

Camila Nair Batista Couto

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DE LEITE
NO ÍNDICE DE CASEINOMACROPEPTÍDEO**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal**

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

Orientadora: Mônica de Oliveira Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2011**

*Aos meus queridos pais, Célio e Cecília, por
todo amor, carinho e apoio*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Célio e Cecília, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Célio, Caroline e César, por trazerem alegria a minha vida.

Ao Rafael, meu amor, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e apoio incondicional.

A Professora Mônica de Oliveira Leite pela orientação clara, confiança e ensinamentos.

Ao Professor Marcelo Resende de Souza pela co-orientação, disponibilidade em todos os momentos, apoio e ensinamentos.

A Professora Ângela, pelos ensinamentos estatísticos e sugestões.

Ao Danilo pela dedicação, paciência e ensinamentos na análise estatística dos dados.

Aos membros da Comissão Examinadora pelas contribuições.

Aos Professores Afonso, Cláudia, Leorges, Mônica Cerqueira, Wagner por serem ótimos mestres.

A Taynara pelo treinamento e ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários do DTIPOA, Fátima, Maura, Marco Antônio, Milton e Valéria por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

A Fernanda, companheira de todas as horas, pela amizade encontrada.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Ciência Animal.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

A Deus por tornar tudo isso possível.

ÍNDICE

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. LEITE	14
2.1.1 Leite cru refrigerado	15
2.1.2 Leite pasteurizado.....	16
2.1.3 Leite Ultra Alta Temperatura (UAT).....	17
2.1.4 Soro lácteo	17
2.2 FRAUDES EM LEITE	18
2.2.1 Fraudes por adição de soro em leite e métodos de detecção	19
2.3 CASEÍNA	21
2.3.1 Caseinomacropéptido (CMP)	24
2.4 AÇÃO DO CONGELAMENTO SOBRE O LEITE.....	24
2.5 AÇÃO ENZIMÁTICA NO LEITE	26
2.5.1 Enzimas sintetizadas por micro-organismos psicrotróficos	27
2.6 CROMATOGRAFIA	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	30
3.1.1 Leite cru.....	30
3.1.2 Leite pasteurizado integral.....	31
3.1.3 Leite UAT integral.....	31
3.2 MÉTODO DE ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CMP POR CLAE.....	32
3.2.1 Preparo da fase móvel.....	32
3.2.2 Curva de calibração	32
3.2.4 Análise quantitativa	33
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 LEITE CRU	34
4.2 LEITE PASTEURIZADO	43
4.3 LEITE UAT.....	51
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da micela de caseína.....	22
Figura 2 - Camada externa (“pilosa”) da micela de caseína.....	23
Figura 3 - Sequência primária κ -caseína variante B, ilustrando as substituições para a variante A e o ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) de enzimas proteolíticas.	23
Figura 4 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite cru na enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos.....	36
Figura 5 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação à enumeração de micro-organismos psicrotróficos (UFC/mL).....	38
Figura 6 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação à altura do pico de CMP do cromatograma.....	40
Figura 7 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C em amostras de leite cru em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100 mL), com curvas de regressão linear e coeficiente de determinação.	42
Figura 8 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite cru em relação ao pH.	43
Figura 9 - Variação na enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado durante 8 dias a 6°C e -12°C , com sua curva de regressão e coeficientes de determinação.....	46
Figura 10 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação ao índice de CMP.....	48
Figura 11 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite pasteurizado em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100mL), com sua curva de regressão e coeficiente de determinação.	49
Figura 12 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de 6°C e -12°C de armazenamento de amostras de leite pasteurizado em relação ao pH, com sua curva de regressão e coeficiente de determinação.....	51

Figura 13 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 21°C, 6°C e -12°C de amostras de leite UAT em relação à altura do pico do cromatograma, com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.....	53
Figura 14 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento 21°C, 6°C e -12°C de amostras de leite UAT em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100mL), com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.....	57
Figura 15 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento 21°C, 6°C e -12°C de leite UAT em relação ao pH das amostras, com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos para controle de qualidade do leite cru	34
Tabela 2 - Enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos (UFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas a temperatura de -12°C e 6°C, durante 4 dias (n=6).....	35
Tabela 3 - Variação média da enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos em amostras de leite cru armazenadas em temperaturas de 6°C e -12°C durante 4 dias	36
Tabela 4 - Enumeração de micro-organismos psicrotóxicos (UFC/mL) em leite cru armazenado em temperaturas de -12°C e 6°C durante 4 dias (n=6).....	37
Tabela 5 - Médias da altura dos picos de CMP em amostras de leite cru armazenadas em temperaturas de -12°C e 6°C durante 4 dias (n=6).....	39
Tabela 6 - Resultado da análise de acidez titulável (mg ácido láctico/100 mL) diária, de amostras de leite cru armazenadas a 6°C e -12°C durante 4 dias (n=6).....	41
Tabela 7 - Efeito do pH de amostras de leite cru armazenadas a 6°C e -12°C durante 4 dias (n=6)	42
Tabela 8 - Resultados médios das análises de composição centesimal, microbiológicas, contagem de células somáticas e de detecção de resíduos químicos nas amostras de leite cru	44
Tabela 9 - Variações médias dos resultados das análises microbiológicas, índice de CMP, acidez titulável e pH observadas entre o leite pasteurizado e o leite cru que lhe deu origem	44

Tabela 10 - Contagem (UFC/mL) de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado armazenado em temperatura de -12°C e 6°C durante 8 dias (n=6).....	46
Tabela 11 - Valores médios da altura dos picos de CMP em amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 8 dias.....	47
Tabela 12 - Comparação entre a altura do pico de CMP de amostras de leite pasteurizado no tempo 0 e após 8 dias de armazenamento nas temperaturas de -12°C e 6°C	48
Tabela 13 - Acidez titulável (mg ácido láctico/100mL) de amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 08 dias.....	49
Tabela 14 - Efeito do pH de amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 8 dias (n=6).....	50
Tabela 15 - Coeficiente de variação da altura do pico de CMP de amostras de leite UAT armazenados a 21, 6 e -12°C	52
Tabela 16 - Coeficiente de variação médio da altura do pico de CMP de amostras de leite UAT armazenadas a 21, 6 e -12°C	53
Tabela 17 - Valores médios da altura dos picos de CMP em amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias	53
Tabela 18 - Variação (%) da altura do pico de CMP do cromatograma em relação à temperatura de armazenamento e altura máxima	55
Tabela 19 - Acidez titulável (mg ácido/100mL) de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias.....	56
Tabela 20 - Resultados médios da análise de pH das amostras de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias	58
Tabela 21 - Índice de CMP (mg/L) de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C durante 120 dias (n=6).....	60

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leites cru, pasteurizado e UAT, em relação ao índice de CMP, por meio da CLAE. Os parâmetros avaliados foram a altura do pico de CMP por CLAE, a acidez titulável, o pH, a enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. Foram coletadas seis amostras de leite cru, que foram subdivididas em frascos plásticos estéreis e armazenadas nas temperaturas de 6°C e -12°C durante o período máximo de quatro dias. As análises de composição química e contagem de células somáticas foram efetuadas em equipamento eletrônico Bentley CombSystem 2300. O leite pasteurizado foi obtido a partir das amostras de leite cru que foram submetidas a temperatura de 65°C por 30 minutos. Foram posteriormente subdivididas em frascos plásticos estéreis e armazenadas nas temperaturas de 6°C e -12°C durante o período máximo de oito dias. Avaliou-se também, a ausência de *Salmonella* spp., o número mais provável (NMP) de coliformes a 30/35°C e 45°C e a atividade das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase. As amostras de leite UAT pertencentes a seis lotes de produção foram armazenadas, nas próprias embalagens, nas temperaturas de 21, 6 e -12°C durante o período máximo de 120 dias. O delineamento adotado foi blocos casualizados com arranjo fatorial. Observando o sistema hierárquico no arranjo fatorial 2x5 para as amostras de leite cru e pasteurizado. Adotou-se para o leite UAT o arranjo fatorial 3x5. Foram realizadas seis repetições do experimento. Os tratamentos utilizados foram submetidos à análise de variância e posterior comparação de suas médias, por meio do teste Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de 5% de significância. Concluiu-se que as amostras de leite cru armazenadas a 6°C até quatro dias e as de leite pasteurizado conservadas a -12°C até oito dias podem ser avaliadas em relação ao índice de CMP sem que ocorra prejuízo dos resultados. A detecção de fraude por adição de soro lácteo em leite UAT pode ser detectada tão somente logo após o envase devido à proteólise progressiva que ocorre durante o período de validade do produto. Caso não seja possível a análise imediata, recomenda-se que as amostras sejam congeladas. A pesquisa do índice de CMP por CLAE é muito precisa (CV=1,9%) e indiferente às condições de armazenamento e teor de CMP das amostras.

Palavras-chave: leite cru, leite pasteurizado, leite UAT, altura do pico de CMP, cromatografia líquida de alta eficiência, temperatura de armazenamento, tempo de armazenamento.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the influence of temperature and storage time of samples of raw milk, pasteurized and UHT milk, compared to the ratio of CMP by HPLC. The parameters evaluated were the peak height of CMP by HPLC, acidity, pH, the enumeration of micro-organisms aerobic mesophilic and psychrotrophic. Six samples of raw milk were collected, subdivided into sterile plastic bottles and stored at temperatures of 6°C and -12°C for a maximum period of four days. Analyses of chemical composition and somatic cell counts were made on electronic equipment Bentley CombSystem 2300. Pasteurized milk was obtained from the raw milk samples that were subjected to a temperature of 65°C for 30 minutes. Posteriorly were subdivided into sterile plastic bottles and stored at temperatures of 6°C and -12°C for a maximum period of eight days. It was analyzed also the absence of *Salmonella* spp., the most probable number (MPN) of coliforms at 30/35°C and 45°C and the enzymes activity of alkaline phosphatase and peroxidase. UHT milk samples from six production batches were stored in the packaging itself, at temperatures of 21, 6 and -12°C for a maximum period of 120 days. The study design was randomized blocks with factorial arrangement. Noting the hierarchical system in a 2x5 factorial arrangement for the samples of raw milk and pasteurized. Adopted for whole milk UHT the 3x5 factorial design. Were performed six repetitions of the experiment. The treatments were subjected to analysis of variance and subsequent comparison of their means, through the Student-Newman-Keuls (SNK) at the 5% significance level. It was concluded that the samples of raw milk stored at 6°C up to four days and pasteurized milk stored at -12°C up to eight days may be assessed in relation to an index of CMP without prejudging the results. The detection of fraud by the addition of whey in UHT milk so can be detected only after the filling phase due to proteolysis that occurs during the period of validity of the milk. If it is not possible for immediate consideration, it is recommended that samples be frozen. The search index CMP by HPLC is very precise (CV=1.9%) and indifferent to the conditions of storage and content of the CMP samples.

Keywords: raw milk, pasteurized milk, UHT milk, peak height of CMP, high efficiency liquid chromatography, storage temperature, storage time

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo por conter proteínas de elevado valor nutricional, gorduras de fácil digestão, ser fonte de açúcares, vitaminas e sais minerais. Constitui-se matéria-prima de extrema versatilidade tecnológica, devido à sua composição, cujos constituintes, de modo isolado ou em conjunto, proporcionam um grande número de derivados.

As características físico-químicas e sensoriais do leite e de seus derivados são influenciadas pela proteólise que, além de conferir características diferenciadas que favorecem a qualidade do produto final, podem ser tecnologicamente indesejáveis, por produzir uma variedade de aromas e sabores desagradáveis, redução do rendimento de queijos e geleificação em leite esterilizado comercialmente por ultra alta temperatura (UAT), limitando assim, a qualidade dos produtos lácteos.

A atividade proteolítica do leite pode ter origem de enzimas endógenas, como a plasmina ou proteases de leucócitos presentes no leite, de enzimas (renina) adicionadas durante o processo de fabricação de queijos ou de micro-organismos psicrotróficos, que produzem proteases extracelulares liberadas no leite e contribuem de maneira significativa para a degradação de proteínas (Santos, 2003).

O mecanismo de ação das proteases é similar à coagulação do leite pela renina. Como consequência dessa similaridade entre a ação proteolítica das proteases bacterianas psicrotróficas e a coagulação pela renina tem-se a dificuldade de se pesquisar o Índice de Caseinomacropéptido (CMP), uma vez que não se consegue diferenciar o leite (cru, pasteurizado ou UAT) com proteólise avançada do leite adicionado de soro de lácteo

(Fukuda, 2003). Deve-se considerar, também, que essas enzimas são termoresistentes e possuem ação continuada em leite pasteurizado e UAT.

A pesquisa do índice de CMP é um método analítico físico-químico oficial, para controle de fraude por adição de soro ao leite e produtos lácteos. Baseia-se na detecção e quantificação de CMP proveniente da ação proteolítica de enzimas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV) (Brasil, 2006 (a)).

A CLAE, metodologia oficial e consagrada pela literatura, deve ser aplicada como análise de rotina para a determinação do índice de CMP, tendo em vista a fraude por adição de soro lácteo, a atividade de proteolítica, o controle da qualidade da matéria-prima e do produto acabado.

Os serviços de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, seja federal ou estadual, têm como procedimento usual a remessa de amostras de leite congelado, logo após a coleta, para a pesquisa de soro por CLAE. Porém, o congelamento das amostras pode afetar os resultados do teor de CMP, sendo necessária a continuação desta linha de pesquisa com a ampliação do universo amostral e segmentação de variáveis de estudo.

O presente trabalho teve, portanto, o objetivo de avaliar a influência da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leites cru, pasteurizado e UAT, em relação ao índice de CMP, por meio da CLAE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leite

Leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (Brasil, 1997).

O leite é um sistema coloidal constituído por uma solução aquosa de carboidratos (5%), lipídios (3,9%), proteínas e substâncias nitrogenadas não protéicas (3,2%), sais minerais (0,7%), vitaminas, enzimas e pigmentos (Riel, 1991). Os elementos sólidos (gordura, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas) representam aproximadamente 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas, estrutura e cor encontradas nos produtos lácteos (Brito et al., 2005 (a)).

No ano de 2007, de acordo com Food and Agriculture Organization (FAO), o Brasil foi classificado como o sexto maior produtor mundial de leite, com produção anual de aproximadamente 25.500 milhões de litros de leite. Sendo, deste total, 17.889 milhões de litros submetidos aos Serviços de Inspeção Federal (SIF). Os principais produtos obtidos a partir da industrialização do leite em estabelecimentos são o queijo (34%), seguido do leite UAT (26%), leite em pó (18%) e leite pasteurizado (7%) (Embrapa, 2008).

A qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema de ordens social, cultural e econômica. Ao se promover uma melhoria na qualidade, deve-se levar em conta que o controle inicia-se no processo de produção na fazenda, por meio da aquisição e manutenção de animais saudáveis e um manejo higiênico e sanitário adequado. Nas etapas de industrialização, distribuição e comercialização, são vários os cuidados que devem ser tomados, devendo-se fazer um esforço integrado para garantir a qualidade do produto final. Consequentemente, o investimento em qualidade beneficia diretamente o produtor que recebe melhor devido ao pagamento por qualidade, a indústria que tem maior rendimento e controle dos processos de beneficiamento de leite e produção de derivados e o consumidor por ter a oportunidade de adquirir um produto saboroso, nutritivo e seguro (Andreatta, 2008).

Considerando a necessidade de aperfeiçoamento e modernização da legislação sanitária federal sobre a produção de leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou em 2002, a Instrução Normativa nº 51, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade de diferentes tipos de leite e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel (Brasil, 2002). Estes regulamentos têm como objetivo promover a melhoria da qualidade do leite; oferecer ao consumidor um produto de melhor qualidade; aumentar a renda do produtor rural (pagamento por qualidade); agregar valor aos produtos lácteos; melhorar o rendimento industrial (matéria-prima de melhor qualidade); permitir o acesso e aumentar a competitividade em novos mercados (Costa, 2007).

2.1.1 Leite cru refrigerado

Leite cru refrigerado é o leite refrigerado, mantido na temperatura máxima de 7°C na propriedade rural, em tanques de refrigeração individuais ou comunitários e de 10°C no estabelecimento processador, e transportado em carro-tanque isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado, para ser processado. Deve apresentar requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos de acordo com os Anexos I e II, nos quais estão também indicados os métodos de análises e frequências correspondentes (Brasil, 2002).

Visando à conservação da qualidade do leite cru refrigerado até a recepção em estabelecimento submetido à inspeção sanitária oficial, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser no máximo de 48 horas, independentemente do seu tipo, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas (Brasil, 2002).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesofílicas que causam a acidificação. Entretanto, isso levou ao favorecimento da multiplicação da microbiota psicrotrofica presente na matéria-prima. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que favorece a proliferação de

micro-organismo psicrotóxicos (Fagundes et al., 2004).

Fonseca (2005), avaliando a qualidade de leite cru refrigerado, verificou que a estação climática influencia a composição do leite, havendo elevação dos teores percentuais de gordura, proteína e sólidos totais durante os períodos de seca (outono e inverno). A contagem de células somáticas (CCS) está relacionada com o aumento nos teores de gordura e a redução nos teores de lactose. A contagem bacteriana apresentou maiores valores nos períodos de chuva (dezembro a março), devido à maior contaminação durante o verão em decorrência das maiores umidades e elevadas temperaturas, sendo essas, características que favorecem o crescimento bacteriano.

Dentre os micro-organismos contaminantes do leite, o grupo dos psicrotóxicos, os quais podem ser classificados pela sua capacidade de multiplicação em temperatura abaixo de 7°C, independentemente da temperatura ótima de crescimento, tem importância crescente em função da refrigeração do leite cru na fazenda, durante o transporte e até o momento do processamento. Quando o leite é mantido em refrigeração, depois de 48 horas, ocorre intensa produção de proteases e lipases, as quais degradam a proteína e a gordura do leite, respectivamente. Essas enzimas são sintetizadas por leucócitos e pelos micro-organismos contaminantes do leite, destacando-se a termo estabilidade como a característica mais importante, o que significa que a sua atividade hidrolítica permanece mesmo após o leite ser submetido a tratamentos térmicos, como pasteurização e a ultra-alta temperatura. Em relação à degradação de proteínas do leite, o grupo mais sensível a ação de proteases é a caseína e as alterações podem ser identificadas por consumidores na forma de coagulação parcial

ou mesmo pelo aumento da viscosidade do leite (Santos, 2007).

Lorenzetti (2006) observou que, durante a estocagem do leite cru, as contagens de micro-organismos psicotróficos aumentaram mesmo com o leite sob temperatura de refrigeração, sugerindo que um tempo mínimo de estocagem para a matéria-prima deve ser meta dos laticínios. Além dos micro-organismos psicotróficos, também se pode observar um aumento das contagens totais de micro-organismos, de *Pseudomonas* spp., de termofílicos mesófilos e psicotróficos e de esporos mesófilos e psicotróficos que diminuem a qualidade do leite (Savindo, 2007).

2.1.2 Leite pasteurizado

Leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir de leite cru refrigerado, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador (Brasil, 2002).

Leite pasteurizado, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluída, deve ser submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72°C a 75°C durante 15 a 20 segundos, sendo considerada como pasteurização rápida clássica. O tratamento térmico ocorre em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Outros binômios podem ser utilizados para o tratamento

térmico acima descrito, equivalentes ao da pasteurização rápida clássica e de acordo com as indicações tecnológicas pertinentes, visando à destinação do leite para a elaboração de derivados lácteos (Brasil, 2002).

Após a pasteurização, o produto assim processado deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina, teste positivo para peroxidase e Número Mais Provável de coliformes 30/35°C menor que 0,3 mililitro de amostra (NMP/mL) (Brasil, 2002).

Savindo (2007) observou que tanto o tempo de estocagem do leite cru refrigerado como a temperatura de armazenamento do leite pasteurizado afetou a qualidade e a vida de prateleira dos produtos. Assim, quanto menores o tempo de armazenamento do leite cru e a temperatura de estocagem do leite pasteurizado, melhor a qualidade do produto.

Paiva (2007) avaliou 151 amostras de leite pasteurizado que apresentaram média de enumeração de coliformes a 30°C de 60,90NMP/mL. Considerando o parâmetro para amostra indicativa da IN 51/2002 (M=4), 113 amostras (74,83%) não atenderam ao padrão. Destas, 29 (25,66%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de fosfatase alcalina. A enumeração de coliformes termotolerantes (45°C) apresentou média de 24,7NMP/mL. Considerando o plano de amostragem para coliformes 45°C (M=2), 80 amostras (52,98%) estavam não conformes. A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, em média, foi de $1,38 \times 10^5$ UFC/mL. Sessenta amostras (39,74%) apresentaram resultado maior do que $2,5 \times 10^5$ UFC/mL (M= 8×10^4 UFC/mL). A mensuração do número de micro-organismos mesófilos aeróbios do leite pasteurizado serve como auxílio na avaliação da qualidade e conservação.

