

Mariana Coelly Modesto Santos

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PREDITIVO PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE PERDA DE ESTABILIDADE E  
OCORRÊNCIA DE PROTEÓLISE EM LEITE UAT**

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

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

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária | UFMG  
2015**

Santos, Mariana Coelly Modesto, 1985 –

S237d      Desenvolvimento de um modelo preditivo para identificação de perda de estabilidade e ocorrência de proteólise em leite UAT/ Mariana Coelly Modesto Santos – 2015.

51 p. :il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

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

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Espectrofotometria – Teses.  
I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 637

## FOLHA DE APROVAÇÃO


**MARIANA COELLY MODESTO SANTOS**

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Presidente - Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Mônica de Oliveira Leite  
Prefeitura Municipal de Belo Horizonte - SMSA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Simeão do Carmo  
Fundação Ezequiel Dias



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos da minha vida.

À minha mãe por ter me ensinado grandes valores e por ser meu exemplo de garra e persistência.

Ao Mauro, pela paciência, reciprocidade do amor e pela cumplicidade de que os sonhos e conquistas podem e devem ser construídos juntos.

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Mônica Cerqueira pela oportunidade, por me fazer crescer de maneira pessoal e profissional, através de seus ensinamentos e sua inigualável postura de humildade, comprometimento e amizade.

Ao Sr. Peter Bosch pela credibilidade depositada em mim e pela anuência deste sonho.

Aos membros da banca, Prof<sup>o</sup> Mônica de Oliveira Leite e ao Dr. Luiz Simeão pela disponibilidade e contribuição à Dissertação.

Aos professores da Escola de Veterinária, Cláudia Penna, Marcelo Rezende, Marcos Xavier, Mônica Leite, Roberto Guedes e Soraia Diniz pelo genuíno apoio em colaborar e me ensinar.

Aos colaboradores do DTIPOA e do Colegiado de pós-graduação em Ciência Animal da EV-UFGM, em especial à Maura e Luzete, por toda colaboração.

À Aline Balbinoto, Beatriz Bortoli, Fabiana Comin, Gabriela Vieira, Kellen Spinardi e Tiago Olegário, agradeço imensamente pela dedicação e comprometimento na realização deste trabalho.

Aos colegas Mestrandos, Anna Carolina, Felipe, Lorrana, Otaviano e Renata, pela amizade e apoio durante esta desafiadora jornada.

Por fim, com muita gratidão dedico esta imensa conquista a todos que, de alguma forma, acreditaram e contribuíram para a realização deste grande sonho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Leite <i>in natura</i> .....	15
2.2 Leite UAT .....	18
2.3 Micro-organismos psicrotróficos .....	20
2.4 Proteólise.....	22
2.5 Estimativa de custos por perdas na indústria de laticínios .....	24
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Amostragem .....	27
4.2 Preparo de soluções para análise de atividade enzimática de aminopeptidase no leite.....	28
4.2.1 Solução clarificante .....	28
4.2.2 Solução 1000 ppm de cloreto de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ) .....	29
4.2.3 Tampão Tris HCl.....	29
4.2.4 Solução de Substrato .....	29
4.2.5 Solução ácido acético .....	29
4.2.6 Solução nitrito de sódio.....	29
4.2.7 Solução de sulfamato de amônio.....	29
4.2.8 Solução <i>n</i> -(1-naftil)-etilenodiamino .....	30
4.2.9 Solução de calibração da curva padrão .....	30
4.3 Determinações Analíticas.....	30
4.3.1 Grau de Proteólise no Leite Cru .....	30
4.3.2 Grau de proteólise de leite UAT.....	32
4.4 Contagem de psicrotróficos.....	36
4.4.1 Técnica para contagem de psicrotróficos .....	36
4.4.2 Leitura das placas de psicrotróficos .....	37
4.5 Análises Estatísticas .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
ANEXO 1 - CUSTOS DOS REAGENTES UTILIZADOS NA METODOLOGIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMINOPEPTIDASE .....	51

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Consumo histórico de leite, em litros, per capita no Brasil, 2007 a 2014 .....	12
Tabela 2: Segmentação do mercado leite por volume, em bilhões de litros .....	13
Tabela 3: Estimativa de gastos (U\$) pela população brasileira no mercado de leite .....	15
Tabela 4: Composição do leite de vaca.....	15
Tabela 5: Tipo e concentração das proteínas presentes no leite de vaca.....	16
Tabela 6: Parâmetros mínimos de qualidade do leite UAT exigidos pelo MAPA.....	19
Tabela 7: Classificação dos micro-organismos de acordo com sua temperatura ótima de crescimento .....	21
Tabela 8: Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos avaliados em leite cru e pasteurizado para cada grupo de UAT conforme e não-conforme.....	38
Tabela 9: Correlação entre parâmetros físico-químicos, contagem de psicotróficos e leitura de atividade de aminopeptidase no leite cru e pasteurizado .....	39
Tabela 10: Índice de conformidade segundo análise sensorial por tipo de leite UAT .....	40
Tabela 11: Contagem média de psicotróficos por escala sensorial de classificação do leite UAT .....	41

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Projeção da produção e consumo de leite no Brasil entre os anos de 2013 a 2024. ....	12
Figura 2: Representação ilustrativa de uma micela de caseína. ....	17
Figura 3: Camadas da embalagem cartonada UAT.....	20
Figura 4: Desnaturação da k-caseína e formação do coágulo. ....	23
Figura 5: Reação química catalisada pela Alanina Aminopeptidase - AAP. ....	25
Figura 6: Fluxograma geral da fase experimental e execução dos ensaios analíticos.....	26
Figura 7: Esquema representativo do fluxo de coleta das amostras.....	28
Figura 8: Representação esquemática do ensaio de aminopeptidase para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru.....	32
Figura 9: Padrão de abertura de embalagem de leite UAT para análise sensorial. ....	34
Figura 10: Padrão de Cor e Textura aparente em leite UAT integral, semi-desnatado e desnatado.....	35
Figura 11: Programação das análises sensoriais de leite UAT estocado em diferentes tempos..	36
Figura 12: Percentual de conformidade do leite UAT estocado em diferentes tempos. ....	39
Figura 13: Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicotróficos de leites cru e tempo de análise de leite UAT correspondente.....	42
Figura 14: Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicotróficos de leites cru e tempo de análise de leite UAT correspondente, em que foi observada a primeira alteração sensorial para os diferentes tipos de leite.....	43



