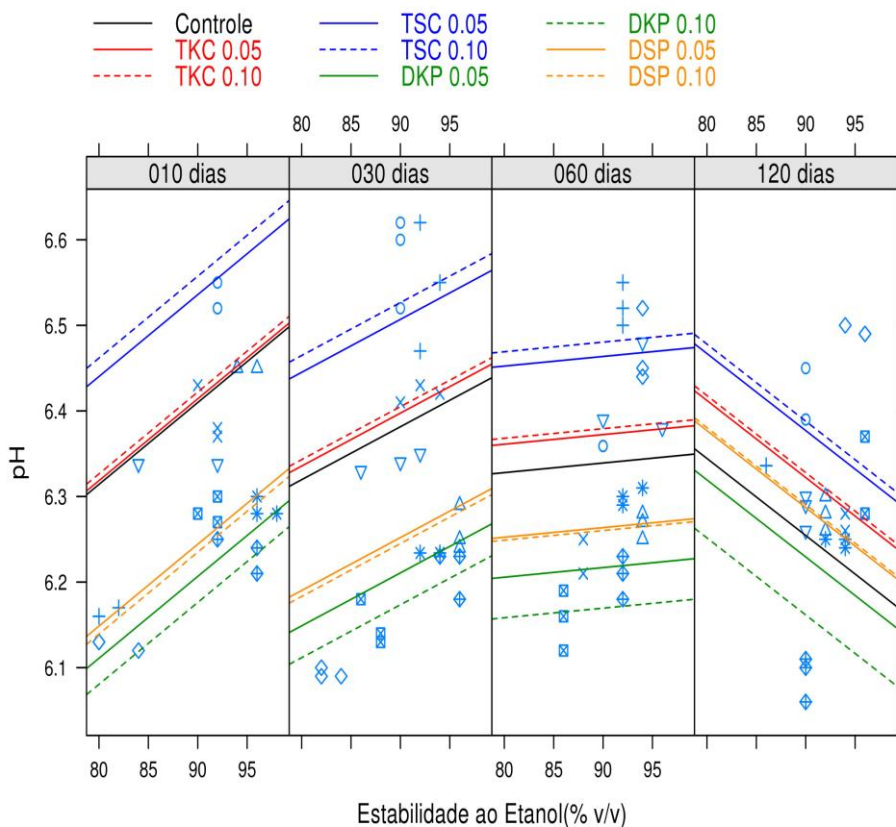


GRÁFICO 8 – Efeito da concentração dos estabilizantes e da estabilidade ao etanol sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem.
Fonte: Da autora.

Vale ressaltar que a matéria-prima utilizada neste estudo foi adquirida da Cooperativa ASSPROLEITE, que recebe o leite cru resfriado em tanques coletivos, diferentemente da maioria dos autores que utilizam leite proveniente de rebanhos individuais. Isso implicaria em mudanças na qualidade físico-química e microbiológica do leite, conforme verificado nos estudos de Brito *et al.*, (2009). Assim, a adição de estabilizantes é uma

alternativa para aumentar a estabilidade térmica do leite que será destinado a tratamentos térmicos severos (LUCEY; HORNE, 2009; SINGH, 2004). Contudo, os resultados do presente estudo evidenciam que os aditivos não foram importantes quanto à estabilidade térmica do leite durante a estocagem.

A sedimentação ($F_{[1,77]} = 3,8349$; $p = 0,0538$) não alterou o pH do leite esterilizado durante a estocagem. Embora a interação desse parâmetro com a concentração foi significativa ($F_{[8,77]} = 8,7424$; $p < 0,0001$), observa-se, Gráfico 9, que a sedimentação ocorreu em intervalos diferentes de pH. O leite com TSC a 0,05 % aumentou a formação de sedimentos com o tempo estocagem, diferente do intervalo de pH do TSC a 0,10%. Esse estabilizante manteve o pH estável à medida que aumentou a quantidade de sedimentos. A amostra controle, bem como, as amostras com TKC, apresentaram o mesmo comportamento. O DSP, nas concentrações avaliadas, apresentou sedimentos na mesma faixa de pH durante o armazenamento, enquanto o DKP promoveu menor formação de sedimentos, comparado com o DSP na faixa de pH 6,35 a 6,10.