2.1.3 Leite Ultra Alta Temperatura (UAT)

Leite UAT é o leite homogeneizado que foi submetido, durante dois a quatro segundos, a uma temperatura entre 130 e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condição asséptica em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 1996).

Os maiores problemas encontrados na produção de leite UAT são a coagulação durante o processo de tratamento térmico e gelatinização e/ou sedimentação durante o armazenamento (Singh e Creamer, 1992)

O aquecimento do leite pode ser responsável também pela desagregação das micelas de caseína, resultando em um aumento da proteólise e alterações das propriedades reológicas do leite. Nesta fase, o ponto de maior controle é o binômio tempo-temperatura, que garante a esterilização comercial. A aplicação de temperaturas inferiores às estabelecidas é indesejável por não se garantir a esterilização comercial e acima pode causar problemas tecnológicos como proteólise, interferindo no sabor, geleificação, formação de sedimentos, perda do valor nutricional e escurecimento (Bastos, 1999)

O tratamento UAT tem sido amplamente adotado em laticínios, sendo bastante aceito pelos consumidores, devido à facilidade de estocagem do leite UAT em temperatura ambiente e maior vida de prateleira. Isso possibilita a inclusão do leite na compra mensal do consumidor, não necessitando adquiri-lo diariamente, como o leite pasteurizado (Viegas et al., 2006).

Rossi Júnior et al. (2006) verificaram que a população de micro-organismos mesófilos apresentaram números na ordem de 10^7 e 10^8 UFC/mL no leite cru, entre 10^3 e 10^5 UFC/mL no leite pasteurizado e entre $<10^0$ e 10^1 UFC/mL no leite UAT. Sendo, portanto, o tratamento térmico aplicado ao leite UAT capaz de reduzir, mas não de eliminar a carga microbiana encontrada no leite cru. Na contagem de micro-organismos psicrotóxicos, os números variaram de 10^4 a 10^8 UFC/mL no leite cru e de $<10^1$ a 10^2 UFC/mL no leite pasteurizado e UAT. A qualidade microbiológica da matéria prima para a fabricação do leite UAT é, atualmente, um limitante para sua vida de prateleira, pois pode influenciar no aparecimento de alterações (Santos, 2007).

2.1.4 Soro lácteo

Soro lácteo é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, destinado à fabricação de queijos e caseína (Kosikowski, 1979; Brasil, 1997), que se separa do coágulo durante a fabricação convencional (Kosikowski, 1979; Furtado e Lourenço Neto, 1994). A composição e o tipo de soro produzido na indústria leiteira variam em função dos processos tecnológicos empregados, do leite utilizado e do tipo de queijo fabricado (Furtado e Wolfschoon-Pombo, 1979).

Os dois tipos de soro existentes são o soro doce (pH 5,9-6,6), obtido por coagulação enzimática na fabricação da maior parte dos tipos de queijos; e o soro ácido (pH 4,3-4,6) que é originado da fabricação de queijos por coagulação ácida, na qual além da cultura láctea, também pode ser adicionado ácido láctico (Kosikowski, 1979). O soro lácteo representa aproximadamente 90% do volume de leite que entra na produção de queijos e os

sólidos representam 50 a 55% dos sólidos totais do leite, apresenta em média, 93,6% de água; 6,4% de sólidos totais; 4,8% de lactose; 0,05% de gordura; 0,55% de proteína e 0,5% de minerais em sua composição (Dairy, 2003).

O valor nutricional do soro lácteo é de grande interesse para as indústrias de alimentos. Ele tem sido processado visando à obtenção de produtos como o soro em pó e a bebida láctea e diversas tecnologias estão sendo empregadas para a recuperação de seus componentes, como posterior transformação em produtos comercializáveis. Além disso, o aproveitamento do soro pode contribuir para a redução dos problemas ambientais causados pela sua eliminação em efluentes (Siqueira, 2000).

Na fabricação de queijos, a fração de glicomacropéptido (GMP) é resultante da hidrólise da κ -caseína pela ação do coalho (renina) e é liberada com o soro. O processo é idêntico ao que ocorre na proteólise do leite cru, pasteurizado ou UAT (Fukuda, 2003).

A legislação brasileira estabelece que o leite pasteurizado, UAT e o leite em pó não podem conter sólidos de soro lácteo. Porém, em decorrência do baixo custo do soro e por ser uma forma de aproveitamento desse resíduo da indústria queijeira, torna-se economicamente atrativa a adição do soro ao leite, tornando assim a concorrência mercadológica desleal, prejudicando a empresas idôneas e o consumidor. A prática desse tipo de fraude é ainda difícil de ser controlada pelas autoridades competentes, sendo a determinação do índice de CMP por CLAE, um dos métodos oficiais propostos para a detecção dessa adulteração (Carvalho et al., 2007).

2.2 Fraudes em leite

Segundo o artigo 543, do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), é considerado fraudado, adulterado ou falsificado o leite que for adicionado de água, tiver sofrido subtração de qualquer dos seus componentes, estiver cru e for vendido como pasteurizado, for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade e for adicionado de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição (Brasil, 1997).

A autenticidade dos alimentos é um problema global. Sendo, portanto, cada vez mais importante detectar e impedir a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de produtos de qualidade inferior, tanto por razões econômicas, quanto por razões de saúde pública. A falsificação é um delito resultante da adulteração de um produto, visando lucro ilícito. Isto significa lesar e enganar, seja por adição de uma matéria qualquer ou pela subtração de um dos seus elementos, em condições tais que o mesmo não corresponda ao produto normal (Behmer, 1999).

A Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006, do MAPA, institui critério de avaliação da qualidade do leite com base no “Índice CMP”, de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, sendo que o leite destinado ao abastecimento direto deve apresentar índice de CMP até 30 mg/L (trinta miligramas por litro). Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30mg/L e 75mg/L, este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos, após avaliação técnica, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. O leite que apresentar índice de CMP acima de 75mg/L poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino

a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo DIPOA (Brasil, 2006 (b)).

A avaliação da conformidade é um método de examinar, sistematicamente, o grau de atendimento de um produto, processo ou serviço aos requisitos de normas ou de regulamentos técnicos pré-estabelecidos. Quando compulsória, é feita pelo governo, destinada prioritariamente à proteção e defesa do consumidor. Quando voluntária, torna-se uma ferramenta de desenvolvimento industrial, passando a ser um diferencial competitivo (INMETRO, 2007).

Os alimentos ou ingredientes mais suscetíveis às práticas fraudulentas são aqueles com alto valor ou que se submetem a várias etapas de processamento. O leite é um dos produtos que pode ser adulterado de várias maneiras afetando a sua qualidade e a dos derivados lácteos. A adulteração do leite por adição de ingredientes de baixo valor, tais como água e soro lácteo, é conhecida como "adulteração econômica" e esta prática tem sido registrada muitas vezes (Oancea, 2009).

A Portaria Conjunta nº 46, de 17 de junho de 2008, dispõe sobre a criação do Comitê Gestor de Monitoramento da Qualidade do Leite - CQUALI/Leite com a finalidade de definir estratégias, diretrizes e gerir ações integradas de monitoramento permanente do leite produzido e comercializado no País, fortalecendo as medidas de prevenção e combate à fraude e de proteção à saúde e segurança da população, bem como realizar intercâmbio de informações para melhorar o desempenho da atividade de fiscalização (Brasil, 2008).

O Código de Proteção e Defesa do Consumidor, estabelecido na Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990, protege os direitos dos consumidores. Dessa forma, qualquer pessoa que adquira o leite para uso próprio ou

de sua família é considerada consumidor e está protegida por ele. Ele determina como direito básico do consumidor a proteção da sua saúde e segurança. Assim, todo o leite comercializado deve atender aos parâmetros de qualidade e segurança definido pelos órgãos fiscalizadores competentes, não podendo acarretar riscos à saúde do consumidor. Outro direito básico do consumidor é o direito à informação adequada e clara, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço do leite. Isso significa que as informações constantes do rótulo e da oferta do alimento devem corresponder ao seu conteúdo, sob pena de violação ao Código de Proteção e Defesa do Consumidor (Cquali, 2008).

2.2.1 Fraudes por adição de soro em leite e métodos de detecção

O leite fraudado com soro lácteo, apesar de não apresentar as mesmas características do leite íntegro, não é detectado por técnicas de rotina de controle de qualidade do leite, motivo pelo qual algumas técnicas foram desenvolvidas com a finalidade específica de detectar este tipo de adulteração. Esses métodos se baseiam, principalmente, na alteração da distribuição protéica original do leite provocada por adição de soro lácteo, examinando-se esta distribuição nos níveis de nitrogênio, aminoácidos e proteínas (Furtado, 1989).

A quantificação do CMP é o indicador atualmente mais recomendável para se detectar a adição de soro lácteo ao leite. Um dos métodos utilizados para a quantificação do CMP detecta a presença do ácido N-acetilneuramínico (NANA, também denominado ácido siálico). Após reação com resorcinol, o ácido siálico pode ser dosado

quantitativamente por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 549nm (Warren, 1959 citado por Carvalho et al., 2007). Esse método foi modificado por Wolchoon-Pombo e Pinto (1985) por meio da substituição do agente complexante resorcionol pelo reagente de Erlich, e é o método de triagem utilizado pelos laticínios no Brasil para pesquisa de soro lácteo em leite. O método modificado permite detectar adulteração de leite fresco pasteurizado com, no mínimo, 2% de soro lácteo, porém, demanda um tempo excessivo de análise. Outra desvantagem deste método é que pode ainda sofrer interferência causada por proteases oriundas de bactérias psicrotóxicas e de leite proveniente de animais com mastite.

Fukuda et al. (1996) propuseram a utilização do método da ninidrina ácida como um teste de triagem para a classificação do leite recebido pelas indústrias de laticínios quanto à possível fraude por adição de soro, classificando-o como negativo (absorbância a 470nm $\leq 0,300$ ou $\leq 5,14$ mg Nana livre/mL de leite), suspeito (absorbância a 470nm entre 0,300 e 0,600 ou entre 5,14 a 10,64mg Nana livre/mL de leite) ou positivo (absorbância a 470nm $>0,600$ ou $>10,64$ mg Nana livre/mL de leite).

Alvin (1992) fez um estudo da influência da qualidade do leite nos resultados do método de CLAE com filtração gélida (CLAE-FG), quando utilizado para detectar soro lácteo adicionado neste produto, e concluiu que os resultados positivos, quanto à presença de GMP, podem ser interpretados como adição de soro ao leite ou como provenientes da detecção de produtos de degradação protéica do leite de péssima qualidade.

Dracz (1996) desenvolveu um método imunoenzimático para determinação de soro lácteo adicionado ao leite. Uma vantagem do

método desenvolvido em relação ao método oficial que utiliza a CLAE-FG é que permite analisar várias amostras ao mesmo tempo, dispensando o uso de equipamentos de alto custo, além de ser de fácil execução, possibilitando o uso inclusive em plataformas de laticínios, podendo ser utilizado para seleção de leite UAT. O método foi capaz de detectar até 1% v/v, de soro lácteo adicionado ao leite.

Os métodos da ninidrina ácida e da CLAE são capazes de monitorar a evolução proteolítica no leite. O congelamento das amostras de leite pode afetar os resultados do teor de CMP por ninidrina ácida e CLAE. Assim, o ideal é que a determinação do CMP seja feita de imediato com amostras recolhidas não congeladas (Fukuda, 2003).

Vidal-Martins et al. (2005) avaliaram 25 amostras de leite UAT durante 120 dias de vida de prateleira e verificaram aumento gradativo do índice proteolítico, que variaram de 5,12 a 24,70 μ g de ácido siálico/mL, no decorrer do armazenamento.

A detecção de soro de queijo em leite cru, por meio da CLAE, pode ser feita por períodos, de até oito dias sem que ocorra alteração dos resultados, quando adicionado bronopol as amostras e as mesmas forem armazenadas a 7°C e 30°C (Lasmar, 2007).

Magalhães (2008) verificou que a adição de soro, até 20%, em leite UAT pode ser detectada pela determinação do índice de CMP por CLAE-FG e CLAE em fase reversa com detecção por espectrometria de massa (CLAE-FR/EM).

A análise de CMP no leite por CLAE-FR/EM foi capaz de detectar a adição de soro lacteo ao leite sem proteólise e a proteólise do leite por enzimas provenientes de *Pseudomonas*.

fluorescens. Porém, quando o leite estiver proteolizado por *P. fluorescens* e adicionado de soro não é possível a diferenciação da origem do CMP (Magalhães, 2008).

Andrade et al. (2009) avaliaram 109 amostras de leite cru, por CLAE, e verificaram que 77,07% (84) das mesmas apresentaram índice de CMP de até 30mg/L, 20,18% (22) apresentaram este índice entre 30 e 75mg/L e apenas 2,75% (3) se encontravam acima de 75mg/L; porém, a proteólise bacteriana deve ser levada em consideração como um fator interferente.

A determinação de CMP em leite UAT, por meio de eletroforese, é uma técnica específica e sensível para detectar níveis de adulteração com soro de leite. Este estudo constatou que 70% das dez marcas de leite analisadas tiveram adições de soro maiores que 1%, o que não pode ser detectado pela análise das características físico-químicas de leite. As mesmas amostras foram analisadas por CLAE, sendo que, 50% das mesmas (30,0mg/L), chegando a 13,3 vezes acima do valor permitido para leite destinado a consumo direto.

A CLAE possibilita ainda quantificação da porcentagem de soro lácteo e o índice de CMP de bebidas lácteas fermentadas, obtendo-se assim maiores informações sobre o teor de soro lácteo adicionado ao leite para a fabricação desse produto, tendo em vista que a proporção entre esses ingredientes não se encontra fixada no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (Andrade, 2010).

2.3 Caseína

As proteínas são elementos constitutivos essenciais de toda célula viva e têm uma

tiveram adições de soro maiores que 1% e 50% adições inferiores a 1%. Por meio da CLAE, pode-se observar maior número de amostras positivas e concentração de soro, demonstrando que este método de análise é mais sensível para a detecção de CMP (Ayala et al., 2009).

Oancea (2009), por meio de imunocromatografia, verificou a presença de 1-2% de adição de soro em 70% das amostras avaliadas, sendo elas, leite cru, pasteurizado, leite UAT, leite UAT fortificado com ômega-3, leite condensado, leite em pó e bebidas de leite adicionadas de sabor. Foi demonstrado que a adulteração do leite continua a ser uma preocupação e esforços devem ser efetuados pelas autoridades e produtores visando proteger a autenticidade do produto.

Oliveira (2010) avaliou oito marcas de leite UAT, por CLAE, e os resultados variaram de 33,64 a 398,78mg/L, sendo todos acima do limite estabelecido pela legislação vigente

grande importância em leite e nos seus derivados. Elas são formadas por polímeros de aminoácidos que são substâncias orgânicas nitrogenadas de caráter anfótero, que possuem um grupo carboxílico (ácido) e um grupo amino (básico). Em alguns aminoácidos também são encontrados grupos álcoois, sulfidrílicos, aromáticos, carboidratos e outros. Estas funções múltiplas dão origem às propriedades que caracterizam e diferenciam as proteínas (Riel, 1991).

O leite contém em média, 3,2% de proteína das quais 80% são caseínas, cujas propriedades são dependentes das interações com o cálcio e os sais de cálcio presentes no leite. A caseína, principal proteína do leite, está presente na forma de micelas, que são complexos esféricos contendo 92% de proteína e 8% de sais inorgânicos,

principalmente fosfato de cálcio (Figura 1) base na sequência de aminoácidos presentes na estrutura primária da proteína como: α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína (Farrel Jr. et al., 2004).

As proteínas do leite possuem variantes genéticas que são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na sequência primária da cadeia polipeptídica (Sgarbieri, 2005). A κ -caseína possui 11 variantes genéticas (A, B, C, E, F¹, F², G¹, G², H, I e J). As duas variantes mais comuns são a A e B. A κ -caseína B se difere da A por substituição do aminoácido tirosina (Thr) pela isoleucina (Ile) na posição 136 e asparagina (Asp) pela alanina (Ala) na posição 148 (Figura 3) (Farrel Jr. et al., 2004). Ela corresponde à fração mais solúvel das caseínas, na presença de uma ampla faixa de concentração do íon cálcio. Ela representa aproximadamente 15% do total das caseínas, atuando como agente estabilizador da micela é constituída por um polipeptídeo de 169

(Swaisgood, 1992). São classificadas com aminoácidos, com pelo menos um grupo fosfato e uma porção glicídica variável (Dracz, 1996).

As micelas possuem uma estrutura porosa devida a sua composição em submicelas, sendo que essas estão ligadas ao fosfocaseinato de cálcio. O teor da κ -caseína nas submicelas é variável e as submicelas deficientes em κ -caseína estão localizadas no interior das micelas, enquanto que as ricas em κ -caseína estão concentradas na superfície, dando às micelas uma camada rica em κ -caseína com algumas α_{s1} - α_{s2} e β -caseínas expostas na superfície. Esse modelo sugere que a região hidrofílica C-terminal da κ -caseína projeta-se para a superfície, dando as micelas uma aparência “pilosa”. Esta camada “pilosa” é responsável pela estabilidade da micela e, se for removida, a sua estabilidade coloidal é destruída, ocorrendo coagulação ou precipitação (Figura 2) (Fox e McSweeney, 1998, citados por Fukuda, 2003).

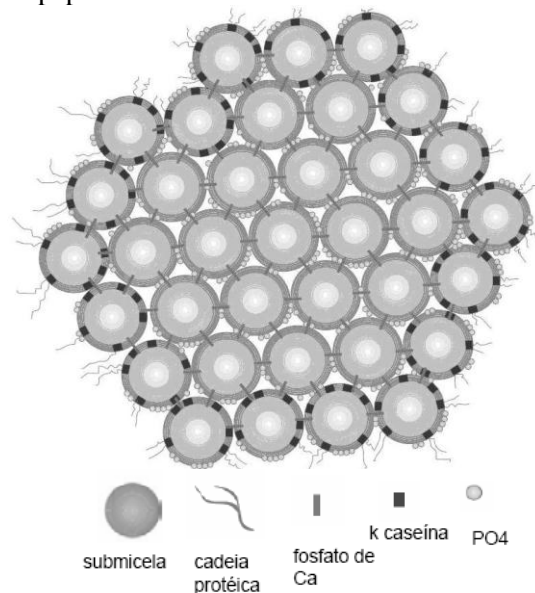


Figura 1 - Desenho esquemático da micela de caseína.

Fonte: <http://www.food-info.net/uk/protein/milk.htm>

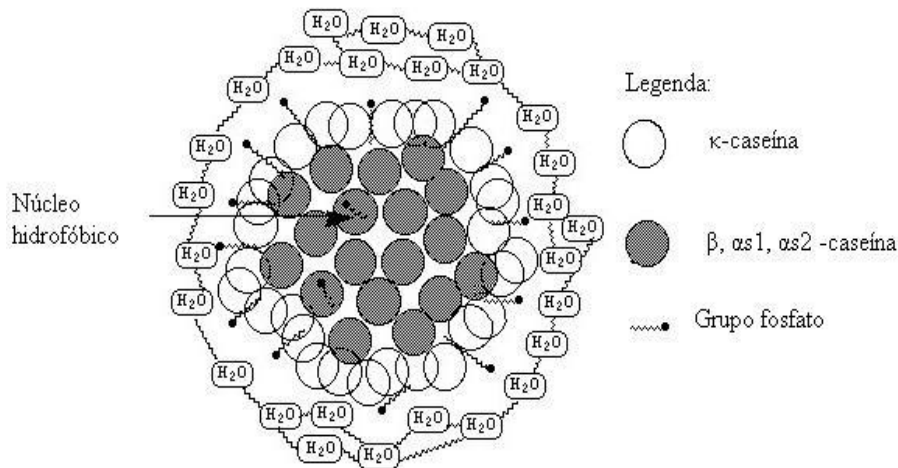


Figura 2 - Camada externa ("pilosa") da micela de caseína.