---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1: Descrição do padrão sensorial para os leites integral, semi-desnatado e desnatado ..	33
Quadro 2: Escore para classificação sensorial de Leite UAT .....	35

## RESUMO

Esse trabalho se propôs a desenvolver um modelo preditivo para identificação de perda de estabilidade e de sedimentação em leite UAT por determinação da atividade enzimática de aminopeptidase no leite por espectrofotometria. Foram analisadas amostras de leite cru, pasteurizado e UAT após envase durante 6 meses, na região Sul do Brasil. Acidez, crioscopia, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado e densidade foram analisados no leite cru e pasteurizado. Amostras de leite cru foram ainda submetidas a análise de contagem de psicrotóxicos e atividade de aminopeptidase, e amostras de leite UAT estocadas foram analisadas quanto ao grau de proteólise através de análises sensoriais e atividade de aminopeptidase. Alterações sensoriais foram observadas em tempos de estocagem menores para amostras originadas de leite cru com contagem de psicrotóxicos acima de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>. Não houve correlação entre a atividade de aminopeptidase e proteólise e também não foi observada correlação significativa entre os parâmetros físico-químicos e a ocorrência de proteólise no leite estocado. O modelo estudado não foi apto para prever perda de estabilidade e ocorrência de proteólise no leite UAT.

Palavras chave: leite; qualidade; proteólise; UAT

## ABSTRACT

The aim of this work was to develop a predictive model for identifying loss of stability and sedimentation in UHT milk by determining the enzymatic activity of aminopeptidasis in milk by spectrophotometry. Were analyzed samples of raw milk, pasteurized and UHT after filling for 6 months in Southern Brazil. Acidity, freezing point, fat, total solids, nonfat solids and density were analyzed in raw and pasteurized milk. Of raw milk samples were also subjected to psychrotrophic count analysis and aminopeptidasis activity and UAT samples stored milk were analyzed for degree of proteolysis through sensory analysis and aminopeptidasis activity. Sensory changes were observed in smaller storage time for samples of raw milk originated with psychrotrophic count above  $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>. There was no correlation between aminopeptidasis activity and proteolysis and was also no significant correlation between physicochemical parameters and the occurrence of proteolysis in stored milk. The model was unable to predict loss of stability and occurrence of proteolysis in UHT milk.

Keywords: milk, quality, proteolysis, UHT

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a produção de leite no mundo aumentou mais de 50%, chegando a 754 milhões de toneladas, em 2012. O Brasil, com uma produção de aproximadamente de 33 bilhões de litros por ano é o terceiro maior produtor de leite do mundo, ficando abaixo apenas dos Estados Unidos, em segundo lugar, e da Índia que detém o primeiro lugar com uma parcela de 16% do volume total de produção (FAO, 2014). Apesar da crescente produção a cada ano, a tabela 1 mostra que o consumo de leite no Brasil, com 163,5 litros por pessoa por ano (MINTEL, 2014), está abaixo do recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é de 250 litros por pessoa por ano.

Tabela 1: Consumo histórico de leite, em litros, per capita no Brasil, 2007 a 2014

Parâmetros	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Produção (bilhões L)	27,7	28,3	29,1	30,0	30,8	31,5	32,4	33,2
Consumo (L)	146,4	147,7	150,3	153,2	156,3	158,1	161,2	163,5
Crescimento (%)		2,0	2,8	3,0	3,0	2,1	2,8	2,3

Fonte: Relatório Leite Brasil – Tamanho de Mercado, Mintel (2014)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2014) estima que a produção e o consumo de leite brasileiro deverão crescer em uma taxa anual de 2,6% a 3,4% e 2,4% a 3,3% respectivamente, conforme projeções para o cenário do Agronegócio Brasileiro 2020/2023 (Figura 1).

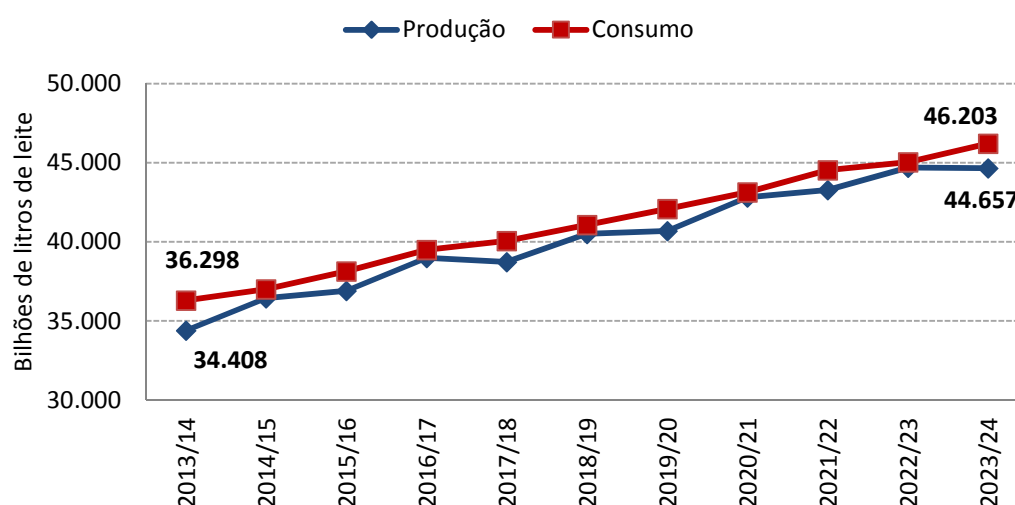


Figura 1: Projeção da produção e consumo de leite no Brasil entre os anos de 2013 a 2024.  
Fonte: Adaptado de Projeções do Agronegócio Brasileiro, Brasil (2014)

Entretanto, de acordo com a Assessoria Estratégica de Gestão do MAPA (Brasil, 2014), um fator relevante que impede o país de atingir mercados mais exigentes é a qualidade questionável do produto lácteo brasileiro. Aspectos que se referem à qualidade do leite estão, cada vez mais, ganhando interesse, entre os consumidores, especialmente aqueles relacionados com a saúde humana e tem sido um grande entrave na relação entre produtores, indústrias e consumidores.