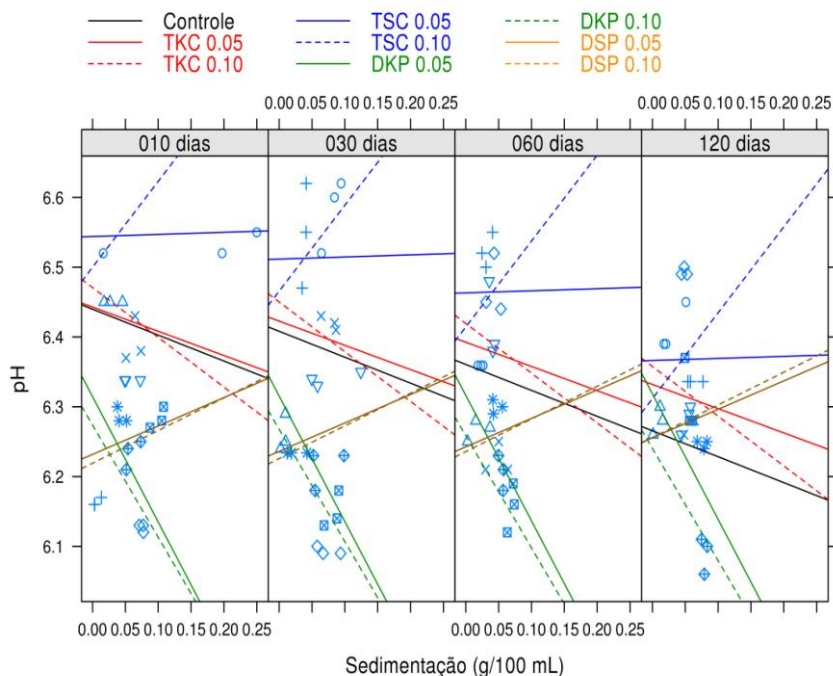


GRÁFICO 9 – Efeito da concentração dos estabilizantes e da sedimentação sobre o pH do leite esterilizado durante a estocagem.
Fonte: Da autora.

Estudos de Silva (2003) mostraram a ocorrência da sedimentação ao longo da estocagem por estado (Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás) e por estação (seca e chuvosa), sendo que a desnaturação de soroproteínas e contagem de células somáticas influenciaram no aumento da formação de sedimentos. Os teores de citrato verificados em amostras de leite cru e UHT contribuíram para reduzir os sedimentos no leite UHT. Melo Junior (2005) verificou a formação de sedimentos durante a vida de prateleira do leite integral UHT influenciada pela alta contagem de células somáticas e micro-organismos psicrotóxicos.

5 CONCLUSÃO

- Adição dos estabilizantes influenciam o pH do leite esterilizado durante a estocagem. Há decréscimo no valor de pH ao longo da estocagem para todos os tratamentos, exceto o DSP. As propriedades físico-químicas (concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol e sedimentação) afetaram o pH do leite adicionado de estabilizantes, sendo fatores importantes nas alterações do pH. Ocorreram alterações no pH quanto à estabilidade ao etanol, aumentou a resistência alcoólica (40 a 50 dias) seguido de decréscimo progressivo durante o armazenamento para os estabilizantes, exceto DSP. Ocorre maior formação de sedimentos em baixas concentrações de etanol, independentemente dos estabilizantes avaliados neste estudo;
- As concentrações dos estabilizantes não influenciam na redução do cálcio iônico, no aumento da estabilidade ao etanol e na redução da formação de sedimentos durante a estocagem. As concentrações do TKC não foram diferentes ao controle quanto a redução do pH do leite esterilizado ao longo da estocagem. Os fosfatos acidificam o pH do leite. O pH do leite esterilizado altera a estabilidade ao etanol e o cálcio iônico, após 60 dias de estocagem, independente dos estabilizantes nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

ABLV. Associação Brasileira de Leite Longa vida. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Estatisticas.aspx>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

AL-SAAD, J. M. S.; DEETH, H. C. Cross-linking of proteins and other changes in UHT milk during storage at different temperatures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 63, p. 93-99, 2008.

BASTOS, M. R. S. Leite longa Vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, p. 32, 1999.