Fonte: <http://www.publiciastate.edu/~cfford/Caseimicelle2.jpg>

para-κ-caseína																		
PYROGLU-	GLU	(GLN)-	GLN-	ASN-	GLN	(GLU)-	GLU-	GLN	(GLU)-	PRO-	ILE-	ARG-	CYS-	GLU-	LYS	ASP-	GLU-	
		20										30						
PHE-	PHE-	SER-	ASP-	LYS-	ILE-	ALA-	LYS-	TYR-	ILE	PRO-	ILE-	GLN-	TYR-	VAL-	LEU-	SER-	ARG-	TYR-
		40										50						
SER-	TYR-	GLY-	LEU-	ASN-	TYR-	TYR-	GLN-	GLN-	LYS-	PRO-	VAL-	ALA-	LEU-	ILE-	ASN-	ASN-	GLN-	PHE-
		60										70						
PRO-	TYR-	PRO-	TYR-	TYR-	ALA-	LYS-	PRO-	ALA-	ALA-	VAL-	ARG-	SER-	PRO-	ALA-	GLN-	ILE-	LEU-	GLN-
		80										90						
GLN-	VAL	LEU-	SER-	ASP	(ASN)-	TRH-	VAL-	PRO-	ALA-	LYS-	SER-	CYS-	GLN-	ALA-	GLN-	PRO-	TRH-	TRH-
		100									(Renina)		110					
ALA-	ARG-	HIS-	PRO-	HIS-	PRO	(HIS)-	HIS-	LEU-	SER-	PHE-	MET-	ALA-	ILE-	PRO-	PRO-	LYS-	LYS-	ASN-
		120											130					
ASP-	LYS-	THR-	GLU-	ILE-	PRO-	THR-	ILE-	ASN-	THR-	ILE-	ALA-	SER-	GLY-	GLU-	PRO-	THR-	SER-	THR-
		140											150					
THR-	ILE-	GLU-	ALA-	VAL-	GLU-	SER-	THR-	VAL	ALA-	THR-	LEU-	GLU-	ALA-	SER-	PRO-	GLU-	VAL-	ILE-
	THR (Variante A)												ASP (Variante A)					
		160											169					
SER-	PRO-	PRO-	GLU-	ILE-	ASN-	THR-	VAL-	GLN-	VAL-	THR-	SER-	THR-	ALA-	VAL-	OH	Glicomacropéptido (GMP)		

Figura 3 - Sequência primária κ-caseína variante B, ilustrando as substituições para a variante A e o ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) de enzimas proteolíticas.

A κ-caseína, em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como estabilizadora de partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca^{++} (α_{s1} - α_{s2} e β -caseínas) por

ação dos sais de cálcio do leite. A solubilidade da κ-caseína é pouco afetada pela presença do Ca^{++} . A região da sequência primária da para-κ-caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos

hidrofóbicos, com as caseínas α e β dispostas no núcleo da micela, ao passo que o CMP, em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água. Essas interações da seqüência primária da caseína κ estabilizam as micelas no leite (Sgarbieri, 2005).

2.3.1 Caseinomacropéptido (CMP)

A κ -caseína é constituída por um polipeptídio de 169 aminoácidos e atua como agente estabilizador da micela de caseína (Farrel Jr. et al., 2004), possuindo resíduos de aminoácidos dicarboxílicos localizados em sua seqüência na região carboxiterminal, que é também glicosilada (6-10%). Em geral, três monossacarídeos (galactose (GAL), N-acetilgalactosamina (GALNAC) e ácido N-acetilneuroaminico (NANA)), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136, constituem a parte glicosídica da molécula (Sgarbieri, 2005).

A renina (Farrel Jr. et al., 2004) e outras enzimas proteolíticas hidrolisam a κ -caseína entre os aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106). Desta cisão, forma-se a para- κ -caseína (1-105), que é insolúvel e permanece nas micelas de caseína junto com as α e β -caseínas. O terminal formado pelos aminoácidos 106 - 169 é solúvel e formado por aminoácidos polares e carboidratos que conferem uma característica hidrofílica à seqüência. Essa parte da κ -caseína é chamada de glicomacropéptido (GMP) e é liberada no soro durante a produção de queijo (Figura 3) (Carvalho, 2007).

GMP é um dos inúmeros nomes para o péptido resultante da quebra da κ -caseína. O péptido é também conhecido como caseinomacropéptido (CMP). Costuma-se denominar GMP a forma glicosilada, devido

a seu elevado conteúdo de carboidrato e CMP a forma não glicosilada do péptido. A composição do GMP é variada e depende particularmente da fonte do soro e da tecnologia empregada para seu isolamento (Lira, 2008).

A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do GMP. O GMP é geralmente quantificado por métodos cromatográficos (Carvalho, 2007).

Furlanetti e Prata (2003) avaliaram as variações dos teores de CMP livres e total (após a coagulação da amostras com renina comercial) no leite bovino durante a lactação por meio do método da ninidrina ácida e concluíram que os teores de CMP variam de acordo com o período de lactação, as condições sanitárias do úbere e é inversamente proporcional à produção do leite.

A hidrólise enzimática que ocorre na manufatura do queijo ou o tratamento térmico em temperaturas elevadas resultam na remoção ou dissociação da κ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo (Sgarbieri, 2005).

2.4 Ação do congelamento sobre o leite

O serviço de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, seja federal ou estadual, tem como procedimento usual a coleta e remessa de amostras de leite congeladas, logo após a colheita, para a pesquisa de soro, pelo método CLAE. O congelamento das amostras faz-se necessário para impedir a ocorrência de uma possível

proteólise e, dessa maneira, levar a um resultado duvidoso ou até mesmo falso-positivo, além de permitir sua conservação por períodos variáveis, até a execução de suas análises, principalmente, em se tratando das dimensões continentais do País (Fukuda, 2003).

O processo de congelamento do leite se inicia a aproximadamente $-0,54^{\circ}\text{H}$ com a extração do calor do alimento, seguida da formação de gelo puro e solução láctea concentrada. A solução láctea concentrada se congela a uma temperatura proporcionalmente inferior, diminuindo assim mais o ponto de congelamento (Walstra e Jennes, 1987). Portanto, o ponto de congelamento está diretamente relacionado com a concentração de solutos na solução (Riel, 1991).

O ponto de congelamento do leite costuma variar ligeiramente conforme a região onde o mesmo é produzido, havendo uma pequena variação conforme a estação do ano, raça do gado, alimentação, tempo de lactação, vacinação, entre outros (Fox e McSweeney, 1998 citado por Fukuda, 2003). O leite normal compõe-se de aproximadamente 87% de água e 13% de extrato seco total, sendo que nestas condições, congelará a uma temperatura mínima de $-0,530^{\circ}\text{H}$ ($-0,512^{\circ}\text{C}$) (Brasil, 2002).

Quando o leite é congelado, observa-se um aumento constante na porcentagem de proteína, sólidos totais, e cinza na parte descongelada das amostras e o aumento da concentração desses componentes no leite homogeneizado é maior que no leite não homogenizado (Babcock et al., 1954).

Alterações no pH do leite durante o congelamento e armazenamento são sugestivas como um fator causal na desestabilização de proteínas no leite congelado. Observou-se redução do pH, a

temperatura de -12°C , até valores próximos a 5,8 durante o congelamento lento, enquanto o efeito do congelamento rápido sobre o pH foi pequeno. Precipitação de sais a partir da fase líquida supersaturada de leite congelado é considerada a principal causa de mudanças de pH durante o congelamento. A diminuição do pH, provavelmente, é devido à precipitação de fosfato de cálcio e o aumento do pH pode ser causado por precipitação de sais, como o fosfato monopotássico, monossódico e citrato de potássio. Dissolução de uma parte dos sais precipitados durante o diminuição do pH inicial (por exemplo, o fosfato de cálcio) também pode contribuir para um aumento no pH (Van Den Berg, 1961).

O teor de sais no leite é maior do que pode ser mantido em solução, isto é, o excesso desses sais não está em solução verdadeira, mas em estado coloidal, mantendo-se em equilíbrio com os sais dissolvidos. Tratamentos, como a estocagem congelada e o aquecimento, causam uma mudança do equilíbrio salino do leite, sugerindo que a interação entre o fosfato tricálcico precipitado e as micelas de caseína deva ser a responsável pela instabilidade (Chen e Yamauchi, 1969).

O congelamento do leite afeta o complexo fosfocaseinato de cálcio e, com o tempo, há perda da estabilidade, aparecendo um precipitado quando o leite é descongelado. Inicialmente, a floculação é reversível com aquecimento e agitação, posteriormente, com a continuação do armazenamento, torna-se irreversível (Keeney e Kroger 1974, citados por Fukuda, 2003).

Quando o leite é estocado a baixas temperaturas, a β -caseína se dissocia da micela e a quantidade de caseína solúvel pode aumentar em até 30%, sugerindo que a refrigeração pode fazer com que as frações da

caseína se tornem mais suscetíveis à proteólise (Cromie, 1992).

Fukuda (2003) analisou leite UAT e o leite cru resfriado que lhe deu origem, no momento da coleta e após 24 horas e um mês de congelamento. No leite cru houve um acréscimo significativo na altura do pico de CMP do cromatograma, frente ao congelamento de 24 horas. Após o período de congelamento de um mês, os teores detectados aproximaram-se daqueles obtidos pelo leite que não sofreu congelamento. No leite UAT houve uma diminuição dos valores ($\pm 10\%$), em relação aos originais, valores estes que continuaram em decréscimo suave após congelamento por 24 horas e um mês. A mudança da estabilidade do leite cru frente ao congelamento pode ser explicada pela qualidade da matéria-prima e também pela falta de proteção do leite, dando oportunidade ao crescimento da microbiota psicrotrofica. Esses fatores irão se somar ao desequilíbrio salino e protéico que normalmente ocorrerá pelo processo de congelamento.

A instabilidade protéica provocada pela estocagem congelada de leite discorre sobre o desequilíbrio salino afetando a solubilidade das proteínas e sua conseqüente floculação e precipitação. Porém, esse processo é passível de reversão, com descongelamento e agitação adequados. Não há referências bibliográficas sobre a ocorrência do processo de proteólise. Porém, pode-se observar um aumento da proteólise no decorrer do armazenamento do leite congelado. Esta proteólise está relacionada com a hidrólise da caseína pela ação das proteases bacterianas, originárias principalmente das bactérias psicrotólicas presentes no leite cru que, após o tratamento UAT, são eliminadas. Porém as enzimas termoresistentes continuam atuando lentamente sobre as proteínas durante o

armazenamento do leite UAT (Fukuda, 2003).

2.5 Ação enzimática no leite

As enzimas são biocatalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Quimicamente são proteínas de distinto ponto isoelétrico e com diferentes vulnerabilidades frente aos agentes desnaturantes como o calor, sais, alcoóis, entre outros (Riel, 1991). A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato (Lehninger et al., 1995). Elas possuem propriedades específicas para catalisar determinadas reações de decomposição, de síntese ou de transformação. Cada uma delas tem uma temperatura e um pH ótimo de atuação nos quais sua atividade é máxima (Riel, 1991).

A maior parte das enzimas encontradas no leite são as hidrolases (proteases, esterases e glucidasas), desidrogenases e oxidases. As proteases são enzimas que hidrolisam as proteínas em peptídeos mais simples ou em aminoácidos (Riel, 1991).

A susceptibilidade de uma ligação peptídica particular depende tanto da especificidade da enzima como da flexibilidade da cadeia na região; regiões específicas, portanto, de uma estrutura, em especial as seqüências entre domínios, são hidrolisadas mais rapidamente. Como resultado, a proteólise limitada irá produzir grandes peptídeos específicos que são característicos tanto da estrutura de proteínas e da protease presente. A caseína apresenta estruturas com maior flexibilidade de cadeia do que proteínas globulares típicas,

consequentemente, são mais susceptíveis à proteólise (Swaisgood, 1992).

A renina possui especificidade pelos aminoácidos fenilalanina (105) e metionina (106) presentes na κ -caseína. Mas, se o tempo for prolongado, a β -caseína também pode ser hidrolisada (Swaisgood, 1992).

A proteólise no leite pode ser provocada por suas enzimas nativas como a plasmina, por enzimas adicionadas principalmente durante a fabricação de queijos, como, por exemplo, a renina ou por enzimas produzidas pela microbiota contaminante que pode chegar ao leite através de ordenha realizada em condições inadequadas de higiene ou pelos utensílios mal higienizados utilizados durante a sua coleta ou pela falta de asseio do ordenhador (Fukuda, 2003).

As proteases liberadas por micro-organismos, sobretudo os psicrotróficos, em particular *Pseudomonas* spp., que se desenvolvem em grande número no leite durante o armazenamento em refrigeração, merecem grande consideração. Uma vez que esses micro-organismos são destruídos pelos tratamentos térmicos convencionais; porém, as proteases são termoresistentes e são a causa de muitos problemas que se apresentam na indústria leiteira (Riel, 1991).

2.5.1 Enzimas sintetizadas por micro-organismos psicrotróficos

O termo micro-organismo psicrotrófico foi definido pela Federação Internacional de Laticínio (FIL) como aquele que tem a capacidade de crescer a 7°C ou menos, sem considerar a temperatura ótima de crescimento. Alguns psicrotróficos crescem a temperaturas abaixo de 0°C e outros podem crescer em temperaturas altas entre 37 e 45°C (Harjdenwurcel, 1998).

Uma importante característica dos micro-organismos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de sintetizar, durante a fase logarítmica de crescimento, enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termoresistentes produzidas por estes micro-organismos (Cunha e Brandão, 2000).

O uso de refrigeração tem sido adotado em todos os níveis de processamento do leite na indústria. A introdução de tanques isotérmicos nas fazendas permite estocar o leite de várias ordenhas. A descentralização de postos de leite permitiu o seu transporte refrigerado em caminhões-tanque por longas distâncias. Os problemas relacionados com a microbiota mesofílica foram reduzidos. Esta condição, no entanto, seleciona o desenvolvimento de organismos psicrotróficos, os quais tem considerável poder de deterioração. A maioria das bactérias psicrotróficas não é patogênica, mas quando cresce no leite ou em produtos lácteos, podem desencadear uma série de problemas, dentre eles, proteólise descontrolada, problemas de textura, de aroma e sabores desagradáveis (Fukuda, 2003).

A microbiota psicrotrófica contaminante do leite inclui espécies de bactérias Gram-negativo dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivo dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (Pinto et al., 2006), sendo os

bastonetes Gram negativo, os micro-organismos predominantes (Fukuda, 2003).

Magalhães (2008), ao inocular *Pseudomonas fluorescens* em leite por com 48 horas a 7°C, verificou que quando a contagem de psicotróficos foi menor do que 10⁶UFC/mL, não ocorreu produção de CMP pelas proteases de bactérias psicotróficas. Entretanto, se a incubação for por 4, 6 e 8 dias, tem-se um aumento no pico, com tempo de retenção característico do CMP.

A atividade proteolítica de enzimas termoresistentes, liberadas por bactérias psicotróficas, em leite cru e as que permanecem ativas após o tratamento térmico, pode acarretar a liberação e surgimento de CMP ou pseudo-CMP. O pseudo-CMP (fragmento 107 – 169 da κ-caseína) possui um aminoácido a menos que o CMP e ocorre devido a capacidade das proteases microbianas hidrolisarem a caseína em locais semelhantes aos hidrolisados pela renina (Magalhães, 2008).

2.6 CROMATOGRAFIA

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem do éter de petróleo (fase móvel) por meio de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Esta é provavelmente a razão pela qual a técnica é conhecida como cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor (Collins, 1988).

A cromatografia é um método físico-químico de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Degani et al., 1998).

As diferentes formas de cromatografia em coluna podem ser classificadas de acordo com a fase estacionária e móvel empregadas, assim como o modo de separação (Degani et al., 1998). A fase estacionária é um filme que reveste a parede interna da coluna capilar, retardando a movimentação dos componentes da amostra ao longo da coluna. Diferenças nas propriedades químicas e físicas dos compostos orgânicos injetados e suas interações com a fase estacionária são à base do processo de separação (Araujo, 2004).

A fase estacionária distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele. Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois em seus mecanismos de separação (Degani et al., 1998). As fases estacionárias disponíveis são numerosas, podendo ser polares ou apolares e apresentarem estrutura porosa ou sólida e de diversos diâmetros. As colunas podem ser de fase reversa ou de fase normal (Araujo, 2004).

A classificação de acordo com a fase móvel é representada por três tipos de cromatografia, sendo elas, a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida (CL) e a cromatografia

supercrítica (CSC), usando-se na última um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta a subdivisão da cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel (Degani et al., 1998). Sugere-se que o nome cromatografia líquida de alta eficiência seja devido a elevada eficiência atingida na separação (Collins, 1988).

A CLAE frequentemente utiliza a combinação de solventes miscíveis como fase móvel. Solventes que possuem alta viscosidade devem ser evitados, pois além do tempo longo para emergirem da coluna, o que resulta na abertura dos picos e resolução ruim, é necessária alta pressão para forçá-los através da coluna. A fase móvel a ser utilizada deve ser desgaseificada e livre de partículas suspensas, bem como impurezas químicas. As substâncias interferentes devem ser removidas da amostra por meio de filtração e, ou centrifugação. A fase móvel deve apresentar capacidade de dissolver a amostra, compatibilidade com o detector e alta pureza (Araujo, 2004).

De acordo com Wolfschoon-Pombo (1984), a repetibilidade do método cromatográfico para a detecção de soro é muito boa, devido ao pré-tratamento das amostras, que requer simples operações. Pode-se esperar um coeficiente de variação menor que 2%, e independentemente do teor de CMP das amostras, pode ser analisado.

O CMP possui caráter hidrofílico, devido à polaridade conferida pelos seus constituintes; estabilidade térmica elevada, devido ao

elevado conteúdo de ácido siálico em sua estrutura; peso molecular de aproximadamente 8.000 Daltons, podendo ser separado de outros peptídeos e proteínas por meio de colunas de CLAE. Contrariamente, o resíduo para- κ -caseinato apresenta caráter hidrofóbico (Alvim, 1992)

Os principais métodos de separação utilizados na análise de CMP em produtos lácteos são a exclusão molecular e fase reversa (López-Fandiño e Ramos (1993); Carvalho (2007)). O método de exclusão molecular é utilizado na separação de componentes de alto peso molecular (PM>2.000). As colunas utilizadas possuem poros de diversos tamanhos (fase estacionária), cuja separação é baseada na difusão seletiva das moléculas, que entram e saem dos poros presentes na superfície das partículas (Araujo, 2004).

A fase líquida passa continuamente pelos poros do gel, nos quais pequenas moléculas do soluto penetram, ficando retidas por mais tempo na coluna. Moléculas maiores presentes no soluto são excluídas dos poros, permanecendo menos tempo retidas na coluna, que separa moléculas pelo tamanho (Araujo, 2004).

A cromatografia de fase reversa consiste em utilizar a fase estacionária não polar e a fase móvel polar. A superfície reativa das partículas é alterada pela reação com compostos não polares, que são quimicamente ligados ao grupo OH. A maior parte das separações ($\approx 70\%$) utiliza a cromatografia de fase reversa, na qual se tem a fase estacionária apolar e a fase móvel polar (Araujo, 2004).

A CLAE tem sido muito utilizada nos dias atuais, na análise de detecção de CMP, possibilitando sua separação dos demais

peptídeos do leite. O método consiste no bombeamento isocrático, sendo a fase móvel constituída de uma solução tampão fosfato, em pH 6,0. A coluna utilizada geralmente é a Zorbax GF, cujo princípio de separação baseia-se na exclusão molecular. A detecção se dá por espectrofotometria no UV (Alvim, 1992).

O detector UV é muito utilizado para quantificação de componentes em alimentos uma vez que possuem em sua estrutura grupos funcionais do tipo $-C=C-$, $-C=O$, $-N=O$ e $-N=N-$, os quais absorvem rapidamente a radiação UV (Pomeranz e Meloan, 1994).

A função do detector é gerar um sinal eletrônico proporcional à quantidade de cada componente na mistura. Essencialmente, é um espectrofotômetro UV/Visível (Araújo, 2004), operando no comprimento de onda de 250nm, sendo os compostos quantificados por integração eletrônica das áreas dos picos (Alvim, 1992).

A pesquisa do índice de CMP deve ser realizada conforme os métodos oficiais descritos na Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006(a)) e Instrução Normativa n° 7, de 02 de março de 2010 (Brasil, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo das amostras

3.1.1 Leite cru

A unidade amostral de cada leite cru foi obtida a partir da mistura de leite proveniente da ordenha de seis animais da raça Girolando, escolhidos aleatoriamente. As amostras foram coletadas na Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo e transportadas em caixas

isotérmicas, contendo gelo reciclável, para o setor de Cromatografia do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), onde foram preparadas e analisadas.