Na tabela 2, observa-se que, em média, 25% do mercado de leite é representado pelo segmento varejista, com cerca de 8 bilhões de litros de leite em 2014. Entre 2011 e 2014, a média de crescimento foi cerca de 7,8% ao ano. Entende-se por varejo, o mercado que abrange leite líquido, em pó e leite pasteurizado de vaca. Seu tamanho se estende às vendas por canais de varejo, tais como hipermercados, supermercados e mercearias que realizam vendas diretas ao consumidor. Nos últimos quatro anos, em média, 78,8% (6,07 bilhões de litros) deste segmento foram representados pelos leites fluidos, com destaque para o leite UAT com 78,3% (4,73 bilhões de litros) deste volume (Mintel, 2014).

Tabela 2: Segmentação do mercado leite por volume, em bilhões de litros

Segmento	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Varejo	7,31	7,09	7,17	7,41	7,59	7,91	7,92	8,08
Outros	20,43	21,20	21,91	22,54	23,26	23,59	24,47	25,07
Total	27,7	28,3	29,1	30,0	30,8	31,5	32,4	33,2

Fonte: Relatório Leite Brasil - Segmentos do mercado, Mintel (2014)

Segundo a Fundação Procon do Estado de São Paulo – PROCONSP (2013), em 2013, o segmento de leite estava entre os destaques de procedimentos de *recall* deste mesmo ano. Em 2014, o Estado do Rio de Janeiro vetou a comercialização de três empresas beneficiadoras de leite, alegando que o produto estaria impróprio para consumo (PROCONRJ, 2014).

As limitações tecnológicas relacionadas à falta de estabilidade térmica têm dificultado a melhoria da qualidade de produtos lácteos e o aumento da vida de prateleira (Silva, 2004). A proteólise no leite UAT (Ultra Alta Temperatura) durante o armazenamento é um exemplo comum de redução da estabilidade, devido à formação de sedimento (precipitação de minerais), configurando assim um problema de qualidade e a rejeição deste produto por parte do consumidor (Vesconsi *et. al.*, 2012).

De acordo com Gigante (2004) e Vidal-Martins *et al.* (2005), este problema pode ser causado por enzimas termoestáveis produzidas por cepas de micro-organismos psicrotróficos que permanecem ativas mesmo após o processamento térmico em alta temperatura. Em ação sinérgica com a plasmina (enzima naturalmente presente no leite), estas enzimas ocasionam a hidrólise das caseínas, durante o período de estocagem do leite, também chamado de *shelf-life* (Corassin *et al.*, 2010).

A geleificação, também considerado um problema constante na indústria de lácteos, determina o desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis, assim como alterações na viscosidade, com espessamento do produto, podendo culminar na formação de gel, sem separação de soro, na maioria dos casos (Harwalkar, 1997 e Silva, 2004).

Nicolaou *et al.* (2010) concluíram que as determinações analíticas da qualidade do leite, por métodos tradicionais, além de serem lentas e caras, têm sido consideradas por muitos estudiosos como pouco práticas e laboriosas para uso na triagem de leite de rotina pela indústria leiteira.

Neste contexto, faz-se necessário diagnosticar procedimentos de ensaio os quais a indústria láctea possa utilizar para prever a probabilidade de ocorrência das limitações citadas acima, antes do processamento da matéria-prima leite, para que a indústria leiteira atenda as exigências, e satisfaça o mercado consumidor.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O aumento da renda da população brasileira e mundial tem favorecido o consumo de produtos lácteos (MAPA, 2014). Segundo a análise dos dados de mercado (Mintel, 2014), o brasileiro teve em média, nos últimos quatro anos, um gasto de U\$ 1,07 por litro de leite consumido e no mesmo período, um desembolso médio de U\$ 41,97 por habitante ao ano (Tabela 3). Além do aumento no consumo, a população está cada vez mais exigente no que se refere à qualidade do leite e de seus subprodutos, exigindo um alimento seguro, ou seja, com adequado valor nutricional e sem riscos à saúde.

Tabela 3: Estimativa de gastos (U\$) pela população brasileira no mercado de leite

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Gasto Brasil (bU\$/população)	7,57	8,68	8,42	8,48	8,66	9,16	10,02	10,77	11,63
Gasto (U\$/hab)	38,73	43,97	42,28	42,19	42,70	44,77	48,62	51,85	55,57
Preço (U\$/L)	1,02	1,14	1,06	1,07	1,07	1,11	1,19	1,26	1,33

Fonte: Relatório Leite Brasil - Segmentos do mercado, Mintel (2014)

Apesar deste aumento de consumo, a qualidade do leite *in natura* continua sendo um grande entrave na relação entre produtores, indústrias e consumidores. O produtor almeja maior produtividade e melhor preço de pagamento; a indústria exige alto rendimento industrial, vida de prateleira extensa e garantia das características sensoriais do produto final. Já os consumidores, exigem produtos saborosos e principalmente com qualidade assegurada, como comentado anteriormente.