BOUMPA, T.; TSILOULPAS, A.; GRANDISON, A.; LEWIS, M. J. Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goat's milk. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 160–166, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**, aprovado pela Instrução Normativa Nº 68 de 12/12/2006. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar;id=8932>>. Acesso em: 08 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, tipo B, tipo C, pasteurizado e Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**: aprovado pela Instrução Normativa Nº 51 de 18/09/2002. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar;id=8932>>. Acesso em: 08 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT)**: aprovado pela Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar>>. Acesso em: 08 ago. 2011.

BRICKLEY, C. A.; LUCEY, J. A.; MCSWEENEY, P. L. H. Effect of the addition of trisodium citrate and calcium chloride during salting on the rheological and textural properties of Cheddar-style cheese during ripening, **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p. 527-534, 2009.

Brito M. A.; Brito J. R.; Arcuri E.; Lange C.; Silva M.; Souza G. **Estabilidade ao Alizarol**. (2009) Juiz de Fora: EMBRAPA gado de leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_195_21720039246.html>. Acesso em: 05 ago. 2012.

BUSSATA, C.; VALDRUGA, E.; CASIAN, R. L.; Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UHT integral e desnatado, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 408-411, 2005.

CHANDRAPALA J.; MCKINNON I.; AUGUSTIN, M. A.; UDABAGE, P. The influence of milk composition on pH and calcium activity measured in situ during heat treatment of reconstituted skim milk. **Journal of Dairy Research**, v. 7, p. 257–264, 2010.

CHAVEZ, M. S.; LIVIA, M.N.; TAVERNA, M. A.; CUATRIN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p. 201-206, 2004.

CHEN, B. Y.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. S.; Comparison of heat stability of goat milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilization, **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1057-1063, 2012.

DALGLEISH, D.G.; SPAGNUOLO P.A.; GOFF, H.D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, v.14, p. 1025-1031, 2004.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions, em: **Advanced Dairy Chemistry – 1. Proteins. Part AP.** F. Fox and P. L. H. McSweeney., New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 233-270.

DZIEZAK, J. D. Phosphates improve many foods. **Food Technology**, v. 44, p. 80-92, 1990.

FOX, P.F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance **International Dairy Journal**, v.18, p.677-684, 2008.

FOX, P.F. Milk proteins: general and historical behaviour, em: **Advanced Dairy Chemistry – 1. Proteins. Part A.** P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 233-270.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry.** London, U.K: Blackie Academic and professional Press, 1998.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45 p. 473–483, 2005.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability, em: **Milk Proteins: expression to food**, New Zealand: Thompson A., Boland., Singh H. Elsevier Inc, 2009. p. 133-162

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

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3613-3626, 1990.

HORNE, D.; PARKED, T.; Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. IV Effects of forewarming. **Journal of Dairy Research**, v.48, p. 405-415, 1981.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A. L. Properties and constituents of cow's milk in: **Milk Processing and Quality Management.**, Adnan Y. Tamime. Ayr, UK: Wiley-Blackwell Publishing, 2009. p. 23-43.

LACTEOS SEGUROS. **Associação Brasileira das Pequenas e Médias Cooperativas e Empresas de Laticínios**. Disponível em: <http://www.g100.org.br/download/Lacteos_SegurosVI.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2011.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, p. 1-13, 2011.

LEWIS, M. J.; DEETH, H. C.. Heat treatment of milk, in: **Milk Processing and Quality Management**. Adnan Y, Ayr, UK: Wiley-Blackwell Publishing LTDA, 2009. p. 168-200.

LIN, M.-J., LEWIS, M. J., GRANDISON, A. S. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 192–199, 2006.

LOPES, L.C. **Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo**. 63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Milk salts: technological significance, in: **Advanced Dairy Chemistry – 3**. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, New York, USA: Springer Science Business Media, LLC, 2009. p 351-389.

KALIAPPAN, S.; LUCEY, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v.94, p. 4255–4263, 2010.

KELLY, A. L; DATTA, N.; DEETH, H. C. **Thermal processing of dairy products**. Taylor: Francis Group LLC. 2006. p 265-298.

MACHADO, S. C. **Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, RS, p. 132, 2010.

MANSSON, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. **Food e Nutrition Research**, p. 1-3, 2008.

MELO JUNIOR, A. S. **Influência da contagem de células somáticas e micro-organismos psicrotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p.77, 2005.

MILAGRES, M. P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alta eficiência – exclusão de íons**. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.75, 2008.

O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T. Influence of ethanol on the heat induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 312-317, 2006.