As amostras foram fracionadas em frascos plásticos estéreis e armazenadas nas temperaturas de 6°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) na geladeira e -12°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em freezer comercial, durante o período máximo de quatro dias.

As análises foram realizadas no dia da coleta e diariamente até o quarto dia, obtendo-se assim, cinco dias de análise (0, 1, 2, 3 e 4 dias).

As análises de qualidade do leite, tais como, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e de composição química foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade de Leite da EV/UFMG. As análises para a determinação da composição do leite (IDF, 2000) e a contagem de células somáticas (IDF, 1995) foram realizadas em equipamento eletrônico (Bentley CombSystem 2300, Bentley Instruments) pelo princípio de comprimento de onda no infra-vermelho e citometria de fluxo, respectivamente. A contagem bacteriana total foi realizada pelo princípio de citometria de fluxo em equipamento eletrônico IBC 150 Bactocount da Bentley Instruments Incorporated, Chaska, Estados Unidos da América segundo recomendações dos fabricantes (Bentley..., 2002).

A altura do pico de CMP (Brasil, 2006), a acidez titulável (Brasil, 2006) e o pH (Brasil, 2006) foram avaliados diariamente até o quarto dia de armazenamento, no Laboratório de Cromatografia de Análise da Qualidade do Leite da EV/UFMG.

Foram efetuadas, também, a enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos no Laboratório de Microbiologia de Leite e Derivados da EV/UFMG, de acordo com as metodologias descritas na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

A instalação de termômetros de máxima e mínima nos equipamentos permitiu a indicação da temperatura mais alta e a mais baixa atingida pelo termômetro e, conseqüentemente, a variação da temperatura que foi de $\pm 1^\circ\text{C}$.

O tratamento das amostras congeladas dos leites cru, pasteurizado e UAT consistiu na imersão em banho de água à 30°C até o descongelamento (Brasil, 2006).

3.1.2 Leite pasteurizado integral

As amostras de leite cru foram pasteurizadas a temperatura de 65°C por 30 minutos no Laboratório de Aula Prática de Inspeção de Leite na EV/UFMG. A eficiência do tratamento térmico foi avaliada por meio dos testes de fosfatase alcalina e peroxidase (Brasil, 2006) no Laboratório de Microbiologia de Leite e Derivados da EV/UFMG.

A qualidade do leite cru que deu origem ao pasteurizado foi avaliada de acordo com as análises de composição, CCS e resíduo de antibiótico no Laboratório de Controle de Qualidade de Leite da EV/UFMG; enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos no Laboratório de Microbiologia de Leite e Derivados da EV/UFMG; acidez titulável, índice de CMP e pH no Laboratório de Cromatografia de Leite da EV/UFMG.

As amostras foram fracionadas em frascos plásticos estéreis e armazenadas em geladeira a temperatura de 6°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em freezer comercial a temperatura de -12°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante oito dias.

As análises foram realizadas no dia do tratamento térmico e posteriormente, a cada dois dias até o oitavo dia. Obtendo-se assim, cinco dias de análise (0, 2, 4, 6 e 8 dias).

A altura do pico de CMP (Brasil, 2006), a acidez titulável (Brasil, 2006) e o pH (Brasil, 2006) foram analisados no setor de Cromatografia do Laboratório Análise da Qualidade do Leite da EV/UFMG.

A enumeração de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, número mais provável (NMP) de coliformes a $30/35^\circ\text{C}$, NMP de coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Leite e Derivados da EV/UFMG, de acordo com as metodologias descritas na Instrução Normativa nº 62 do MAPA (Brasil, 2003).

3.1.3 Leite UAT integral

Amostras de leite UAT pertencentes a seis diferentes lotes de produção foram coletadas em indústria processadora de leite UAT e armazenadas, nas próprias embalagens, em três temperaturas, sendo elas: temperatura ambiente ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), temperatura de refrigeração ($6^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) e temperatura de congelamento ($-12^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) durante o período máximo de 120 dias.

As análises foram realizadas no dia do tratamento térmico (0) e após 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, até que se completa-se a vida de prateleira do produto, conforme descrição da embalagem.

O tratamento das amostras congeladas consistiu na imersão em banho de água à 30°C até o descongelamento (Brasil, 2006).

O índice de CMP (Brasil, 2006), a acidez titulável (Brasil, 2006) e o pH (Brasil, 2006) das amostras foram analisados no setor de Cromatografia do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da EV/UFMG.

A enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios e psicrotróficos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Leite e derivados da EV/UFMG, de acordo com as metodologias descritas na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

Foi realizado um rodízio semanal das amostras nas prateleiras da geladeira e do congelador, a fim de controlar possíveis variações de efeito dos equipamentos.

3.2 Método de ensaio para a determinação do índice de CMP por CLAE

O método tem como objetivo detectar e quantificar o índice de caseinomacropéptido (CMP) presente no leite proveniente da ação proteolítica de enzimas (como a ação da renina sobre a κ -caseína durante a fabricação de queijos), de que trata a Instrução Normativa nº 69 (Brasil, 2006), empregando CLAE, filtração em gel, com detecção em ultravioleta (UV). O método abrange leite fluido em natureza ou reconstituído e está descrito na Instrução Normativa nº 68 (Brasil, 2006).

3.2.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel utilizada foi uma solução tampão fosfato (pH=6), preparada conforme metodologia descrita na IN nº68 do MAPA (Brasil, 2006), que apresentava-se livre de partículas suspensas, bem como impurezas químicas e substâncias interferentes, uma vez que foi utilizado para seu preparo água deionizada e, após o mesmo, foi realizada filtragem a vácuo da solução, em filtro 0,45 micra da marca Milipore e desgaseificação por ultrassom no equipamento Ultrasonic da marca Unique. Apresentando-se, assim, capacidade de dissolver a amostra, compatibilidade com o detector e alta pureza (Araujo, 2004; Brasil, 2006).

3.2.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi preparada com, no mínimo, cinco soluções padrão de CMP que contemplaram os pontos de concentração de 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90mg/L. A cada dois dias era preparada uma nova curva.

A precipitação das amostras de leite (10mL) contendo as soluções padrão de CMP foi realizada com 5mL de ácido tricloroacético a 24%, sob agitação constante, em intervalo de 2 minutos. Em seguida, foram deixadas em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente filtradas em papel de filtro qualitativo, descartando-se as cinco primeiras gotas (Brasil, 2006).

Foram injetados 20 μ L de cada filtrado no cromatógrafo (Shimadzu CLASS VP 6.1) com coluna (Zorbax GF 250 Bioseries da Agilent), cujo princípio de separação se baseia na exclusão molecular, com fluxo de fase móvel de 1,5 mL por minuto (bombeamento isocrático de solução tampão fosfato pH 6,0) e detecção por UV visível no comprimento de onda de 205nm.

Foi construído o gráfico de altura do pico de CMP *versus* a intensidade do sinal do detector e calculada a reta de regressão aceitando valores de $R \geq 0,95$.

3.2.3 Tratamento das amostras

A precipitação das amostras de leite (10mL) foi realizada com 5mL de ácido tricloroacético a 24%, sob agitação constante, em intervalo de 2 minutos. As amostras foram deixadas em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada em papel de filtro qualitativo, descartando-se as cinco primeiras gotas. Em seguida, injetou-se cada amostra tratada no sistema cromatográfico e procedeu-se à quantificação (Brasil, 2006).

3.2.4 Análise quantitativa

A quantificação envolve a medição da altura do pico, área ou massa e comparação dos dados obtidos com o padrão de concentração conhecida (Araujo, 2004). Porém a quantidade mínima é determinada pela altura do pico e não pela área do pico (Siouffi, 1992).

Levando-se em consideração o fato que a maior parte das amostras de leite cru e pasteurizado apresentou índice zero, ou próximo a ele e que isso impediu a análise estatística das mesmas, adotou-se como procedimento, a utilização da medida do equipamento, que nestas condições foi a altura do pico de CMP do cromatograma.

O cálculo do índice de CMP do leite UAT foi realizado utilizando o cromatograma da amostra e comparado com o da curva de calibração, sendo identificado o pico com

tempo de retenção semelhante. O índice de CMP da amostra foi calculado por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão das soluções padrão, utilizando a seguinte equação, a ser obtida pela injeção dos padrões da curva de calibração: $y = ax + b$

Em que: x = Índice de CMP (mg/L)

y = altura do pico

a = inclinação da reta

b = intersecção com o eixo y

ou seja,

$$\text{Índice de CMP (mg / L)} = \frac{\text{altura do pico} - b}{a}$$

3.3 Análise estatística

A unidade experimental para o leite cru e pasteurizado foi obtido por amostra composta (“pool”) de leite proveniente de seis animais. Cada unidade do leite UAT foi referente a um lote de produção.

O delineamento utilizado no experimento foi de blocos casualizados com arranjo fatorial. Observando o sistema hierárquico no arranjo fatorial 2×5 para as amostras de leite cru e leite pasteurizado integral, sendo duas temperaturas (-12°C e 6°C) e cinco tempos de armazenamento. Em relação ao leite UAT, foi adotado o arranjo fatorial 3×5 , sendo três temperaturas (-12°C , 6°C e 21°C) e cinco tempos (0, 30, 60, 90 e 120 dias) de armazenamento. Foram realizadas seis repetições do experimento.

Os tratamentos utilizados foram submetidos à análise de variância e posterior comparação de suas médias, por meio do teste Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de 5% de significância ($P=0,05$).

A correlação das variáveis foi calculada para verificar se a variação de uma delas acompanha proporcional ou inversamente a variação da outra (Sampaio, 2007). As variáveis paramétricas, que apresentaram distribuição normal foram avaliadas por meio da correlação de Pearson e das variáveis não paramétricas, cujos dados foram transformados, por correlação de Spearman. A análise de variância foi realizada no programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2007) e a análise descritiva no SAEG (SAEG, 2007).

A análise estatística dos dados foi realizada no Laboratório de Processamento de Dados do Departamento de Zootecnia da EV/UFMG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Leite cru

Os resultados das análises de qualidade das amostras de leite cru avaliadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos para controle de qualidade do leite cru

Requisitos	Repetições						Média	Padrões*
	I	II	III	IV	V	VI		
Gordura (%)	1,89	4,79	3,13	4,05	3,14	3,51	3,42	mín. 3,00
Proteína (%)	3,06	3,13	3,53	3,37	3,46	3,29	3,30	mín. 2,90
Lactose (%)	4,38	4,30	4,28	4,33	4,21	4,36	4,31	
Sólidos Desengordurados (%)	8,365	8,37	8,76	8,60	8,62	8,60	8,55	mín. 8,40
Contagem de Células Somáticas (CCS) (cél./mL)	229.000	148.500	1024.000	850.000	926.000	994.000	695.250	máx. 750.000
Acidez titulável (mg ác. láctico/100 mL)	14,60	14,80	14,40	14,10	14,70	14,70	14,55	14,00 a 18,00
pH	6,74	6,78	6,87	6,85	6,88	6,79	6,82	6,6 a 6,8
Contagem de micro-organismos mesófilos (UFC/mL)	6.400	500	6.250	1.445	9.900	250	4.124,17	máx. 750.000
Resíduo de antibióticos	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
CMP (mg/L)	18,93	19,78	41,42	41,61	22,45	22,55	27,79	máx. 30,00

Brasil (2002 e 2006 (b)). Mín. = mínimo. Máx. = máximo

As amostras de leite cru, em média, apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa nº51 que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leite Cru (Brasil, 2002) e a Instrução Normativa Nº 69 que institui critérios de avaliação da qualidade do leite *in natura* em relação ao índice de CMP (Brasil, 2006) (Anexos). Dentre os requisitos avaliados, a contagem CCS se destaca por apresentar quatro amostras acima do limite máximo permitido.

Durante o período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, Fonseca (2005) verificou, no Laboratório de Análise de Qualidade do Leite da EV/UFMG, valores de CCS oscilando de 331.000 a 501.000cél./mL.

Paiva (2010), para o período de 2002 a 2008, avaliando o volume percentual médio de leite em conformidade com a legislação verificou que 91,52% estavam de acordo com o marco legal do ano de 2008 (≤ 750.000 céls./mL), enquanto que para o marco legal do ano de 2011 (≤ 400.000 céls./mL), esse valor decresceria para 60,55%.

Fonseca (2005), também verificou a influência da estação climática com relação à composição química, ocorrendo elevação dos teores de gordura, proteína e sólidos totais durante o período de seca (outono e inverno). A influência sazonal ocorre devido principalmente, à disponibilidade de alimento, aliada a temperatura ambiente e à umidade do ar. A composição está correlacionada com a quantidade de produção, sendo que nos meses de menor produção o teor de gordura tende a ser maior.

A enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos, de amostras de leite cru, armazenadas nas temperaturas de 6 e -12°C, analisadas diariamente, durante 4 dias, não apresentou interação significativa ($P=0,6319$) entre as variáveis temperatura e tempo. Analisou-se, deste modo, o efeito simples de cada variável. A diferença entre as temperaturas foi observada por meio do teste SNK ($P=0,0115$) (Tabela 2) e não houve efeito significativo em relação ao tempo, portanto, não houve ajuste a nenhum modelo matemático. Os resultados observados em relação ao tempo estão representados na Figura 4.

Tabela 2 - Enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos (UFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas a temperatura de -12°C e 6°C, durante 4 dias (n=6)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	1	2	3	4	
Refrigeração (6°C)	4.124,17	4.520,83	4.974,17	6.017,50	6.658,33	5.259,00 a
Congelamento (-12°C)	4.124,17	3.258,33	3.041,67	3.046,67	3.070,83	3.308,33 b
MÉDIA	4.124,17A	3.889,58A	4.007,92A	4.532,08A	4.864,58A	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

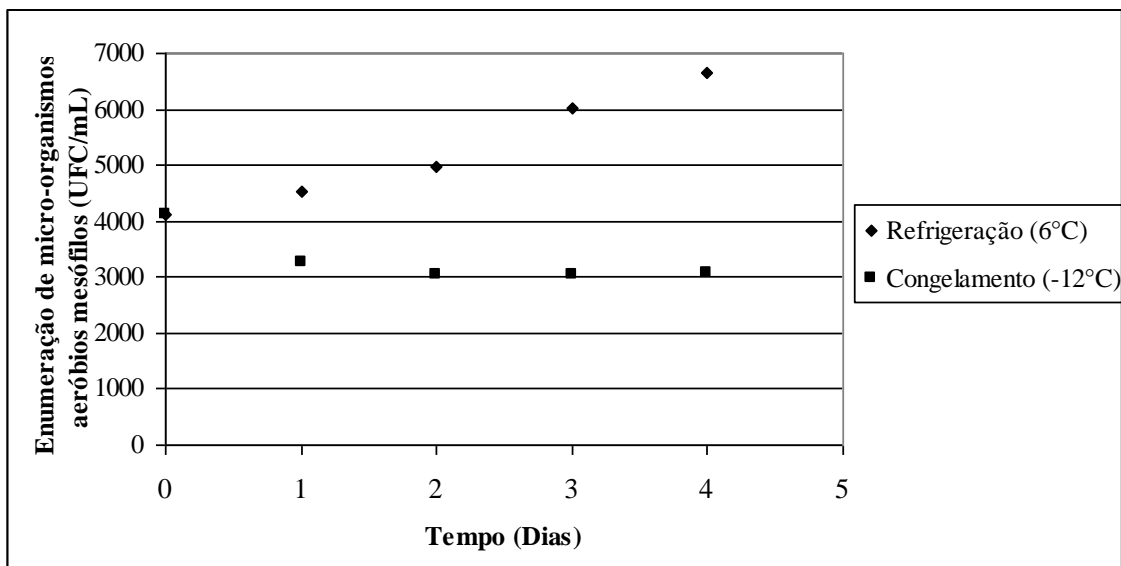


Figura 4 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite cru na enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos.

As amostras armazenadas a 6°C apresentaram, em média, aumento na contagem de micro-organismos e maior variação em relação à condição inicial

(Tabela 3) quando comparadas às amostras armazenadas a -12°C .

Tabela 3 - Variação média da enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos em amostras de leite cru armazenadas em temperaturas de 6°C e -12°C durante 4 dias

Temperatura	Enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos (UFC/mL)		Variação (%)
	Tempo 0	Média após 4 dias	
Refrigeração (6°C)	4.124,17	5.259,00	+ 27,52
Congelamento (-12°C)	4.124,17	3.308,33	- 19,78

(+) Acréscimo; (-) Redução

Amorim (2007), avaliando leite cru refrigerado, a temperatura média de $11,3^{\circ}\text{C}$, no tempo zero e após 24, 48 e 72 horas de estocagem no estabelecimento processador, também observou que não houve correlação entre a contagem de micro-organismos

aeróbios mesófilos durante a estocagem de 72 horas.

Observa-se nas amostras armazenadas a -12°C uma redução na contagem de micro-organismos devido ao congelamento, que

reduz a atividade de água (a_w) e ao fato do mesmo ter ocorrido de modo lento, leva a formação de grandes cristais de gelo que podem causar à lise das bactérias (Fellows, 2000), não sendo recomendada a submissão de amostras destinadas as análises microbiológicas ao processo de congelamento.

O congelamento é a operação unitária na qual a temperatura de um alimento é reduzida abaixo de seu ponto de congelamento e uma proporção da água sofre uma mudança no seu estado formando cristais de gelo. A imobilização da água em gelo e a concentração resultante dos solutos dissolvidos na água não congelada diminuem a atividade de água do alimento (Fellows, 2000). O tipo de congelamento é baseado na velocidade em que o método ocorre, sendo o congelamento lento caracterizado pela diminuição gradativa da temperatura no período de 3 a 12 horas e formação de grandes cristais de gelo, no interior das células e principalmente nos espaços intercelulares (Evangelista, 2008). Os cristais de gelo que crescem nos espaços intercelulares deformam e rompem a parede

celular das células adjacentes. Os cristais de gelo possuem uma menor pressão de vapor de água que as regiões internas das células e, portanto, a água movimenta-se de dentro da célula para os cristais em formação. Dessa forma, as células desidratam e sofrem dano permanente devido ao aumento da concentração de solutos e à deformação e colapso da estrutura celular (Fellows, 2000). Esses cristais afetam fisicamente as células, podendo causar alterações indesejáveis. Durante o congelamento rápido ocorre abaixamento brusco de temperatura e, por isso, há produção de pequenos cristais de gelo, principalmente no interior das células e menor dano a estrutura celular (Evangelista, 2008).

A enumeração de micro-organismos psicrotróficos não apresentou interação significativa ($P=0,2323$) entre a temperatura e o tempo de armazenamento. Foi analisado, portanto, o efeito simples de cada variável. A diferença entre as temperaturas foi observada por meio do teste SNK ($P=0,0017$) (Tabela 4) e o efeito do tempo foi significativo ($P=0,0284$), sendo os resultados observados representados na Figura 5.

Tabela 4 - Enumeração de micro-organismos psicrotróficos (UFC/mL) em leite cru armazenado em temperaturas de -12°C e 6°C durante 4 dias ($n=6$)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	1	2	3	4	
Refrigeração (6°C)	18,00	255,00	576,00	1.041,00	1.211,33	620,27 a
Congelamento (-12°C)	18,00	196,67	180,00	128,33	54,17	115,43 b
MÉDIA	18,00A	225,83AB	378,00AB	584,67AB	632,75C	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)
 Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

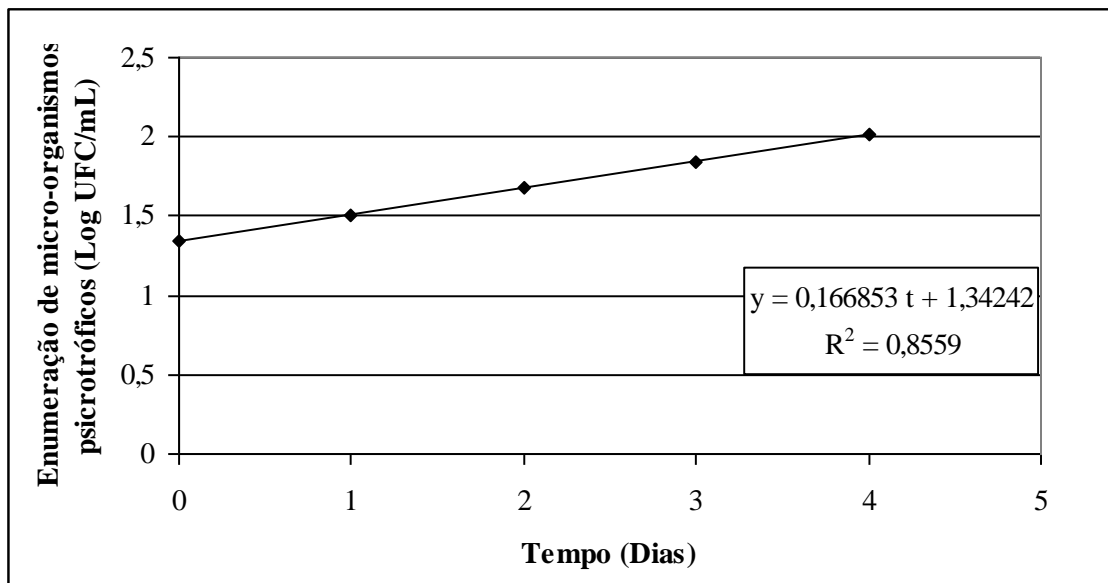


Figura 5 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação à enumeração de micro-organismos psicotróficos (UFC/mL).