## 2.1 Leite *in natura*

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite é um alimento de valor nutritivo inestimável e que, para manter seu padrão de qualidade, requer um processo de conservação e envase bastante complexo (Torres, 2010).

O leite é uma combinação de diversos sólidos em água. Os sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87% (EMBRAPA, 2014). O leite de vaca possui, em média, 87,4% de água, 3,9 g de gordura, 3,2 g de proteína, 4,6g de lactose e 0,9 g de minerais e outros sólidos por 100 g de leite (Tabela 4) (Harding, 1995).

Tabela 4: Composição do leite de vaca

Componentes	Teor (%)
Água	87,4%
Sólidos Totais (ST)	12,6%
Gordura	3,90%
Proteína	3,20%
Lactose	4,60%
Minerais	0,90%

Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2014)

Os principais sólidos do leite são glicídios (açúcares), lipídios (gorduras), protídeos (proteínas), sais minerais e diversos minerais (potássio, cálcio, sódio, magnésio, zinco e ferro), além de compostos orgânicos (enzimas e vitaminas A, E, B1, B2, C e D). A nomenclatura “sólidos totais (ST)” ou “extrato seco total (EST)” engloba todos os componentes do leite com exceção da água. Por sólidos não gordurosos (SNG) ou extrato seco desengordurado (ESD), compreendem-se todos os elementos do leite, menos a água e a gordura. Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é bastante estável.

As proteínas representam entre 3 a 4% dos ST. Conforme a tabela 5, 20% das proteínas do leite são compostas por proteínas do soro, tais como  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, e cerca de 80% desta fração, é representada pela caseína, principal proteína do leite por seu alto valor nutricional e sua importância tecnológica na fabricação de queijos.

Tabela 5: Tipo e concentração das proteínas presentes no leite de vaca

<b>Caseína Total</b>	<b>79,5%</b>
$\alpha_{s1}$ -caseína	30,6%
$\alpha_{s2}$ -caseína	8,0%
$\beta$ -caseína	30,8%
$\kappa$ -caseína	10,1%
<b>Proteínas do Soro Total</b>	<b>20,2%</b>
$\alpha$ -lactoalbumina	3,7%
$\beta$ -lactoglobulina	9,8%
Sero-albumina	1,2%
Imunoglobulinas	2,1%
Demais proteínas	3,4%

Fonte: Adaptado de Fernandes *et. al.*, (2012)

A caseína bovina pode ser classificada em quatro tipos de proteínas com diferentes propriedades:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - caseína e  $\kappa$ -caseína, respectivamente 30,6%, 8,0%, 30,8% e 10,1% do total da caseína (Fernandes *et al.*, 2012). Cerca de 95% da caseína encontram-se organizadas na forma de micela, um agrupamento formado por moléculas de caseína, junto com cálcio, fósforo e outros sais, conforme ilustrado na figura 2.



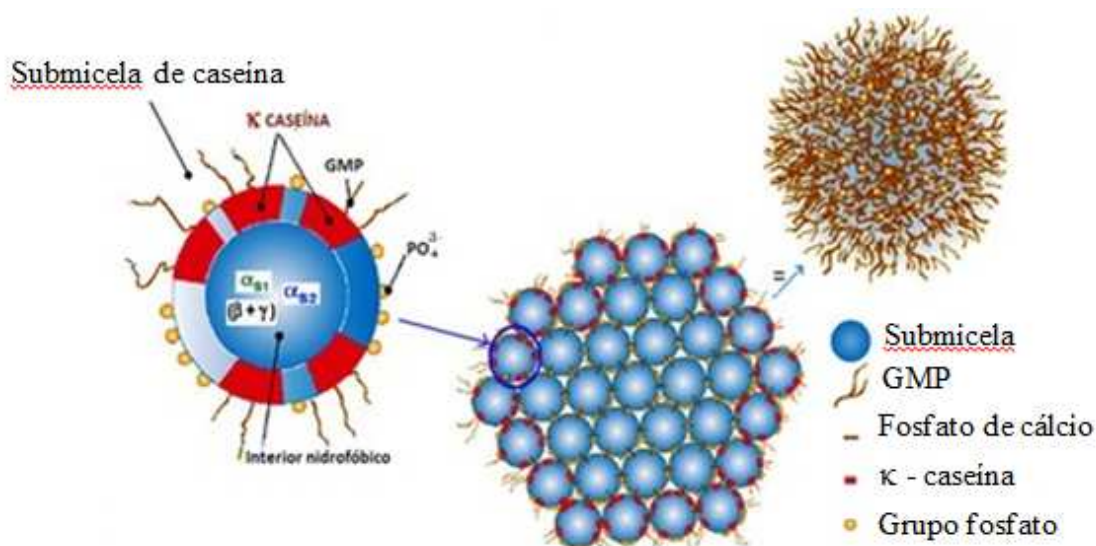


Figura 2: Representação ilustrativa de uma micela de caseína.

Fonte: Adaptado de Tetra Pak, Dairy Processing Hand book (1996)

As micelas de caseínas são compostas por partículas coloidais imersas no leite, com formato arredondado e tamanho médio de 200 nm. Segundo Walstra (1990), a  $\kappa$ -caseína localiza-se na região externa das micelas de caseína, sendo responsável pela estabilização do leite frente aos tratamentos térmicos.

Considerando as propriedades físico-químicas do leite, os principais critérios utilizados para caracterizá-las, de acordo com Fonseca e Santos (2000) são: densidade, crioscopia pH e acidez titulável.

O leite é um excelente meio para o crescimento de micro-organismos, especialmente bactérias que podem causar a deterioração do produto e ainda, levar a casos de infecção (pela presença do micro-organismo) ou intoxicação alimentar (por toxinas microbianas) (FAO, 2014). Micro-organismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *S. Paratyphi*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, podem gerar quadros clínicos com náuseas, cefaleia, vômitos, diarreia, desidratação e prostração, até quadros mais graves como septicemia e morte (Forsythe, 2002).