ON-NOM N.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Measurement of ionic calcium, pH and soluble divalent cations in milk at high temperature. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 515–523, 2010.

OZCAN-YILSAY, T.; LEE, W.-J.; HORNE, D.; LUCEY, J. A. Effect of trisodium citrate on rheological and physical properties and microstructure of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.4, p.1644–1652, 2007.

PASTORINO, J.; HANSEN, C. L.; McMAHON, D. J.; Effect of sodium citrate on structure-function relationships of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3113–3121, 2003.

PATHOMRUNGSIYOUNGGUL, P. LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effects of calcium-chelating and pasteurization on certain properties of calcium-fortified soy milk. **Food Chemistry**, v.118, p.808–84, 2010.

PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. Apostila: **Processamento de leite de consumo**. Departamento de Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 1991.

PRAKASH, S.; DATTA, N.; LEWIS, M.; DEETH, H.; Reducing fouling during UHT treatment of goat's milk. **Milchwissenschaft**, v. 62, p. 16-19, 2007.

PRATA, L. F. Leite UHT: Solução ou problema? Uma análise da situação. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, p. 10-15, 1998.

QI, P. X. Studies of casein micelle structure: the past and the present. **Lait** 87 _ INRA, EDP Sciences, v. 87, p. 363–383, 2007.

RÉVILLION. J. P. **Estudo das variáveis relevantes na adoção do processamento UHT nas agroindústrias de laticínios do Estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Agronegócios do Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, p.138, 2000.

RIBEIRO, M. E. R; BARBOSA, R. S.; FISCHER, V.; STUMPF JUNIOR, W.; BARROS, L. **Método de determinação de cálcio iônico no leite bovino**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 18 p. 2010. (Documento 321).

RISSO, P.H.; RELING, V. M.; ARMESTO, M. S.; PIRES, M. S.; GATTI, C. A. Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of protolyzed bovine casein micelles, **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 809-817, 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. (Eds) **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007.314p.

SILANIKOVE N, SHAPIRO F.; SHAMAY A. Use of an ionselective electrode to determine free Ca ion concentration in milk of various mammals. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 241–243, 2003.

SILVA, P. H. F. Leite UHT: **Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Juiz de Fora, MG, 2004.127p.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; GIOMBELLI, C. J.; SILVA, M. R. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. **Revista Instituto Laticínios. “Cândido Tostes”**, v. 67, p. 55-60, 2012.

SINDHU, J. S.; TAYAL, M. Influence of sodium citrate on the heat stability of buffalo milk and its concentrate. **Food Chemistry**, v. 15, p. 57-62, 1984.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p.111-119, 2004.

SINGH, H.; CREAMER, L. K.; NEWSTEAD, D. F.; Heat stability of concentrated milk. In: **Heat Induced Changes in Milk**, Brussels: P. F. Fox, International Dairy Federation, 1995. p. 256-274.

SWEETSUR, A. W. M.; MUIR, D. D. The use of permitted additives and heat treatment to optimise the heat stability of skim milk and concentrated skim milk. **Journal Society Dairy Technology**, v.3, p. 101–105, 1980.

TANAKA, M.; SUZUKI, T.; KOTB, S.; KAMIYA, Y. Relation of Calcium Activity in Milk and Milk Production of Holstein Cows in Hot Season. **Asian-Australian Journal Animal Science**. v. 24, p.1372 – 1376, 2011.

TEAM, R Development Core R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 5 nov. 2012.

TSIOULPAS, A.; KOLIANDRIS, A.S.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M. J. Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry** v.122, p.1027–1034, 2010.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of minerals on casein micelle stability. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 167–173, 2007.

UDABAGE, P.; MCKINNON, I.R.; AUGUSTIN, M. A. A.Effects of Mineral Salts and Calcium Chelating Agents on the Gelation of Renneted Skim Milk. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 1569–1575, 2001.

VIANNA, P. C. B.; WALTER, E. H. M.; DIAS, M. E. F.; FARIA, J. A. F.; GIGANTE, M. L. Effect of addition of CO₂ to raw milk on quality of UHT-treated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4256-4262, 2012.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J. A.; NOOMEN, A. J.; A. JELLEMA, A. VAN BOEKEL M. A. J. S. **Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes**. New York, NY: Marcel Dekker Inc, 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy Chemistry and Physics**, New York, NY: JohnWiley; Sons Inc. 1984.