A contagem média de micro-organismos psicotróficos das amostras armazenadas a -12°C apresentou menor crescimento quando comparado às armazenadas a 6°C. Porém, nas amostras congeladas houve um crescimento inesperado, porque foi utilizado o método de congelamento lento que proporcionou o crescimento desses micro-organismos nas primeiras 24 horas.

Após as 24 horas de congelamento, observa-se uma redução na contagem de micro-organismos devido ao congelamento, que reduz a atividade de água (a_w) e ao fato do mesmo ter ocorrido de modo lento levando a formação de grandes cristais de gelo que podem causar a lise das bactérias (Fellows, 2000), não se recomendando a submissão de amostras destinadas às análises microbiológicas ao processo de congelamento.

O congelamento tem um efeito variável nos micro-organismos. Temperaturas de estocagem entre -4 e -10°C tem efeito letal

em micro-organismos maior do que temperaturas mais baixas entre -15 e -30°C (Fellows, 2000).

Lorenzetti (2006), avaliando a interação entre o tempo (0, 4, 20 e 26 horas) e a temperatura de estocagem a 1, 3 e 6°C de leite cru observou que a variação do número de micro-organismos psicotróficos foi não significativo nos tempos de estocagem de 4, 20 e 36 horas para as temperaturas de 3 e 6°C. Os períodos de estocagem em relação à temperatura de 1°C apresentam diferenças estatísticas entre os tempos 4 e 20 horas, quando observa-se um maior crescimento de micro-organismos psicotróficos.

Considerando a estocagem de leite cru à uma temperatura de 4-6°C por 48 horas, o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos em temperaturas baixas e estes são responsáveis pela formação de enzimas termoresistentes, Mottar (1984) avaliou como a matéria-prima estocada

nessas condições influíu sobre a conservação do leite UAT, concluindo que: (1) em relação ao leite cru de boa qualidade (menos de 10^4 UFC/mL de micro-organismos aeróbios mesófilos e 2×10^3 UFC/mL de psicrotróficos) a atividade proteolítica observada, mais no leite cru do que no leite UAT correspondente, foi atribuída à ação do sistema proteolítico do leite; (2) em uma matéria-prima de boa qualidade, estocada sob refrigeração por mais de 72 horas, observou-se um aumento da atividade residual no leite UAT correspondente. Para leites de pior qualidade (com mais de 10^5 UFC/mL micro-organismos aeróbios mesófilos), um aumento de atividade análoga foi observado após estocagem por 48 horas, podendo ser comprovado pelo desenvolvimento notável da microbiota psicrotrófica e (3) o aumento do teor de ácido siálico, observado conjuntamente com o desenvolvimento de micro-organismos matemático. Os resultados médios observados em relação ao tempo estão representados na Figura 6.

psicrotróficos proteolíticos levaram a supor que as proteases bacterianas e termoestáveis degradam uma grande quantidade da fração k-caseína e que o mesmo não seria resultado da ação das proteases naturais do leite.

Nas condições avaliadas, não houve correlação significativa entre a contagem de micro-organismos psicrotróficos e a contagem de micro-organismos mesófilos ($P=0,0789$).

A análise da altura do pico de CMP não apresentou interação significativa ($P=0,1237$) entre a temperatura e o tempo de armazenamento. Analisou-se, portanto, o efeito simples de cada variável. A diferença entre as temperaturas foi observada por meio do teste SNK ($P=0,0113$) (Tabela 5) e não houve efeito significativo em relação ao tempo, não havendo ajuste a nenhum modelo

Tabela 5 - Médias da altura dos picos de CMP em amostras de leite cru armazenadas em temperaturas de -12°C e 6°C durante 4 dias ($n=6$)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	1	2	3	4	
Refrigeração (6°C)	12.431,0	11.782,0	11.872,7	13.613,7	12.302,5	12.400,4 a
Congelamento (-12°C)	12.431,0	11.122,8	11.575,7	11.341,5	11.756,7	11.645,5 b
MÉDIA	12.431,00A	11.452,42A	11.724,17A	12.477,58A	12.029,58A	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

As amostras armazenadas a 6°C podem ser avaliadas em relação ao índice de CMP até 4 dias sem que ocorra prejuízo

dos resultados, apresentado valores mais próximos daqueles obtidos pelo leite que não sofreu tratamento.

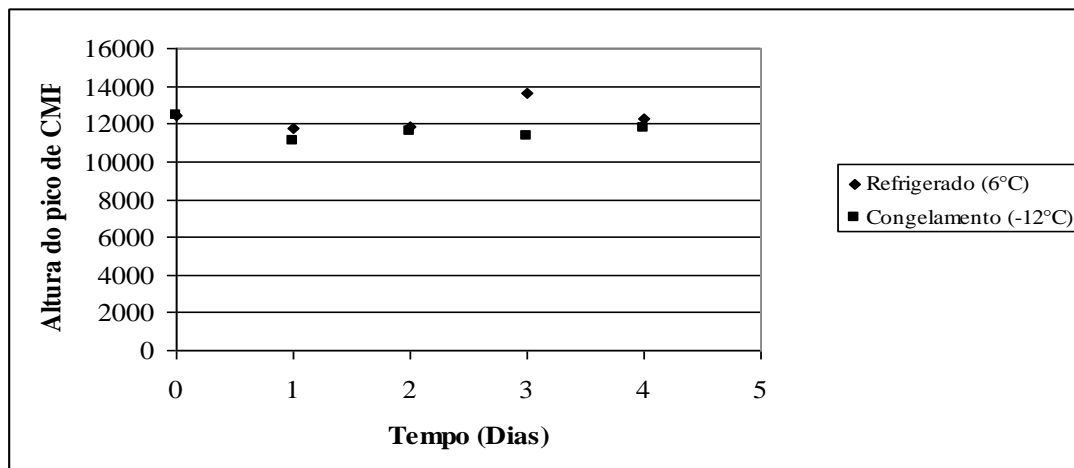


Figura 6 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação à altura do pico de CMP do cromatograma.

Os resultados diferem dos encontrados por Fukuda (2003), que avaliou amostras de leite cru em três instantes, sendo, no dia da coleta, com 1 e 30 dias de congelamento. A média, de três repetições, da altura dos picos de CMP encontradas foram, respectivamente, 9.741, 16.378 e 11.382. Houve um acréscimo significativo na altura do pico de CMP do cromatograma com 1 dia de congelamento. Porém, após as amostras terem sido submetidas a um congelamento por um período de um mês, os teores detectados aproximaram-se daqueles obtidos pelo leite que não sofreu congelamento.

Friedrich et al. (2010), avaliando a estabilidade do leite cru com relação ao tempo e às temperaturas de refrigeração (entre 3°C a 8°C) e congelamento. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que o congelamento interfere na ação proteolítica do leite em comparação às amostras refrigeradas. As amostras congeladas podem ser submetidas à determinação de CMP por um período de até trinta dias após a coleta, se forem mantidas congeladas (temperatura < 10°C) e que o congelamento auxilia na conservação da integridade da amostra.

Friedrich et al. (2010), avaliando a estabilidade do leite cru com relação ao tempo e às temperaturas de refrigeração (entre 3°C a 8°C) e congelamento, verificaram que o leite refrigerado apresenta, naturalmente, um baixo índice de CMP, o qual aumenta de acordo com o tempo em que é armazenado sob refrigeração. A presença de CMP no leite cru refrigerado pode ocorrer em função do sistema proteolítico do próprio leite. As amostras congeladas não apresentaram aumento do índice de CMP acima do permitido pela legislação para utilização direta do leite. Pode-se afirmar, com base nesses resultados, que o congelamento interfere na ação proteolítica do leite em comparação à primeira parte da amostra, conservada sob refrigeração. As amostras congeladas podem ser submetidas à determinação de CMP por um período de até trinta dias após a coleta, se forem mantidas congeladas (temperatura < 10°C) e que o congelamento auxilia na conservação da integridade da amostra.

Os dados avaliados não apresentaram correlação significativa ($P=0,1114$) entre o

índice de CMP e a contagem de microorganismos psicrotróficos, provavelmente porque o leite apresentou boa qualidade microbiológica e o índice de CMP pode estar relacionado com sistema proteolítico do próprio leite (Mottar 1984; Friedrich et al. 2010).

Magalhães (2008), avaliando leite isento de CMP, inoculado com 10^3 UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens*, incubado em estufa a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 0, 2, 4, 6 e 8 dias por meio de CLAE-FG observou que quando a contagem de psicrotróficos era menor que 10^6 UFC/mL, não ocorrem produção de CMP pelas proteases bacterianas. No período entre o 2° e 4° dia pode-se observar aumento rápido da área relativa ao pico de CMP e no 6° dia aumento com menor intensidade. Após

o 6° dia de incubação, a área tendeu a decrescer, devido a extensa proteólise.

Observou-se para a acidez titulável interação significativa ($P=0,0003$) entre as variáveis temperatura e tempo durante o armazenamento. Analisando-se, portanto, por meio do teste SNK o desdobramento da temperatura dentro de cada tempo e posteriormente, por meio da análise de regressão linear o desdobramento do tempo dentro de cada temperatura.

Os resultados obtidos na análise de acidez titulável das amostras de leite cru em função das duas temperaturas de armazenamento estão demonstrados na Tabela 6. O efeito do tempo de armazenamento em relação à acidez titulável, em cada temperatura, pode ser verificado na Figura 7.

Tabela 6 - Resultado da análise de acidez titulável (mg ácido láctico/100 mL) diária, de amostras de leite cru armazenadas a 6°C e -12°C durante 4 dias ($n=6$)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)				
	0	1	2	3	4
Refrigeração (6°C)	14,55 aA	14,77 aB	14,92 aBC	15,12 aC	15,46 aD
Congelamento (-12°C)	14,55 aA	14,52 bA	14,60 bA	14,68 bA	15,07 bB

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Observa-se, a partir do primeiro dia, que as amostras armazenadas a 6°C apresentaram maior acidez, quando comparadas as amostras armazenadas a -12°C . Pode-se observar ainda um aumento linear na acidez titulável durante os quatro dias, sendo os maiores valores relacionados à temperatura de 6°C .

Não houve interação significativa ($P=0,6666$) entre a temperatura e o tempo de armazenamento, em relação ao pH. Não houve diferença entre as temperaturas

($P=0,1807$) e os tempos (0,3904) avaliados, não havendo ajuste a nenhum modelo matemático (Tabela 7). Os resultados observados durante o tempo de armazenamento estão representados na Figura 8.

O pH das amostras apresenta um comportamento estável e se encontra dentro da faixa normal de pH do leite que possui variações entre 6,6 a 6,8 (Brito et al., 2007(b)).

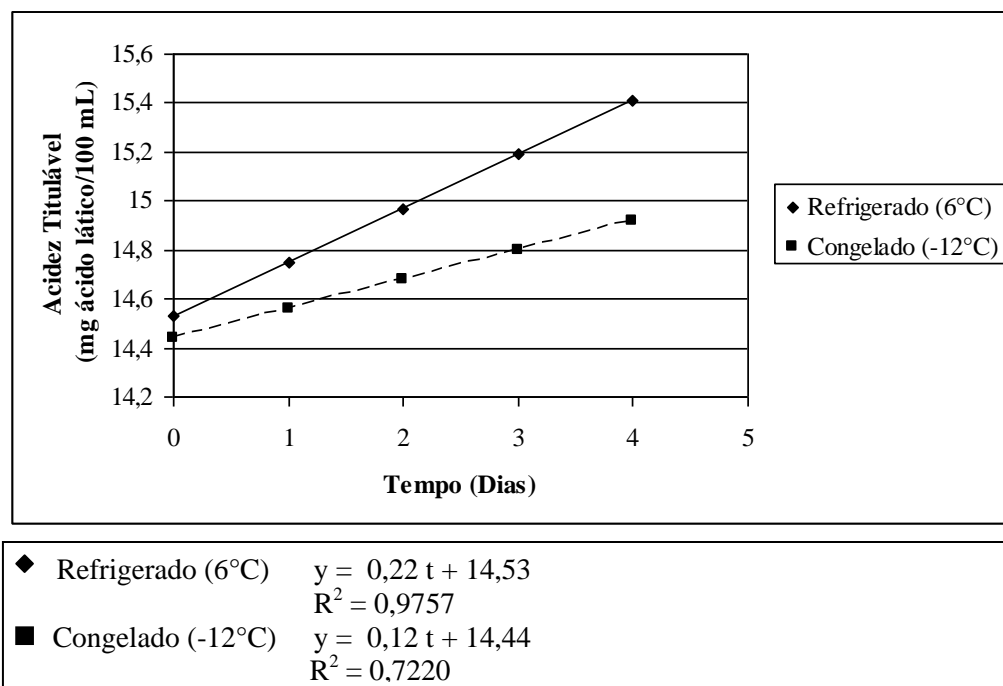


Figura 7 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C em amostras de leite cru em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100 mL), com curvas de regressão linear e coeficiente de determinação.

Tabela 7 - Efeito do pH de amostras de leite cru armazenadas a 6°C e -12°C durante 4 dias (n=6)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	1	2	3	4	
Refrigeração (6°C)	6,82	6,86	6,84	6,85	6,84	6,84 a
Congelamento (-12°C)	6,82	6,82	6,84	6,83	6,84	6,83 a
MÉDIA	6.82A	6.84A	6.84A	6.84A	6.84A	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

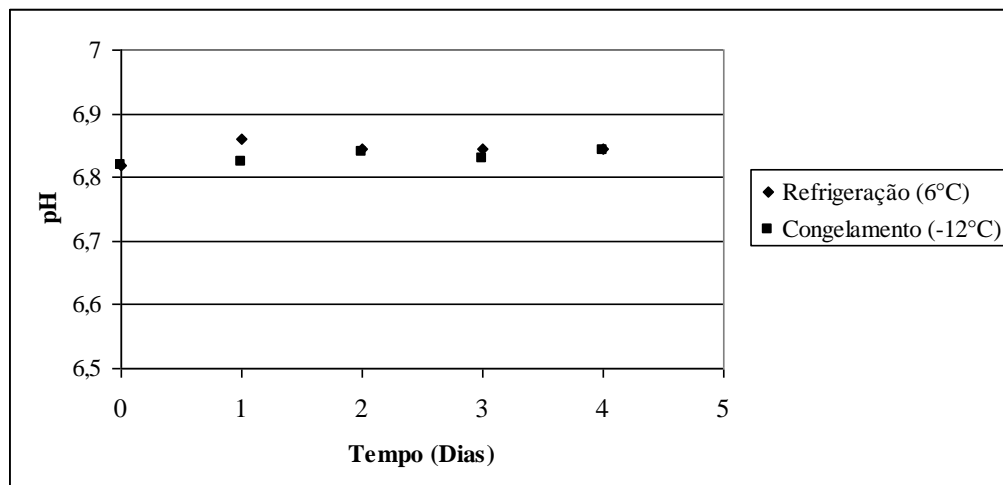


Figura 8 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite cru em relação ao pH.

Amorim (2007) verificou que não houve variação significativa do pH ao longo do tempo; porém, Guinot-Thomaz et al. (1994) observaram que micro-organismos psicrotróficos promovem abaixamento de pH do leite após quatro dias de estocagem a 4°C , devido a liberação de lipases microbianas que elevam o teor de ácidos graxos livres e até mesmo pela fermentação da lactose com formação de ácido lático.

Os dados avaliados apresentaram correlação moderadamente proporcional (0,6472), entre a análise de pH e a altura do pico de CMP do cromatograma..

4.2 Leite Pasteurizado

O leite pasteurizado foi processado a partir do leite cru que apresentava as condições médias descritas na Tabela 8. As amostras de leite

cru, em média, apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (Anexo) (Brasil, 2002).

O leite foi submetido ao processo de pasteurização lenta a baixas temperaturas ($65^{\circ}\text{C}/30\text{ min.}$). A pasteurização lenta é um processo de pouca utilização industrial, mas continua sendo empregada em laboratórios e por pequenos produtores rurais para o tratamento térmico do leite (Silva, 2000).

Imediatamente após a pasteurização, a atividade das enzimas peroxidase e fosfatase foi avaliada visando à verificação da eficácia do tratamento térmico. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para a atividade da enzima fosfatase e positivos para a peroxidase.

O tratamento térmico alterou alguns parâmetros de qualidade do leite e podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 8 - Resultados médios das análises de composição centesimal, microbiológicas, contagem de células somáticas e de detecção de resíduos químicos nas amostras de leite cru

Requisitos	Valores Médios	Padrões *
Gordura (%)	3,42	mín. 3,00
Proteína (%)	3,30	mín. 2,90
Sólidos Desengordurados (%)	8,55	mín. 8,40
Acidez titulável (mg ácido láctico/100mL)	14,55	14,00 a 18,00
Contagem de Células Somáticas (CCS) (cél./mL)	695.250	máx. 750.000
Contagem de micro-organismos mesófilos (UFC/mL)	4.124,17	750.000
Contagem de micro-organismos psicotróficos (UFC/mL)	456,67	
pH	6,82	6,6 a 6,8
Resíduo de antibióticos	Ausente	Ausente
Índice de CMP (mg/L)	27,79	máx. 30,00

* (Brasil, 2002 e 2006).

Tabela 9 - Variações médias dos resultados das análises microbiológicas, índice de CMP, acidez titulável e pH observadas entre o leite pasteurizado e o leite cru que lhe deu origem

Requisitos	Leite Cru	Leite Pasteurizado	Alteração (%)
Contagem de micro-organismos mesófilos (UFC/mL)	4.124,17	23,00	- 99,44
Contagem de micro-organismos psicotróficos (UFC/mL)	456,67	0,33	- 99,93
Índice de CMP (mg/L)	27,79	26,63	- 4,18
Acidez titulável (mg ácido láctico/100mL)	14,55	14,33	- 1,49
pH	6,82	6,84	+ 0,29

(+) Acréscimo; (-) Redução

Os parâmetros que apresentaram maiores alterações foram às contagens de micro-organismos mesófilos (UFC/mL) e psicotróficos (UFC/mL), que apresentaram reduções de 99,44% e 99,93%, respectivamente.

As contagens dos micro-organismos diminuíram em função do tratamento térmico ao qual o leite foi submetido. O efeito do processamento com calor é devido à

desnaturação de proteínas que destroem a atividade enzimática e os metabolismos controlados por enzimas nos micro-organismos (Fellows, 2000). A destruição é dependente do binômio tempo e temperatura e a pasteurização lenta é um tratamento térmico que destrói parte dos micro-organismos presentes no alimento. Este tratamento é utilizado para destruir todos os micro-organismos patogênicos e

deterioradores de baixa resistência ao calor (Castaigne e Goulet, 1991; Spreer, 1991).

Após o tratamento térmico houve uma redução de 4,18% no índice de CMP (Tabela 8). A queda dos valores de CMP também foi detectada entre matéria-prima e produto recém-processado, por Fukuda (1994), que comparou dados de leite cru com dados desse mesmo leite pasteurizado e observou decréscimo significativo na taxa de ácido siálico do leite pasteurizado.

Fukuda (2003), comparando as alturas dos picos de CMP, pelo método CLAE, para amostras de leite cru e o correspondente leite UAT, no dia de produção, mostrou uma variação significativa de diminuição de 49,7 a 83,1%. Por meio do método da ninidrina ácida foi observada, uma diminuição no teor de ácido siálico nos respectivos leites UAT de 2,2 a 22,2%. A razão desta discrepância dos resultados não ficou esclarecida, a qual em parte poderia ser oriunda do efeito do tratamento térmico dado ao leite UAT e em parte devido ao efeito do congelamento da amostra de leite recém processado, até o momento da realização da análise CLAE.