A carga microbiana presente no leite cru pode variar de acordo com as estações do ano, as práticas de produção e manejo na propriedade rural, a localização geográfica, a temperatura de

armazenamento do leite cru e a distância para o transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento (Silveira *et al.*, 2000 e Vidal-Martins *et al.*, 2005).

De acordo com o tipo de tratamento térmico utilizado, o leite pode ser classificado como pasteurizado ou UAT. O emprego do calor é um dos métodos mais antigos utilizados para a conservação de alimentos. Atualmente, no caso específico do leite, um dos processos que tem se destacado na indústria de laticínios é o emprego do processo “Ultra-High-Temperature” (UHT) ou Ultra-Alta Temperatura (UAT) (Cunha, 2001).

## 2.2 Leite UAT

Historicamente, somente no início da década de 50, o leite UAT foi produzido em escala industrial. Em 1951, Bloomberg & Hessey, citados por Cunha (2001), foram um dos primeiros a descrever o processo de produção de leite UHT. Neste processo, o leite era submetido à temperatura de 140,5 °C, durante oito segundos em tubos preaquecidos, sob fluxo contínuo e acondicionado assepticamente em latas.

Apresentada ao país em 1972, a tecnologia que prolonga a vida do leite dispensa qualquer utilização de conservante e preserva as qualidades naturais do produto. O leite UAT desde então, consagrou-se como uma alternativa altamente segura e confiável para o consumo de leite no Brasil.

Entende-se por leite UAT ou UHT ou também chamado de longa-vida, o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, à temperatura entre 130°C e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 1996).

Conforme Lewis, 1986 e Sá & Barbosa, 1990, citados por Cunha (2001), o processo UAT pode ser realizado por dois sistemas: o sistema direto, em que a esterilização do produto é obtida pela ação do calor proveniente de injeção direta de vapor e o sistema indireto, no qual se utiliza o mesmo princípio de permutação de calor por placas, como na pasteurização, ou seja, o leite é aquecido pelo calor proveniente de dispositivos metálicos (placas ou tubos) condutores de energia calorífica.

Como denominação de venda, o MAPA considera leite UAT integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado ou desnatado de acordo com a classificação dos parâmetros mínimos de qualidade, conforme tabela 6 (Brasil, 1996).

Tabela 6: Parâmetros mínimos de qualidade do leite UAT exigidos pelo MAPA

<b>Requisitos</b>	<b>Leite Integral</b>	<b>Leite Semi ou Parcialmente desnatado</b>	<b>Leite Desnatado</b>	<b>Métodos de Análise</b>
Matéria Gorda	Min. 3,0	0,6 a 2,9	Máx. de 0,5	FIL C 1987
Acidez g ac. Lático/100ml	0,14 a 0,18		0,14 a 0,18	AOAC 15 <sup>a</sup> ed, 947.05
Estabilidade ao etanol 68% (v/v)	Estável	Estável	Estável	FIL 48 1969
Extrato seco desengordurado % (m/m)	Min. 8,2	Min. 8,3	Min. 8,4	FIL 21B 1987

Fonte: Brasil (1996)

De acordo com IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013), em 2011, a categoria de leite longa vida foi responsável pelo crescimento de 4,2% do mercado total de consumo do alimento. Segundo dados da Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV, 2014), a participação de mercado do produto que era de 4,4% em 1990, alcançou 78,2% em 2011.

A participação elevada de leite UAT na comercialização de leites fluidos no Brasil segundo Torres (2010) deve-se, principalmente, à sua praticidade e maior vida de prateleira proporcionada pela tecnologia UAT, ao processo de envase asséptico e ao uso de embalagens cartonadas hermeticamente fechadas, que impede a entrada de luz e oxigênio (Figura 3).

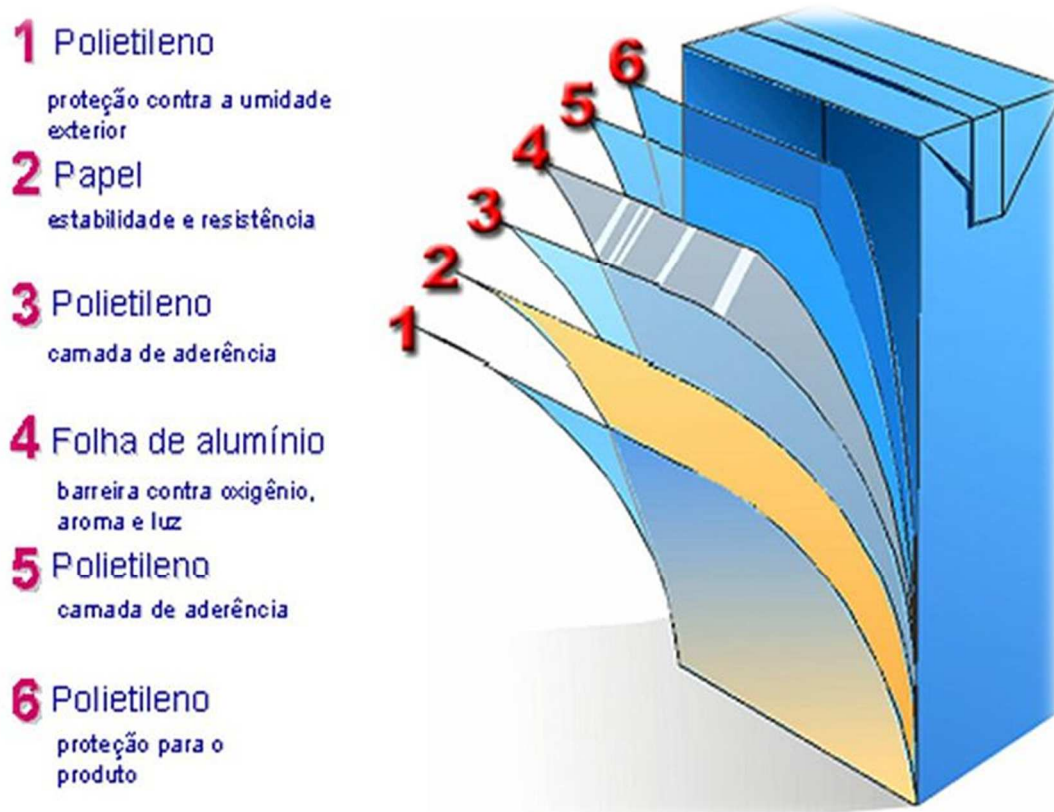


Figura 3: Camadas da embalagem cartonada UAT.