A variação dos valores de pH foi pequena e o leite se manteve dentro da faixa de pH considerada normal, que possui variações entre 6,6 a 6,8 (Brito et al., 2007(b)).

As amostras apresentaram ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL das amostras e contagens de coliformes totais (30°C) e termotolerantes (45°C) menores que 0,3 NMP/mL.

A contagem de coliformes totais (30°C) manteve-se a mesma (<0,3 NMP/mL) durante os oito dias de armazenamento nas temperaturas de -12°C e 6°C, não havendo correlação com os outros parâmetros avaliados.

Paiva (2007), durante julho de 2005 a novembro de 2006, avaliou 151 amostras de leite pasteurizado provenientes de 43 laticínios do estado de Minas Gerais que apresentaram, a média da enumeração de coliformes a 30°C de 60,90 NMP/mL. Considerando o parâmetro para amostra indicativa da IN 51/2002 (M=4), 113 amostras (74,83%) não atenderam ao padrão. Destas, 29 (25,66%) apresentaram resultado positivo para a pesquisa de fosfatase alcalina. A enumeração de coliformes termotolerantes (45°C) apresentou média de 24,7 NMP/mL. Considerando o plano de amostragem para coliformes 45°C (M=2), 80 amostras (52,98%) estavam não conformes. A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, em média, foi de $1,38 \times 10^5$ UFC/mL. Sessenta amostras (39,74%) apresentaram resultado maior do que $2,5 \times 10^5$ UFC/mL (M= 8×10^4 UFC/mL). A mensuração do número de micro-organismos mesófilos aeróbios do leite pasteurizado serve como auxílio na avaliação da qualidade e conservação.

Savindo (2008), avaliando a qualidade microbiológica de leite pasteurizado estocado por 24 horas a temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e $10 \pm 1^\circ\text{C}$, imediatamente após a coleta do leite cru e posteriormente ao armazenamento refrigerado do leite cru durante 4 e 7 dias, verificou que quanto maior o tempo e temperatura de armazenamento do leite cru, pior a qualidade do leite pasteurizado. As contagens totais de micro-organismos variaram de $3,6 \times 10^1$ a $4,6 \times 10^2$ UFC/mL, as de psicotróficos de <1 a $3,6 \times 10^2$ UFC/mL, de *Pseudomonas* spp. de <1 a $1,8 \times 10^2$ UFC/mL, de coliformes 30-35°C de <0,3 a $3,9 \times 10^1$ NMP/mL e coliformes 45°C de <0,3 a 1,6 NMP/mL. As contagens de termofílicos mesófilos e psicotróficos e de esporos mesófilos e psicotróficos também

aumentaram durante o armazenamento refrigerado.

Não houve interação significativa ($p=0,6349$) entre a temperatura e o tempo de armazenamento, em relação a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos. Analisou-se, portanto, o efeito simples de cada variável. Não houve diferença significativa entre as temperaturas, por meio do teste SNK ($p=0,1096$) e o efeito do tempo

($p=0,0005$) foi avaliado por meio da análise de regressão dos dados.

A contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios em relação às duas temperaturas, analisadas a cada dois dias, por um período de oito dias, estão demonstrados na Tabela 10. O efeito do tempo de armazenamento em relação à contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios pode ser verificado na Figura 9.

Tabela 10 - Contagem (UFC/mL) de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado armazenado em temperatura de -12°C e 6°C durante 8 dias ($n=6$)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	2	4	6	8	
Refrigeração (6°C)	23,00	17,40	19,00	14,33	13,25	17,40 a
Congelamento (-12°C)	23,00	10,00	16,58	11,33	13,25	14,83 a
MÉDIA	23.00A	13.70B	17.79B	13.82B	12.38B	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)
 Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

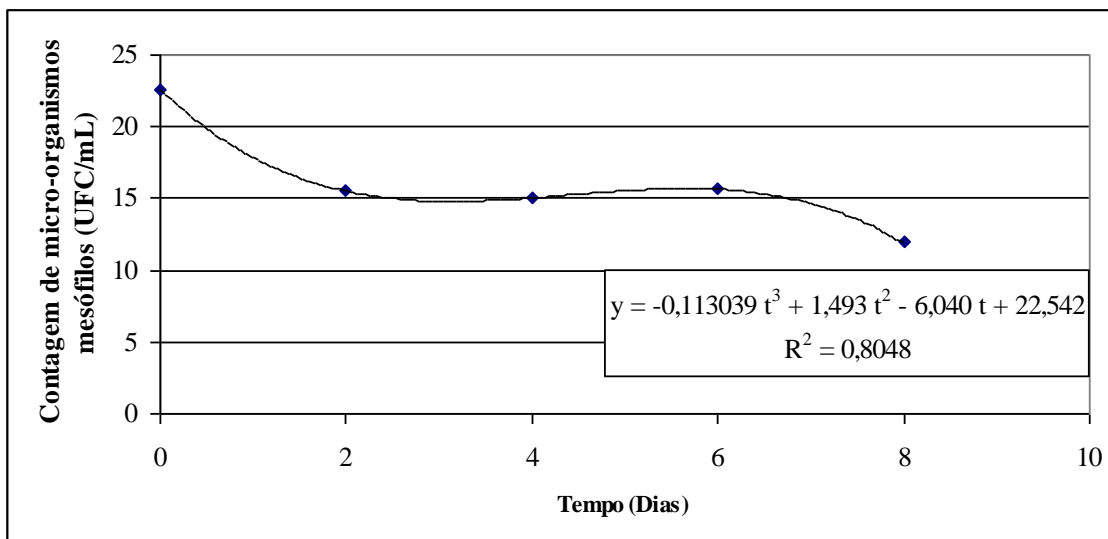


Figura 9 - Variação na enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos em leite pasteurizado durante 8 dias a 6°C e -12°C , com sua curva de regressão e coeficientes de determinação.

Houve uma redução na enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos porque as médias utilizadas consideraram as duas temperaturas e no processo de congelamento lento ocorre redução da atividade de água (a_w) e a formação de grandes cristais de gelo que podem causar a lise das bactérias (Fellows, 2000).

Não houve diferença significativa entre as temperaturas devido à boa qualidade microbiológica do leite pasteurizado, portanto, o leite pode ser armazenado a 6°C e a -12°C durante oito dias, sem que ocorra alteração na contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos.

As amostras apresentaram contagem de micro-organismos psicotróficos <1UFC/mL.

As amostras estão de acordo com a Instrução Normativa nº51, estabelecida no RTIQ do Leite Pasteurizado, que considera no plano de amostragem analisar cinco amostras do produto cujo limite máximo para micro-organismos mesófilos aeróbios para amostras conformes é 4×10^4 UFC/mL, podendo ter, no máximo duas amostras com qualidade intermediária ou marginal que se caracteriza por apresentar contagem de 4×10^4 a 8×10^4 UFC/mL. Amostras com contagem acima de 8×10^4 UFC/mL são consideradas em

desacordo com os padrões legais vigentes (Brasil, 2002).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que regulamenta sobre padrões microbiológicos para alimentos estabelece como parâmetros de qualidade para leite pasteurizado apenas as análises de Coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. (Brasil, 2001).

Observou-se para a pesquisa de índice de CMP que os resultados analisados não apresentaram interação significativa ($P=0,0706$) entre as variáveis temperatura e tempo durante o armazenamento. Analisou-se, portanto, o efeito simples de cada variável. Houve diferença significativa entre as temperaturas, por meio do teste SNK ($P=0,0003$) e não houve efeito significativo em relação ao tempo, não havendo ajuste a nenhum modelo matemático.

Os valores médios da altura dos picos em relação às duas temperaturas, analisadas a cada dois dias, por um período de oito dias, estão demonstrados na Tabela 11. Os resultados observados em relação ao tempo estão representados na Figura 10.

Tabela 11 - Valores médios da altura dos picos de CMP em amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 8 dias

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	2	4	6	8	
Refrigeração (6°C)	11.911,83	13.325,33	12.697,83	12.626,00	13.828,00	12.877,80 a
Congelamento (-12°C)	11.911,83	11.923,83	11.960,50	12.427,20	11.752,00	11.972,57 b
MÉDIA	11911.83A	12624.58A	12329.17A	12535.64A	12710.15A	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

As amostras armazenadas a temperatura de congelamento (-12°C) apresentaram, em média, menor altura no pico de CMP e menor variação em relação a condição inicial

(Tabela 12). Recomendando-se, portanto, que as amostras de leite pasteurizado sejam congeladas quando destinadas a pesquisa de índice de CMP.

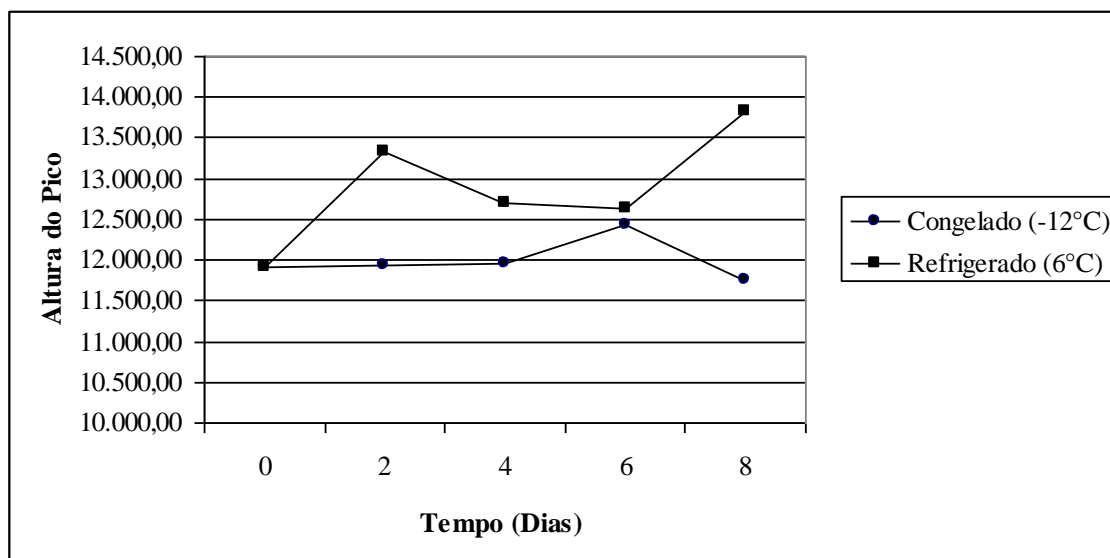


Figura 10 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 6°C e -12°C de amostras de leite cru em relação ao índice de CMP.

Tabela 12 - Comparação entre a altura do pico de CMP de amostras de leite pasteurizado no tempo 0 e após 8 dias de armazenamento nas temperaturas de -12°C e 6°C

TEMPERATURA	ALTURA DO PICO		VARIACÃO
	Tempo 0	Média após 8 dias	
Refrigeração (6°C)	11.911,83	12.877,80	8,11%
Congelamento (-12°C)	11.911,83	11.972,57	0,51%

A diferença entre as temperaturas pode ser justificada pela ação da temperatura sobre a atividade enzimática. As enzimas atuam muito lentamente em temperatura de refrigeração e congelamento com aumento da atividade enzimática à medida que as temperaturas de armazenamento são aumentadas. Durante o congelamento e descongelamento, pode haver a desnaturação

de algumas enzimas, porém a maior parte das enzimas conserva parcialmente sua atividade nos produtos congelados (Richardson e Hyslop, 1993).

O coeficiente de correlação entre índice de CMP e a acidez titulável foi mediano (-0,4781), porém muito significativo

(P=0,0005). Havendo redução no índice de CMP, quando a acidez aumenta.

Não houve interação significativa (P=0,4781) entre a temperatura e o tempo de armazenamento, em relação a acidez titulável. Analisou-se, portanto, o efeito simples de cada variável. A diferença entre as temperaturas foi observada por meio do SNK

(P=0,0037) e o efeito do tempo foi avaliado por meio da análise de regressão dos dados (P<0,05).

Os resultados de acidez titulável das amostras em relação às duas temperaturas, analisadas a cada dois dias, por um período de oito dias, estão demonstrados na Tabela 13, e em relação, ao tempo na Figura 11.

Tabela 13 - Acidez titulável (mg ácido láctico/100mL) de amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 08 dias

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	2	4	6	8	
Refrigeração (6°C)	14,33	14,80	15,03	15,35	15,60	15,02 a
Congelamento (-12°C)	14,33	14,50	14,82	15,00	15,30	14,79 b
MÉDIA	14,33A	14,65B	14,93C	15,23D	15,38D	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)
 Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

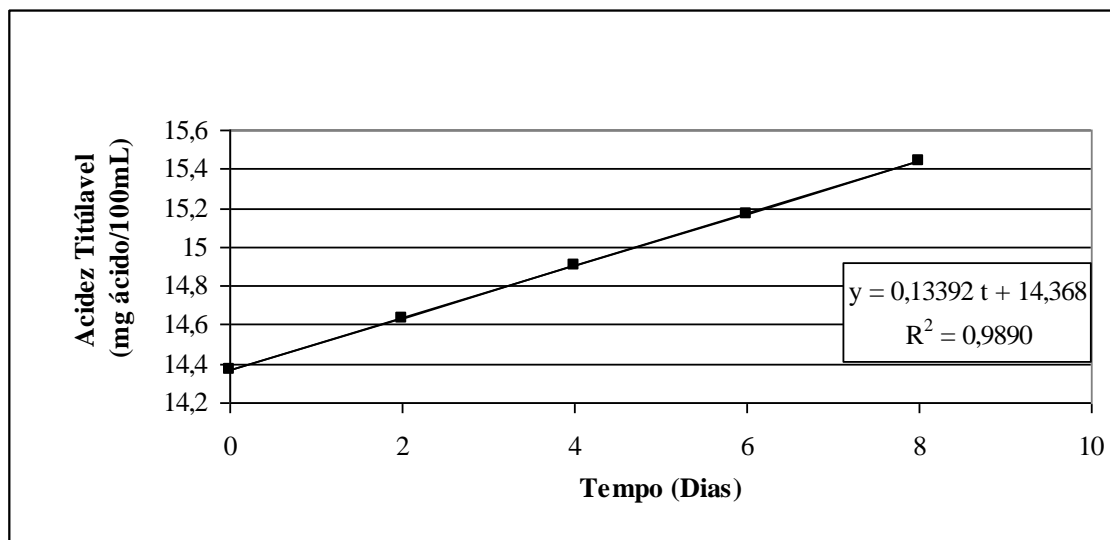


Figura 11 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a -12°C e 6°C de amostras de leite pasteurizado em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100mL), com sua curva de regressão e coeficiente de determinação.

Paiva (2007) avaliou 151 amostras de leite pasteurizado que apresentaram valor médio de acidez titulável igual a 15,32°D. O valor máximo encontrado foi 27,6°D e o menor 12,6°D e 19,87% (30 amostras) não atenderam ao padrão de acidez estabelecido pela legislação vigente, situado ente 14,0 e 18%. O coeficiente de correlação entre índice de CMP e o pH foi baixo (0,2472); porém, significativo ($p=0,0288$), havendo aumento no índice de CMP, quando o pH aumenta.

Muitas variáveis composicionais e de processamento afetam a estabilidade da micela de caseína, entre estes fatores, se inclui o pH (Walstra e Jennes, 1987). Portanto, alterações no pH podem desestabilizar a micela de caseína, tornando-a mais susceptível a proteólise.

Não houve interação significativa ($P=0,6277$) entre a temperatura e o tempo de

armazenamento, em relação ao pH. Analisou-se, portanto, o efeito simples de cada variável. A diferença entre as temperaturas foi observada por meio do teste SNK ($P=0,0313$) e o efeito do tempo ($P<0,05$) foi avaliado por meio da análise de regressão dos dados observados.

O pH das amostras em relação às duas temperaturas, analisadas a cada dois dias, por um período de oito dias, estão demonstrados na Tabela 14. O efeito do tempo de armazenamento em relação ao pH, em cada temperatura, pode ser verificado na Figura 12.

Houve diferença significativa entre as temperaturas de 6°C e -12°C em relação ao pH das amostras. Porém, tais valores, ainda se encontram dentro da faixa normal de pH do leite que possui variações entre 6,6 a 6,8 (Brasil, 1997; Brito et al., 2007).

Tabela 14 - Efeito do pH de amostras de leite pasteurizado armazenadas a 6°C e -12°C durante 8 dias (n=6)

TEMPERATURA	TEMPO (DIAS)					MÉDIA
	0	2	4	6	8	
Refrigeração (6°C)	6,84	6,85	6,80	6,77	6,76	6,80 a
Congelamento (-12°C)	6,84	6,84	6,74	6,71	6,73	6,77 b
MÉDIA	6.84A	6.84A	6.77B	6.76B	6.73B	

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

O congelamento e estocagem do leite a -10°C causa cristalização da água pura, enquanto que o líquido não congelado torna-se mais saturado em relação aos vários sais. A força iônica da fase líquida aumenta com um concomitante aumento na concentração de Ca^{2+} , pois parte do fosfato de cálcio solúvel precipita-se como $Ca^3(PO_4)_2$, liberando H^+ e

diminuindo o pH até 5,8 aproximadamente. A cristalização da lactose como amonohidratada exacerba a situação. A combinação do aumento da concentração de Ca^{2+} e a redução do pH causam desestabilização das micelas que precipitam quando o leite é descongelado (Fox e McSweeney, citados por Fukuda, 1998).

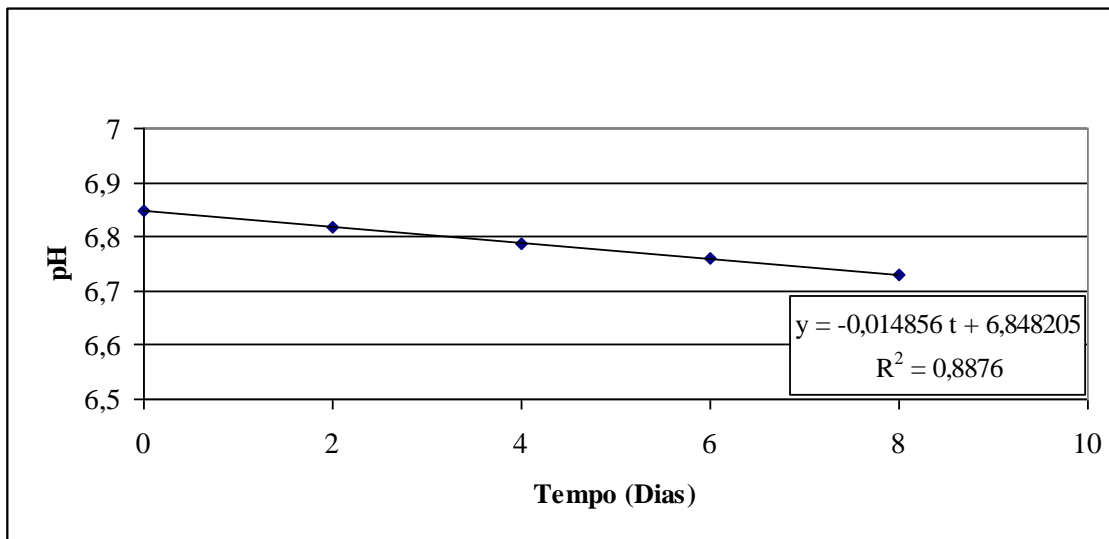


Figura 12 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de 6°C e -12°C de armazenamento de amostras de leite pasteurizado em relação ao pH, com sua curva de regressão e coeficiente de determinação.

4.3 Leite UAT

A pesquisa do índice de CMP por CLAE é muito precisa, uma vez que os dados obtidos para amostras em duplicata de leite UAT, nas temperaturas de 21, 6 e -12°C, apresentam baixo coeficiente de variação na altura do pico de CMP do cromatograma, sendo respectivamente, 1,67%, 2,13%, e 1,85% (Tabela 15). O coeficiente de variação médio, considerando as três temperaturas, foi de 1,88% (Tabela 16).

De acordo com Wolfshoon-Pombo (1984), pode-se esperar para a repetibilidade do método um coeficiente de variação menor que 2%, independentemente do teor de CMP das amostras e isto ocorre devido as simples operações que são requeridas no pré-tratamento das amostras.