Fonte: Tetra Pak, Dairy Processing Hand book (1996)

Entretanto, o leite UAT está sujeito a outros problemas que não são observados no leite pasteurizado tais como a sedimentação e a geleificação (SILVA, 2004; SANTOS, *et al.*, 2006).

A preocupação com a produção de leite de qualidade no país não é recente. As últimas tentativas desse movimento são retratadas pelas Instruções Normativas nº 51/2002 e nº 62/2011, que estabeleceram prazos e padrões de qualidade para o leite a ser comercializado, com recolhimento mensal de amostras de leite cru refrigerado de cada propriedade rural fornecedora dos estabelecimentos sob SIF – Sistema de Inspeção Federal (Brasil, 2014).

Neste contexto, faz-se obrigatório o cumprimento legal das normas e exigências de análises dos produtos de origem animal (Brasil, 2002; Brasil, 2003 e Brasil, 2011).

### 2.3 Micro-organismos psicrotróficos

Bactérias psicrotróficas pertencem a diversos gêneros que podem se multiplicar em temperaturas baixas, mas a sua temperatura ótima de crescimento pode variar. Muitas são mesófilas e crescem mais lentamente a temperaturas mais baixas. Segundo Griffiths (2010), do ponto de vista da qualidade do leite, as bactérias psicrotróficas são o grupo que mais contribui para deterioração do leite e produtos lácteos.

Conceitualmente, os micro-organismos são classificados de acordo com sua temperatura ótima de crescimento (tabela 7). As bactérias psicrotróficas são aquelas capazes de se desenvolver em temperaturas abaixo de 7°C, independente de sua temperatura ótima de crescimento (Frank *et al.*, 1992; Arcuri *et.al*, 2008). Esses micro-organismos dominam a microbiota do leite cru refrigerado (Manzano *et al.*, 2005).

Tabela 7: Classificação dos micro-organismos de acordo com sua temperatura ótima de crescimento

Micro-organismos	Temperatura ótima de crescimento (°C)
Termófilos	55 a 75
Mesófilos	30 a 45
Psicrotróficos	25 a 30
Psicrófilos	12 a 15

Fonte: Frank *et al.*, (1992); Arcuri *et al*, (2008)

De acordo com a EMBRAPA (2014), os principais gêneros de bactérias psicrotróficas que contaminam o leite são não-patogênicos, como, por exemplo, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*. Entretanto, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* são bactérias psicrotróficas associadas com intoxicações alimentares após consumo de leite ou produtos lácteos.

O número de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção e ao binômio tempo - temperatura em que o leite é armazenado. Desta forma, segundo Fonseca & Santos (2000), bactérias predominam em situações em que há deficiência de higiene na ordenha, problemas de limpeza e sanitização do equipamento de ordenha, quando ocorre resfriamento marginal do leite ou quando o tempo de estocagem é muito longo. Quando as condições de higiene da produção de leite são boas, a contagem de bactérias psicrotróficas é baixa, mas, se as condições forem ruins, estas podem corresponder a 75% ou mais do total da população bacteriana (EMBRAPA, 2014).

Segundo Manzano *et al.* (2005), o grupo psicotrófico inclui uma diversidade de gêneros bacterianos, com predominância do gênero Gram-negativo *Pseudomonas*. A maioria destas bactérias não sobrevive aos tratamentos térmicos aplicados ao leite durante o processamento normal. No entanto, durante seu crescimento no leite cru, estes micro-organismos produzem enzimas termo-resistentes (proteases e as lipases extracelulares), que se mantêm íntegras e ativas após o tratamento térmico (Izidoro, 2013).

Considerados como os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado e de seus derivados, Arcuri *et al.* (2008) afirmam que como principais problemas ou defeitos atribuídos a este gênero, podem ser citados: aparecimento de ranço, sabor amargo, sabor de fruta, geleificação em leite UHT, além de instabilidade térmica do leite.

Assim, uma contagem baixa de psicotróficos no leite é de fundamental importância para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses micro-organismos resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que limitam a vida de prateleira dos produtos lácteos (Arcuri *et al.*, 2008) e causam rejeição por parte da indústria e do consumidor.

## 2.4 Proteólise

Conceitualmente, a proteólise está associada à quebra da caseína por ação de proteases bacterianas, comumente, produzidas por bactérias psicotróficas contaminantes do leite cru (Datta *et al.*, 2003).

A atividade psicotrófica - proteolítica se expressa, principalmente, sobre as caseínas (Gebre-Egziabher *et al.*, 1980), mais especificamente sobre as porções glicolisadas e hidrofílicas da k-caseína. A caseína não é facilmente alterada pelo calor, permanecendo bastante estável quando o leite é pasteurizado. Entretanto, quando ocorrem mudanças na acidez do leite, há rompimento da estrutura das micelas, o que faz a caseína precipitar e formar coágulos (Figura 4).