A análise da altura do pico de CMP de amostras de leite UAT armazenadas nas temperaturas de 21, 6 e -12°C, durante 120 dias, apresentou interação significativa ($P < 0,05$) entre as variáveis temperatura e tempo durante o armazenamento. Analisou-se, portanto, por meio do teste SNK, o desdobramento da temperatura dentro de cada tempo e, posteriormente, por meio da análise de regressão linear o desdobramento do tempo dentro de cada temperatura.

Os valores médios da altura dos picos dos cromatogramas em relação às três temperaturas, analisadas mensalmente, estão demonstrados na Tabela 17. O efeito do tempo de armazenamento das amostras em relação à altura do pico do cromatograma, em cada temperatura, pode ser verificado na Figura 13.

Tabela 15 - Coeficiente de variação da altura do pico de CMP de amostras de leite UAT armazenados a 21, 6 e -12°C

TEMPERATURA								
21°C			6°C			-12°C		
Valor médio	s	CV (%)	Valor médio	s	CV (%)	Valor médio	s	CV(%)
12.145,5	9,19	0,08	21.306,5	164,76	0,77	13.821	36,77	0,27
8.939,5	45,96	0,51	22.669,5	521,14	2,30	11.130	445,48	4,00
16.449,5	492,85	3,00	23.449	1062,07	4,53	13.596	205,06	1,51
12.192	39,60	0,32	14.628	349,31	2,39	13.539,5	178,90	1,32
11.169	5,66	0,05	25.024	142,84	0,57	22.382	254,56	1,14
19.780	43,84	0,22	32.127,5	983,59	3,06	13.579,5	413,66	3,05
68.956,5	1062,78	1,54	13.579,5	413,66	3,05	23.517	520,43	2,21
26.019	468,10	1,80	23.517	520,43	2,21	30.625,5	429,21	1,40
42.111	304,06	0,72	30.625,5	429,21	1,40	17.304,5	369,82	2,14
62.900,5	2065,46	3,28	17.304,5	369,82	2,14	27.019,5	280,72	1,04
24.211,5	351,43	1,45	27.019,5	280,72	1,04	11.552	196,58	1,70
42.102	452,55	1,07	10.555,5	74,25	0,70	7.855	289,91	3,69
11.1852	1639,07	1,47	19.889,5	235,47	1,18	11.214	39,60	0,35
39.382,5	878,93	2,23	12.440,5	556,49	4,47	9.098,5	218,50	2,40
60.394	326,68	0,54	CV	2,13		17.544,5	13,44	0,08
99.069,5	820,95	0,83				14.635	35,36	0,24
32.472,5	347,19	1,07				19.517,5	729,03	3,74
57.534,5	1224,00	2,13				13.579,5	413,66	3,05
132.232,5	8245,57	6,24				CV	1,85	
43.991,5	1284,81	2,92						
68.566,5	584,78	0,85						
119.440	3797,16	3,18						
34.747,5	712,06	2,05						
63.002,5	1583,21	2,51						
CV		1,67						

s=Desvio Padrão; CV=Coeficiente de Variação

Tabela 16 - Coeficiente de variação médio da altura do pico de CMP de amostras de leite UAT armazenadas a 21, 6 e -12°C

TEMPERATURA	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
21°C	1,67
6°C	2,13
-12°C	1,85
VALOR MÉDIO	1,88

Tabela 17 - Valores médios da altura dos picos de CMP em amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias

TEMPERATURA	TEMPO				
	0	30	60	90	120
Ambiente (≈21°C)	13.445,92 a A	35.469,75 aB	66.784,17 aC	76.996,75 aC	78.072,50 aC
Refrigeração (6°C)	13.445,92 aA	19.851,25 bB	23.851,67 bB	21.866,58 bB	23.499,83 bB
Congelamento (-12°C)	13.445,92 aAB	15.664,33 bAB	16.717,75 cB	11.983,17 cAB	11.036,50 cA

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

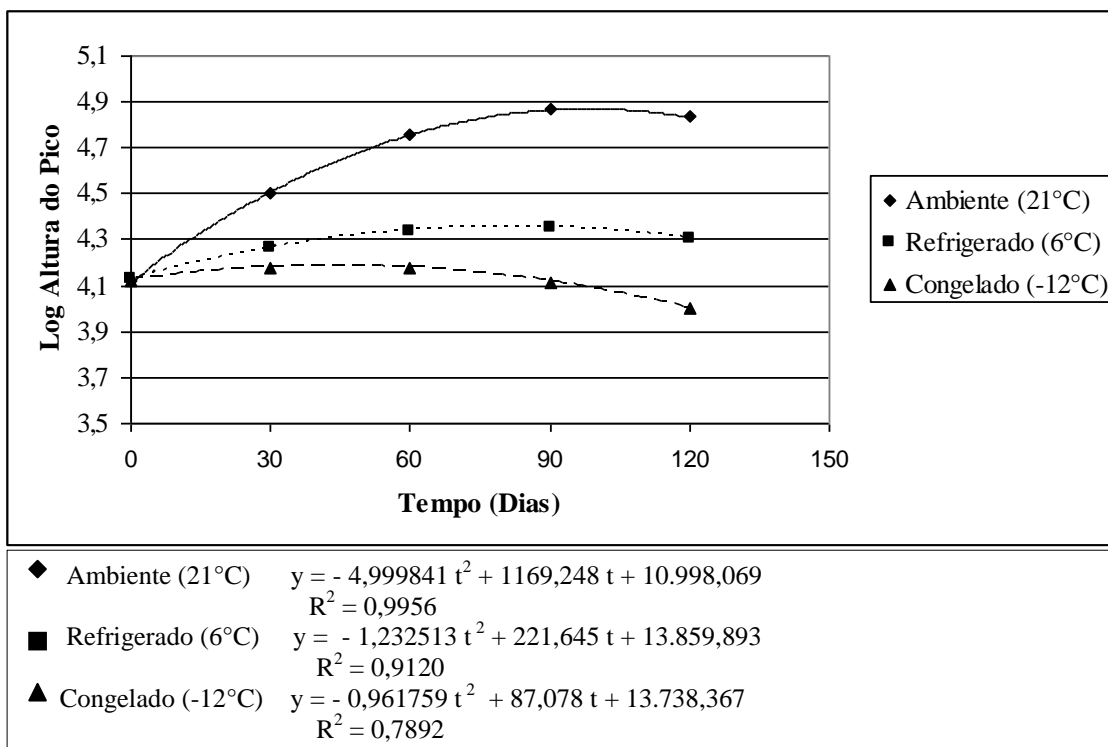


Figura 13 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento a 21°C, 6°C e -12°C de amostras de leite UAT em relação à altura do pico do cromatograma, com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.

Observa-se, a partir do 30º dia, que o leite armazenado a 21°C apresentou altura do pico maior que as amostras armazenadas a 6°C e -12°C. Após os 60 dias de armazenamento, observa-se diferença significativa entre as três temperaturas avaliadas e o maior pico se relaciona a maior temperatura.

De acordo com os resultados obtidos a partir de amostras armazenadas em temperatura ambiente, observa-se que com o avanço do prazo de validade, ocorre um progressivo aumento da quantidade de CMP no leite. Tais resultados condizem com os encontrados por Fukuda (2003), que observou uma proteólise progressiva durante o período de validade do leite UAT.

O congelamento das amostras (-12°C) proporcionou um melhor controle da proteólise do leite, quando comparado com as outras temperaturas. Porém, ainda pode afetar os resultados do índice de CMP por CLAE, pela geração de resultados duvidosos. Os dados estão de acordo com Fukuda (2003) que sugere que as quantificações de CMP devam ser feitas de imediato com amostras recém colhidas e não congeladas.

Fukuda (2003), avaliando amostras congeladas de leite cru refrigerado e do leite UAT correspondente, no momento da coleta e mantidas por 24 horas (um dia) e um mês, em temperaturas de -14 a -18°C, apresentaram média de altura de pico de 9.741, 16.378 e 11.382 para leite refrigerado e 8.800, 7.304 e 7.265 para o leite UAT correspondente. Foi observado um acréscimo significativo após congelamento de 24 horas e após um mês os teores detectados aproximaram-se daqueles obtidos pelo leite que não sofreu congelamento. Quando essas amostras foram submetidas ao processo de ultrapasteurização e analisadas no dia de produção, houve uma diminuição dos valores ($\pm 10\%$) em relação aos originais, valores estes que continuaram

em decréscimo suave após congelamento por 24 horas e um mês.

Friedrich et al. (2010), avaliando a estabilidade do leite UAT recém processado e de amostras do mesmo lote congeladas durante 50 dias, também verificaram aumento progressivo ao longo dos dias, demonstrando que mesmo com o processo de ultra-alta temperatura, há a ocorrência de proteólise no leite durante o tempo de vida de prateleira.

A proteólise no leite UAT pode ser promovida por suas enzimas nativas, como por exemplo a plasmina, ou por enzimas sintetizadas pela microbiota contaminante (Fukuda, 2003). A atividade proteolítica do leite por proteases extracelulares de microorganismos psicrotróficos contribui de maneira significativa na degradação de proteínas. A caseína é o principal substrato do leite que sofre proteólise, devido a sua alta concentração e susceptibilidade (Santos, 2003). O tratamento térmico necessário para desnaturar as enzimas proteolíticas em leite durante o armazenamento seria de 142°C por 18 segundos ou 120°C por 15 minutos (Fox, 1992).

Embora não tenha especificidade, as enzimas produzidas por bactérias podem hidrolisar a κ -caseína na ligação 105 e 106 levando a formação de CMP. As enzimas também podem provocar a ruptura entre os aminoácidos metionina (106) e alanina (107) formando uma estrutura conhecida como pseudo-CMP, que difere do CMP por ter apenas um aminoácido a menos. A cromatografia não é capaz de diferenciar o CMP verdadeiro do pseudo-CMP (Magalhães, 2008).

As amostras apresentaram altura de pico máximo, quando armazenadas durante 116 dias a 21°C, 89 dias a 6°C e 45 dias a -12°C.

A variação da altura dos picos em relação à condição inicial das amostras foi avaliada, considerando-se a altura máxima em cada temperatura Tabela 18.

Tabela 18 - Variação (%) da altura do pico de CMP do cromatograma em relação à temperatura de armazenamento e altura máxima

Tempo (Dias)	Temperatura					
	21°C		6°C		-12°C	
	Altura do Pico	Variação (%)	Altura do Pico	Variação (%)	Altura do Pico	Variação (%)
0	13.445,92	0	13.445,92	0	13.445,92	0
45	53.489,55	297,00	21.338,08	58,70	15.709,32	16,83
89	75.457,40	461,19	23.823,56	77,18	13.870,22	3,08
116	79.352,98	490,16	22.986,02	70,95	10.897,99	- 18,95

Observa-se que as amostras armazenadas a temperatura de -12°C apresentam menor variação, e considerando-se que nesta condição se tem um maior controle da proteólise (Tabela 16 e Figura 13), recomenda-se que as amostras destinadas a pesquisa de índice de CMP sejam congeladas a fim de se ter menores alteração dos resultados avaliados, caso não seja possível a análise imediata.

O congelamento das amostras é incapaz de impedir a ocorrência de proteólise e, dessa maneira, pode levar a um resultado duvidoso, porém, ainda é o melhor método de conservação por períodos variáveis até a execução das análises, principalmente em se tratando das dimensões continentais brasileiras.

Deste modo, o procedimento usual de remessa de amostras de leite congeladas logo após a coleta, para a pesquisa de soro lácteo por meio da CLAE, adotado pelos serviços de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, seja federal ou estadual, é indicado, caso não seja possível a realização das análises de imediato.

As amostras de leite armazenadas a 6°C e -12°C durante os 120 dias não apresentaram contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios estando em conformidade com a legislação vigente, que estabelece limite máximo de 100UFC/mL (Brasil, 1996). Oito amostras (8,89%) de leite armazenadas a 21°C apresentaram esta contagem acima do limite máximo permitido pela legislação, com valores na ordem de até 10³UFC/mL.

Rossi Júnior et al. (2006), verificaram que a população de micro-organismos mesófilos apresentaram números na ordem de < 10⁰ e 10¹UFC/mL no leite UAT. Sendo, portanto, o tratamento térmico aplicado ao leite UAT capaz de reduzir, mas não de eliminar a carga microbiana encontrada no leite cru.

A contagem de micro-organismos mesófilos (UFC/mL) em leite UAT é importante, uma vez que apresenta correlação significativa diretamente proporcional de 60,41% em relação à altura de CMP.

A contagem de micro-organismos psicrotóxicos (UFC/mL) apresentou valores <1UFC/mL e, portanto, não apresentou

correlação significativa com a altura do pico de CMP e outros parâmetros avaliados. Porém, a maioria das proteinases psicrotróficas é extremamente termoestável e pode resistir aos tratamentos térmicos com ultra-alta temperatura (UAT) (Cromie, 1992).

A acidez titulável, expressa em °Dornic, das amostras de leite UAT armazenadas nas temperaturas de 21, 6 e -12°C, durante 120 dias, apresentou interação significativa ($P<0,05$) entre as variáveis temperatura e tempo durante o armazenamento. Analisou-se, portanto, por meio do teste SNK o desdobramento da temperatura dentro de cada tempo e, posteriormente, por meio da análise de regressão linear o desdobramento do tempo dentro de cada temperatura.

A acidez titulável das amostras em relação às três temperaturas, analisadas mensalmente, por um período de cinco meses, está demonstrada na Tabela 19. O efeito do

tempo de armazenamento das amostras em relação à altura do pico do cromatograma, em cada temperatura, pode ser verificado na Figura 14.

Observa-se, a partir do 30º dia, diferença significativa entre as temperaturas avaliadas em relação à acidez titulável. O leite armazenado a 21°C apresentou maior acidez, seguido do leite refrigerado (6°C) e congelado (-12°C).

Houve uma baixa correlação (0,296) significativa entre a acidez titulável e a contagem de micro-organismos mesófilos.

O congelamento é o melhor método de conservação das amostras, uma vez que permite maior preservação das mesmas. Tal fato é importante, uma vez que a acidez titulável apresenta correlação significativa proporcional com a altura do pico de CMP de 69,05%.

Tabela 19 - Acidez titulável (mg ácido/100mL) de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias

TEMPERATURA	TEMPO				
	0	30	60	90	120
Ambiente (≈21°C)	12,95 aA	14,37 aB	15,30 aC	15,58 aC	16,57 aD
Refrigeração (6°C)	12,95 aA	13,72 bB	14,23 bC	14,33 bC	15,38 bD
Congelamento (-12°C)	12,95 aA	13,00 cA	12,95 cA	13,80 cB	14,15 cB

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK ($P<0,05$)

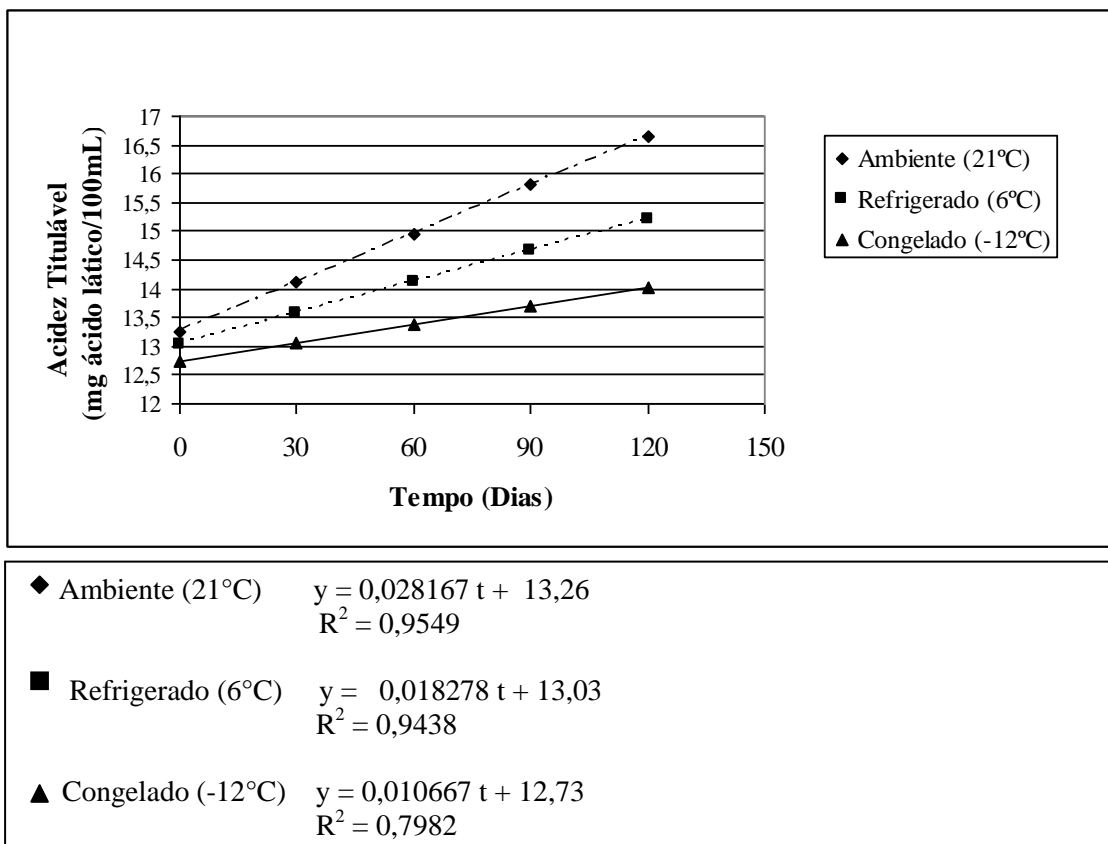


Figura 14 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento 21°C, 6°C e -12°C de amostras de leite UAT em relação à acidez titulável (mg ácido láctico/100mL), com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leite UAT, o leite UAT deve apresentar acidez entre 0,14% e 0,18% (Brasil, 2007). Das 90 amostras avaliadas 36 (40%) estavam abaixo do limite mínimo. Sendo 7 (7,78%) amostras armazenadas a 21°C, 11 (12,22%) amostras armazenadas a 6°C e 18 (20%) amostras armazenadas a -12°C.

Amostras de leite UAT integral coletadas em estabelecimentos comerciais de Belo Horizonte, apresentaram 0,4% das amostras com acidez abaixo de 0,14% (Coelho, 2000). Martins et al. (2008) avaliaram 30 amostras

de leite UAT, sendo que todas se apresentaram de acordo com a legislação vigente.

Bersot (2010) avaliou 150 amostras de leite UAT, 4 (2,7%) estavam abaixo e 7 (4,7%) estavam acima dos limites estabelecidos pelo RTIQ do leite UAT, apresentando um comportamento variável.

Os resultados de pH analisados apresentaram interação significativa ($P < 0,05$) entre as variáveis temperatura e tempo durante o armazenamento. Analisou-se, portanto, por meio do teste SNK o desdobramento da

temperatura dentro de cada tempo e, posteriormente, por meio da análise de regressão linear o desdobramento do tempo dentro de cada temperatura.

Os valores médios do pH em relação às três temperaturas, analisadas mensalmente, por

um período de cinco meses, estão demonstrados na Tabela 20 e o efeito do tempo de armazenamento em relação ao pH, em cada temperatura, pode ser verificado na Figura 15 abaixo.

Tabela 20 - Resultados médios da análise de pH das amostras de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C, 6°C e -12°C durante 120 dias

TEMPERATURA	TEMPO				
	0	30	60	90	120
Ambiente (≈21°C)	6,76 aA	6,76 aA	6,76 aA	6,77 aA	6,63 aB
Refrigeração (6°C)	6,76 aA	6,82 bB	6,81 bC	6,77 aB	6,65 abD
Congelamento (-12°C)	6,76 aA	6,89 cB	6,88 cA	6,81 bA	6,68 bC

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste SNK (P<0,05)

A análise de pH apresenta valores variáveis, mas dentro da faixa de pH considerada normal, que possui variações entre 6,6 a 6,8 (Brito et al., 2007).

A correlação entre o pH e a acidez titulável foi significativa (P=<0,05) e moderadamente proporcional (0,67).

Não houve correlação significativa do índice de CMP com o pH, embora a maior parte das enzimas apresentem atividade máxima no pH entre 4,5 e 8,0 (Richardson e Hyslop, 1993).

Observa-se em todos os parâmetros avaliados, que os coeficientes de determinação das amostras congeladas são menores que o das refrigeradas que por sua vez são menores que os coeficientes das amostras armazenadas a temperatura

ambiente. Isto ocorre porque o congelamento do leite pode causar alterações nas suas propriedades. A completa geleificação no descongelamento raramente ocorre e sua aparência não permanece homogênea, apresentando algumas vezes, sedimentação, floculação ou liberação de óleo (Tulloch e Cheney, 1984). Quando estocado congelado, o complexo fosfocaseinato de cálcio é afetado e, com o tempo, há perda da estabilidade, aparecendo um precipitado quando o leite é descongelado. Inicialmente, a floculação é reversível com aquecimento e agitação, posteriormente, com a continuação da estocagem, torna-se irreversível (Keeney e Kroger, 1974, citados por Fukuda 2003).

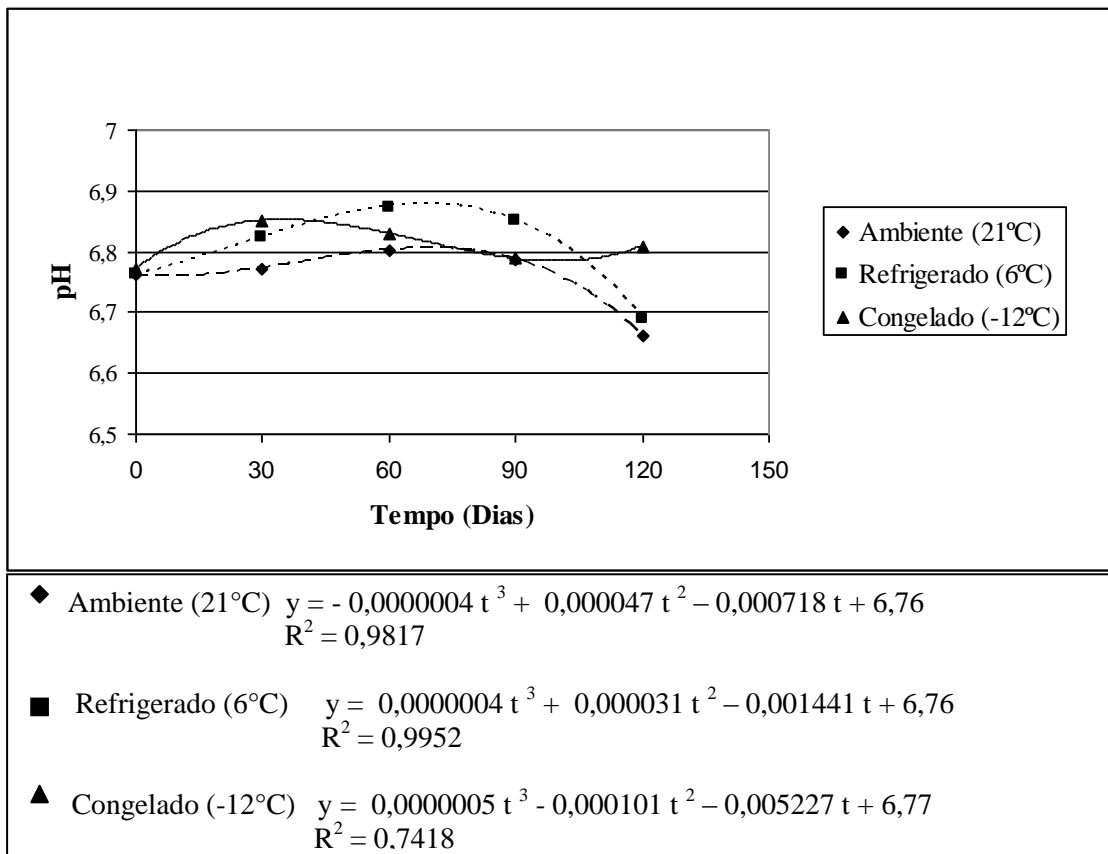


Figura 15 - Efeito do tempo (dias) e da temperatura de armazenamento 21°C, 6°C e -12°C de leite UAT em relação ao pH das amostras, com suas respectivas curvas de regressão e coeficientes de determinação.

Analisando as amostras armazenadas em temperatura ambiente (21°C), conforme o modo de comercialização tradicional, observa-se que apenas quatro amostras estão de acordo com a legislação vigente, que considera limite máximo de 30 mg/L para

leite destinado ao abastecimento direto (Brasil, 2006) (Tabela 21) e que as amostras não conformes apresentaram resultados de 1,30 a 15,38 vezes acima do valor permitido ao consumo direto.

Tabela 21 - Índice de CMP (mg/L) de amostras de leite UAT armazenadas a 21°C durante 120 dias (n=6)

Repetições	Tempo (Dias)				
	0	30	60	90	120
1	26,168	148,570	337,416	461,081	461,282
2	16,550	48,170	106,127	139,669	165,656
3	39,080	100,046	173,186	230,111	266,747
4	26,308	135,727	296,620	414,671	450,583
5	23,239	50,376	84,074	107,422	128,008
6	49,071	104,449	164,060	209,926	247,047

Considerando-se os resultados das amostras no dia de produção (tempo 0) e a proteólise progressiva que ocorre durante toda a vida útil do leite UAT, pode-se verificar que uma amostra que esteja de acordo com os padrões legais vigentes logo após o processamento pode vir a apresentar resultados em desacordo no decorrer do período de validade sem que ocorra adulteração. Portanto, a detecção de fraude por adição de soro lácteo em leite UAT pode ser detectada tão somente logo após o envase, e não ao longo do prazo de validade do produto. Uma vez que assim, os altos índices de CMP poderiam ser justificados pela qualidade insatisfatória do leite cru, que apresentaria altas contagens de micro-organismos psicrotróficos e consequentemente de proteases extracelulares resistentes ao tratamento térmico que seriam as responsáveis pela proteólise da caseína, formando peptídeos semelhantes ao CMP que seriam identificados como CMP por meio da CLAE.

Souza et al. (2010) pesquisando soro lácteo em leite UAT por meio da determinação do índice de CMP por CLAE, verificaram que as 18 amostras avaliadas estavam conformes com a legislação vigente.

5. CONCLUSÕES

Amostras de leite cru refrigeradas a 6°C podem ser avaliadas em relação ao índice de CMP até quatro dias sem que ocorra prejuízo dos resultados, apresentado valores mais próximos daqueles obtidos pelo leite que não sofreu tratamento.

Amostras de leite pasteurizado conservadas a -12°C podem ser avaliadas em relação ao índice de CMP até oito dias sem que ocorra prejuízo dos resultados, apresentado valores mais próximos daqueles obtidos pela amostra inicial.

A pesquisa do índice de CMP por CLAE é muito precisa (CV=1,9%) e indiferente às condições de armazenamento e teor de CMP das amostras.

Independentemente das temperaturas de armazenamento, observou-se proteólise progressiva durante o período de validade do leite UAT, portanto, um produto conforme pode-se transformar em não conforme, sem que ocorra adulteração.

A detecção de fraude por adição de soro lácteo em leite UAT pode ser detectada tão somente logo após o envase, e não ao longo do prazo de validade do produto.

Caso não seja possível a análise imediata, recomenda-se que as amostras sejam congeladas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, T. C. *Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência – filtração gélica*. 1992. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

AMORIM, H. E. *Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP*. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola de Agrônoma e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

ANDRADE, E. H.; LEITE, M. O.; SILVA, N. M. A. et al. Índice de CMP de amostras de leite cru analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. *XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos*, 2009, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 2009.

ANDRADE, E. H. P. *Qualidade físico-química, microbiológica e detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em bebidas lácteas fermentadas*. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDREATTA, E. Avaliação da qualidade do leite cru utilizado na fabricação de derivados.

Revista Acadêmica Digital do Grupo POLIS Educacional. n.5, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004.

AYALA, A. R.; LEÓN, S. V.; FLORES, G. P. et al. Aplicación de tres métodos analíticos para la detección de suero de quesería en leche UHT comercializada en la ciudad de México. *Asociación Interciencia*, v. 34, n. 6, p. 406-412, 2009.

BABCOCK, C. J.; STROBEL, D. R.; YANGER, R. H. et al. Freezing characteristics of momogenized and unhomogenized milk. *Journal of Dairy Science*. v. 37, p. 1416 – 1419, 1954.

BASTOS, M. S. R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. *Revista Higiene Alimentar*, v. 13, n. 66, p. 32-36, 1999.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

BEHMER, M. L. A. *Tecnologia do Leite*. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1999. 320 p.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. *Revista Cultural e Científica da Universidade Federal de Londrina*, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 12 de setembro de 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.244 de 04 de junho de 1997. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterados pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, e nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 05 de junho de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 13 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de

origem animal e água. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006. (a)

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

BRASIL. Ministério da Justiça. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 46, de 17 de junho de 2008, dispõe sobre a criação do Comitê Gestor de Monitoramento da Qualidade do Leite - CQUALI/Leite com a finalidade de definir estratégias e diretrizes e gerir ações integradas de monitoramento permanente do leite produzido e comercializado no país. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 19 de junho de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Instrução Normativa nº 07, de 02 de março de 2010. Oficializa a determinação de CMP em leite, por HPLC, eletroforese capilar e espectrometria de

massas em leite, em apresentações integrais, semidesnatadas e desnatadas, tratados por processos de UHT ou pasteurização. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 02 de março de 2010.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. et al. Composição. Agência de informação EMBRAPA. 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html> Acessado em: 5 fev. 2010. (a)

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. et al. pH do leite. Agência de informação EMBRAPA. 2005. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_193_21720039246.html> Acessado em: 21 out. 2010. (b)

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCANTRA, L. A. P. et al. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro. *Revista Electrónica de Veterinária*, vol.8, n.6, p. 1-7, 2007. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf>>. Acessado em: 20 jan. 2010.

CASTAIGNE, F.; GOULET, J. Tratamientos y procesos en la industria lechera. In: AMIOT, J. *Ciencia y tecnologia de la leche*. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 159-163.

CHEN, C-mo; YAMAUCHI, K. Change of salt distribution in milk during frozen storage and its partial reversion after thawing. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 33, n. 9, p. 1333-1341, 1969.

COELHO, P. S. J. *Qualidade físico-química e microbiológica de leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte, Minas Gerais*. 2000. 37p. Dissertação (Mestrado em

Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: BRAGA, G.L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 3ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1988.

COSTA, N. O. *Contaminação do leite*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2007. Disponível em: <www.senado.gov.br/sf/.../AP_20071107_MAPA_ContaminacaoLeite.pdf>. Acessado em 12 de agosto de 2010.

CQUALI. Centro Integrado de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos. *Direitos do Consumidor*. 2008. Disponível em: <<http://www.cquali.gov.br/data/Pages/MJ6368FB74ITEMID93F359BA4EAB4B37AB55378AF60C18E4PTBRIE.htm>> Acesso em 12 de agosto de 2010.

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

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

DAIRY HandBook Processing. 2 ed. Lund: Tetra Pack Processing Systems. 2003. 440p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. *Cromatografia: um breve ensaio*. Revista Química Nova. 1998.

DRACZ, S. *Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite*. 1996. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Informações técnicas - Estatística do leite. *Leite me números*. 2008. Disponível em: < <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas.php>>. Acessado em 13 de set. de 2010.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 652p.

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

FARREL JUNIOR, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BROWN, E. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows` milk. *Journal of Dairy Science*, n. 87, p. 1641-1674, 2004.

FELLOWS, P. J. *Tecnologia do processamento de alimentos*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 55-57.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)*, v. 5, 2007.

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

FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk. In: *Advanced Dairy Chemistry:: Proteins*, 1. ed.

London: BlakienAcademic e Professional, 1992. cap. 2, p. 310-320.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 3. ed. London: Blackie Academic e Professional, 1998. caps. 4 e 5, p. 146-264.

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

FUKUDA, S. P. *Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite*. 1994. 142f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M. ; PRATA, L. F. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para detecção da adição de soro ao leite. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, SBCTA, v.16, n.1, p.52-56, 1996.

FUKUDA, S. P. *Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptídeos e caseinomacropéptídeo em leite*. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo prato e minas: estudo do rendimento. *Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v. 34, p. 3-19, 1979

- FURTADO, M. A. M. *Desenvolvimento de método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite pasteurizado*. 1989. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P.M. *Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos*. São Paulo: Dipemar, 1994. p.76-77.
- FURNALETTI, A. M.; PRATA, L. F. Free and total glycomacropeptide (GMP) contents of milk during bovine lactation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 23, p. 121-125, 2003.
- HARJDENWURCEL, J. R. *Atlas de microbiologia de alimentos*. São Paulo: Fonte Comunicação Editora, 1998. cap. 2, p. 22.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial. Avaliação da Conformidade. 2007. 5ed. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/acpq.pdf>>. Acessado em: 08 fev. 2010.
- IDF – International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Brussels: International Dairy Federation, 1995, 8 p.
- IDF – International Dairy Federation. Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. *IDF Standard 141C*. Brussels: International Dairy Federation, 2000, 8 p.
- KEENEY, P. G.; KROGER, M. Frozen dairy products. In: WEBB, B. H. et al. *Fundamentals of dairy chemistry*, 2.ed. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut., 1974. cap. 14, p.873-886.
- KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*. v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.
- MAGALHÃES, M. A. *Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectometria de massa*. 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MOTTAR, J.; Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UHT. *Le Lait*, v.64, p.29-45, 1984.
- MÜLLER-BUSCHBAUM, P.; GEBHARDT, R.; ROTH, S. V. et al. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*. v. 93, n. 3, p. 960–968, 2007.
- LASMAR, M. M. *Detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de leite cru conservadas em bronopol*. 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Enzimas. In: *Princípios de Bioquímica*, 2.ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1995.
- LOPEZ-FANDIÑO, R.; RAMOS, M. Revisión: El caseinmacropéptido bovino. II Detección de la presencia de suero de quesería em productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. v. 33, n. 1, p. 1-12, 1993.

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

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

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

OLIVEIRA, R. R. *Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo para a detecção do caseinomacropéptido em leite UAT*. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

PAIVA, C. A. V. *Efeito da produção e da sazonalidade sobre a qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais*. 2010. 72p. (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PAIVA, R. M. B. *Avaliação físico-química e microbiológica de leite pasteurizado tipo C distribuído em programa social governamental*. 2007. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola

de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

POMERANZE, Y; MELOAN, C. E. High performance liquid chromatography and ion chromatography. In: *Food analysis-theory and practice*. 3 ed. New York: Chapman e Hall. p. 332-334.

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D. B. Enzimas. In: FENNEMA, O. R. *Química de los alimentos*, 1993. p. 415-536.

RIEL, R. Composición y estructura físico-química de la leche. In: AMIOT, J. *Ciencia y tecnología de la leche – Principios y aplicaciones*. Saragoza: Acribia, 1991. p. 1-55.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; MARTINS, A. M. C. V.; SALOTTI, B. M. et al. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2006.

ROSSI, R. M. Importância da conformidade. In: CAMPOS, E.M.; NEVES, M.F. *Planejamento e gestão estratégica do sistema agroindustrial do leite no estado de São Paulo*. São Paulo: SEBRAE, 2008. 368p.

SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada a experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.
- SANTOS, M. V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos. In: Brito, J. R. F.; *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora, 2003, v. 1, p. 139 – 149.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotóxicas e a qualidade do leite. *Revista CBQL*, v. 19, p. 12-15, 2003.
- SANTOS, M. V. *Contagem de psicrotófico influencia na vida de prateleira do leite UAT*. Radar Técnico - Qualidade do leite. 2007. Disponível em: <http://wm.agripoint.com.br/imagens/banco/MilkPoint/MilkPoint_Radar_Qualidade_2007_0320.pdf>. Acessado em: 02 fev. 2010.
- SANVIDO, G. B. *Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira*. 2007. 94p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology*. v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.
- SILVA, J. A. *Tópicos da tecnologia dos alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 325p.
- SING, H.; CREAMER, L. K. Heat stability of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*, 1 ed. London: BlakienAcademic e Professional, 1992. cap. 2, p. 621- 656.
- SIOUFFI, A. M. HPLC. In: *Food analysis by HPLC*. New York: Marcel Dekker, 1992. cap. 1, p. 1-52.
- SIQUEIRA, I. M. C. *Avaliação da qualidade microbiológica de quatro tipos de soro de queijo*. 2000. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SOUZA, M. I. A.; SILVA, C. H.; MORAIS, P. C. et al. Pesquisa de soro em leite determinando caseinomacropéptido (CMP) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). *Anais... IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite*. Florianópolis, 2010.
- SPREER, E. *Lactología industrial*. Zaragoza: Acribia, 1991. p.117-118.
- SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P.F. *Advanced Dairy Chemistry – 1: Proteins*, 1 ed. London: BlakienAcademic e Professional, 1992. cap. 2, p. 63-110.
- TULLOCH, D.; CHENEY, M. Keeping quality of Western Australian frozen milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 39, n. 2, p. 85, 1984.
- VAN DEN BERG, L. Change in pH of milk during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Science*, p. 26-31, 1961.
- VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B.; ROSSI JUNIOR, O. D.; et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciência e Tecnologia de*

Alimentos, Campinas, v. 25, p. 698-704, 2005.

VIEGAS, R. P.; RESENDE, M. F. S.; CALDEIRA, L. A. et al. Avaliação da qualidade físico-química do leite UAT desnatado comercializado em Belo Horizonte – MG. *Congresso Nacional de Laticínios*, n 351, 2006, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2006. vol. 61.
WALSTRA, P.; JENNES, R. Química e física lactológica. Zaragoza: Editorial Acribia, 1987. cap. 17, p. 282-283.

WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *Journal Biological Chemistry*, v. 234, 1959.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Adição de soro ao leite em pó-métodos de detecção. *Revista do ILCT*, v. 39, n. 234, p. 3-10, 1984.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; PINTO, A. P. E. F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 5, n. 2, p. 11-115, 1985.

ANEXOS

Anexo I - Requisitos físicos e químicos de leite cru refrigerado

Requisitos	Limites	Métodos de Análise ⁽¹⁾
Matéria gorda (g/100 g)	mín. 3,0 ⁽²⁾	FIL 1 C:1987
Densidade relativa a 15/15°C (g/mL) ⁽³⁾	1,028 a 1,034	LANARA/MA, 1981
Acidez titulável (g ácido láctico/100mL)	0,14 a 0,18	LANARA/MA, 1981
Extrato seco desengordurado (g/100 g)	mín. 8,4	FIL 21B: 1987
Índice Crioscópico Máximo	- 0,530°H (equivalente a - 0,512°C)	FIL 108 A: 1969
Proteínas (g/100g)	mín. 2,9	FIL 20 B: 1993

Nota nº (1): todos os métodos estabelecidos acima são métodos de referência, podendo ser utilizados outros métodos de controle operacional, desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência.

Nota nº (2): é proibida a realização de padronização ou desnate na propriedade rural.

Nota nº (3): dispensada a realização quando o ESD for determinado eletronicamente.

Fonte: Brasil (2002)

Anexo II - Requisitos microbiológicos, Contagem de células somáticas, e resíduos químicos
Requisitos físicos e químicos de leite cru refrigerado avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite na região sudeste

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01.7. 2008 Até 01.7. 2011
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses) Método FIL 100 B: 1991	Máximo de $7,5 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses) Método FIL 148 A : 1995	Máximo de $7,5 \times 10^5$
Pesquisa de Resíduos de Antibióticos/outras Inibidores do crescimento microbiano: Limites Máximos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos - MAPA	
Temperatura máxima de conservação do leite: 7°C na propriedade rural /Tanque comunitário e 10°C no estabelecimento processador.	
Fonte: Brasil, (2002)	

Anexo III - Critérios de avaliação da qualidade do leite in natura

Índice de CMP (mg/L)	Destino
Até 30	Abastecimento direto
Entre 30 e 75	Produção de derivados lácteos avaliados tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA)
Acima de 75	Alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo DIPOA.

Fonte: Brasil, (2006)

Anexo IV - Características microbiológicas de leite pasteurizado

Requisitos	Tolerância para amostra representativa	Método de Análise
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	$n = 5; c = 2; m = 4,0 \times 10^4; M = 8,0 \times 10^4$	CLA/DDA/SDA/MA, 1993
Coliformes, NMP/mL (30/35°C)	$n = 5; c = 2; m = 2; M = 4$	CLA/DDA/SDA/MA, 1993
Coliformes, NMP/ mL (45°C)	$n = 5; c = 1; m = 1; M = 2$	CLA/DDA/SDA/MA, 1993
Salmonella spp/25mL	$n = 5; c = 0; m =$ ausência.	CLA/DDA/SDA/MA, 1993

Fonte: Brasil, (2002)