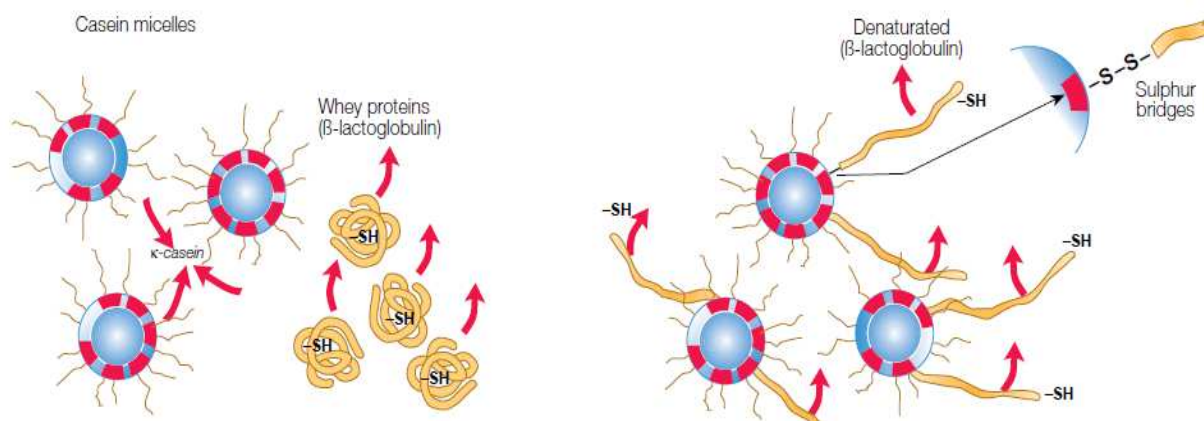


Figura 4: Desnaturação da  $\kappa$ -caseína e formação do coágulo.

Fonte: Adaptado de Tetra Pak, Dairy Processing Handbook (1996)

As enzimas responsáveis pela proteólise são, em ação sinérgica, a plasmina (proteinase alcalina nativa do leite, análoga à enzima sérica do soro sanguíneo bovino) e proteinases extracelulares bacterianas, produzidas por bactérias psicrotróficas. A proteólise originária da plasmina perfaz aproximadamente 90% da proteólise total (Barry & Donnelly, 1981; Corassin *et al.*, 2010).

Proteinases extracelulares e a plasmina reagem diferentemente com as proteínas do leite e produzem diferentes peptídeos no leite UAT (Harwalkar, 1997; Gigante, 2004; Silva, 2004; Vidal-Martins *et al.*, 2005). As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a  $\kappa$ -caseína, o que resulta na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite, de forma análoga à quimosina, enzima empregada na coagulação enzimática para obtenção do queijo. Já a plasmina, hidrolisa principalmente a  $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína e, em menor extensão,  $\alpha_{s1}$ -caseína, enquanto a  $\kappa$ -caseína é resistente (Corassin *et al.*, 2013). De acordo com o Chen *et al.* (2003), o efeito direto desta reação proteolítica é o aparecimento de sabor amargo no leite devido ao acúmulo de peptídeos e de aminoácidos, especialmente tirosina. Segundo Datta *et al.* (2003), diversos fatores influenciam o aparecimento da geleificação, tais como o modo e intensidade do tratamento térmico; fatores de produção de leite; qualidade microbiológica do leite cru; temperatura de armazenamento; aditivos e/ou teor de gordura, o que torna um limitador da vida de prateleira do produto UAT devido as mudanças em seu sabor e textura citados anteriormente (aumento na viscosidade e formação de gel).

Já a sedimentação pode ser entendida como a perda da estabilidade proteica do leite submetido a tratamentos térmicos. A formação de sedimentos decorrente da alta temperatura empregada no processamento se deve à maior quantidade de proteínas desnaturadas e à precipitação dos sais minerais (Silva, 2004 e Vesconsi *et al.*, 2012).

## 2.5 Estimativa de custos por perdas na indústria de laticínios

A determinação e quantificação dos principais constituintes do leite são importantes para os laticínios, no que diz respeito à elaboração do pagamento por qualidade do leite, às informações aos consumidores e para o controle e a garantia de qualidade de derivados e subprodutos.

De acordo com Santos (2011), a lucratividade das indústrias laticinistas é dependente da eficiência e rendimento da transformação do leite em produtos lácteos como o queijo, leite em pó e leite fluido. Desta forma, o rendimento e a qualidade dos produtos lácteos são dependentes da composição e das propriedades tecnológicas que o leite apresenta.

Na região Sul do Brasil, um laticínio produtor de leite UAT apresentou somente no mês de março, 1126 reclamações de consumidores referentes a alterações sensoriais no leite UAT. Cerca de 560.000 litros foram descartados. Em um período de seis meses, os custos com trocas e descarte de leites UAT chegaram a quase R\$ 1.700.000,00. Após investigação das possíveis causas, constatou-se que o problema ocorreu principalmente devido a proteólise, sedimentação e coagulação durante a estocagem.

Como os métodos de análises microbiológicas tradicionais de contagem de micro-organismos mesófilos em leite UAT levam de 7 a 10 dias, o leite empregado no processo de fabricação desse leite em uma planta industrial pode gerar um produto final de qualidade questionável, tornando-se impróprio para consumo no decorrer de sua validade de prateleira, como foi o caso do cenário de reclamações vivido pelo laticínio citado acima.

Por esta razão, a indústria de laticínios, a fim de manter elevados níveis de qualidade durante a fabricação e produção de alimentos para o consumo seguro, tem aumentado a procura por testes rápidos para estimativa da qualidade microbiológica dos alimentos, visando obtenção de resultados rápidos e precisos.



Vários testes têm sido propostos, tais como métodos com base em anticorpo e reconhecimento de ácido nucleico, ensaios bioquímicos, enzimáticos e filtração por membrana (Vasavada, 1993; Fung, 1997, Patel, 1999, Entis *et al.*, 2001 e Manzano *et al.* 2005). Atualmente, a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IR) vem sendo amplamente utilizada em laboratórios industriais de controle de qualidade, pesquisa e desenvolvimento, assim como, em indústrias alimentícias, para a análise qualitativa e quantitativa dos ingredientes e alimentos acabados (Wehling, 2010).

Para isso, será mensurada de forma quantitativa a atividade enzimática no leite por meio de método indireto adaptado descrito por Manzano *et al.* (2005) e análise sensorial qualitativa do leite UAT em diferentes tempos de estocagem, ensaios físico-químicos e a contagem microbiológica no leite cru, considerando apenas micro-organismos psicrotróficos.

## 2.6 Atividade de Aminopeptidase

Segundo Manzano *et al.*, (2005), aminopeptidases são enzimas localizadas no envelope celular bacteriano, quase que exclusivamente em micro-organismos Gram-negativos. A atividade de aminopeptidase pode ser quantificada em µg de p-nitroanilina utilizando L-alanina-p-nitroanilida (incolor) como substrato, o que é enzimaticamente clivada para p-nitroanilina (rosa) (figura 5). Este composto pode ser detectado tanto instrumentalmente por medição de absorvância (540nm) como visualmente pelo desenvolvimento de cor nas amostras, o que será utilizado como método para as análises realizadas no leite cru.

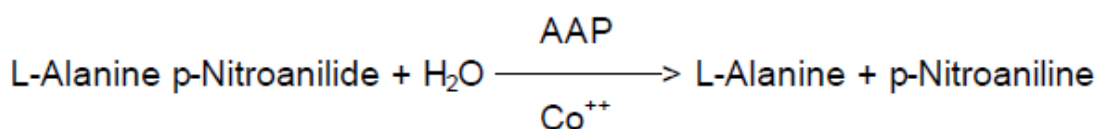


Figura 5: Reação química catalisada pela Alanina Aminopeptidase - AAP.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar uma metodologia de análise de leite cru que possa ser considerada como um modelo preditivo de ocorrência do grau de proteólise.

### 3.2 Objetivos específicos

- Correlacionar os parâmetros de qualidade do leite cru (teor de gordura, acidez, crioscopia, pH, densidade, extrato seco desengordurado, extrato seco total e contagem de psicotróficos) com a perda de estabilidade e o grau de proteólise no leite UAT;
- Avaliar a relação entre a contagem de psicotróficos no leite cru com a estabilidade e grau de proteólise do leite UAT (não conformidade) em diferentes tempos de estocagem;
- Avaliar uma metodologia de análise por atividade enzimática para uso como modelo preditivo de perda de estabilidade e grau de proteólise do leite UAT estocados em diferentes tempos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A fase experimental de amostragem e a execução dos ensaios (Figura 6) foi realizada em uma unidade industrial de produção de leite UAT integral, semi-desnatado e desnatado, localizada na região Sul do Brasil. A referida unidade capta cerca de 400.000 litros de leite por dia, oriundos de seus fornecedores que somam, atualmente, cerca de 2.200 produtores.

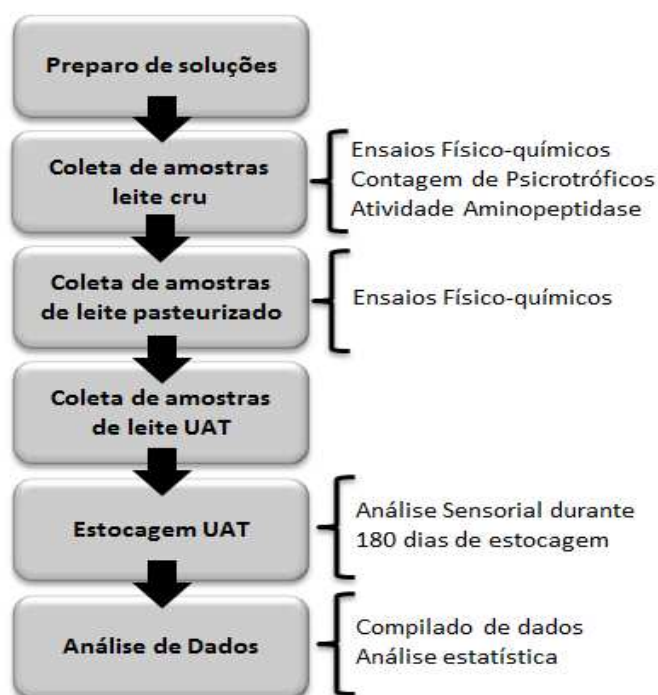


Figura 6: Fluxograma geral da fase experimental e execução dos ensaios analíticos.

#### 4.1 Amostragem

As amostras foram coletadas durante 22 semanas consecutivas e agrupadas em A1, A2 e A3, conforme descrito abaixo:

A1: amostras de leite cru, com volume de 100 ml cada, foram coletadas em duplicata no silo de estocagem de leite cru da indústria após o descarregamento dos caminhões, totalizando 44 amostras de leite cru (Figura 7). Os silos de armazenagem de leite cru estavam sob constante agitação e refrigeração controlada (2,5°C). As amostras foram coletadas em frascos plásticos para análises físico-químicas e em frascos plásticos estéreis para análise microbiológica de contagem de psicrotóxicos;

A2: amostras de leite pasteurizado, com volume de 100 mL cada, foram coletadas no silo de estocagem de leite pasteurizado, em frascos plásticos, sendo correspondentes ao leite cru anterior, totalizando 22 amostras, uma vez que não houve coleta em duplicata (Figura 7);

A3: amostras de leite UAT, com volume de 1000 ml cada, já envasadas em embalagem estéril cartonada, oriundas de três linhas de envase distintas (L1, L2 e L3), as quais produzem aleatoriamente, leites do tipo integral, semi-desnatado e desnatado. Para cada amostra de leite pasteurizado (A2), foram coletadas 12 amostras de leite UAT correspondentes a cada amostra de leite pasteurizado, totalizando assim 264 amostras de leite UAT (Figura 7).

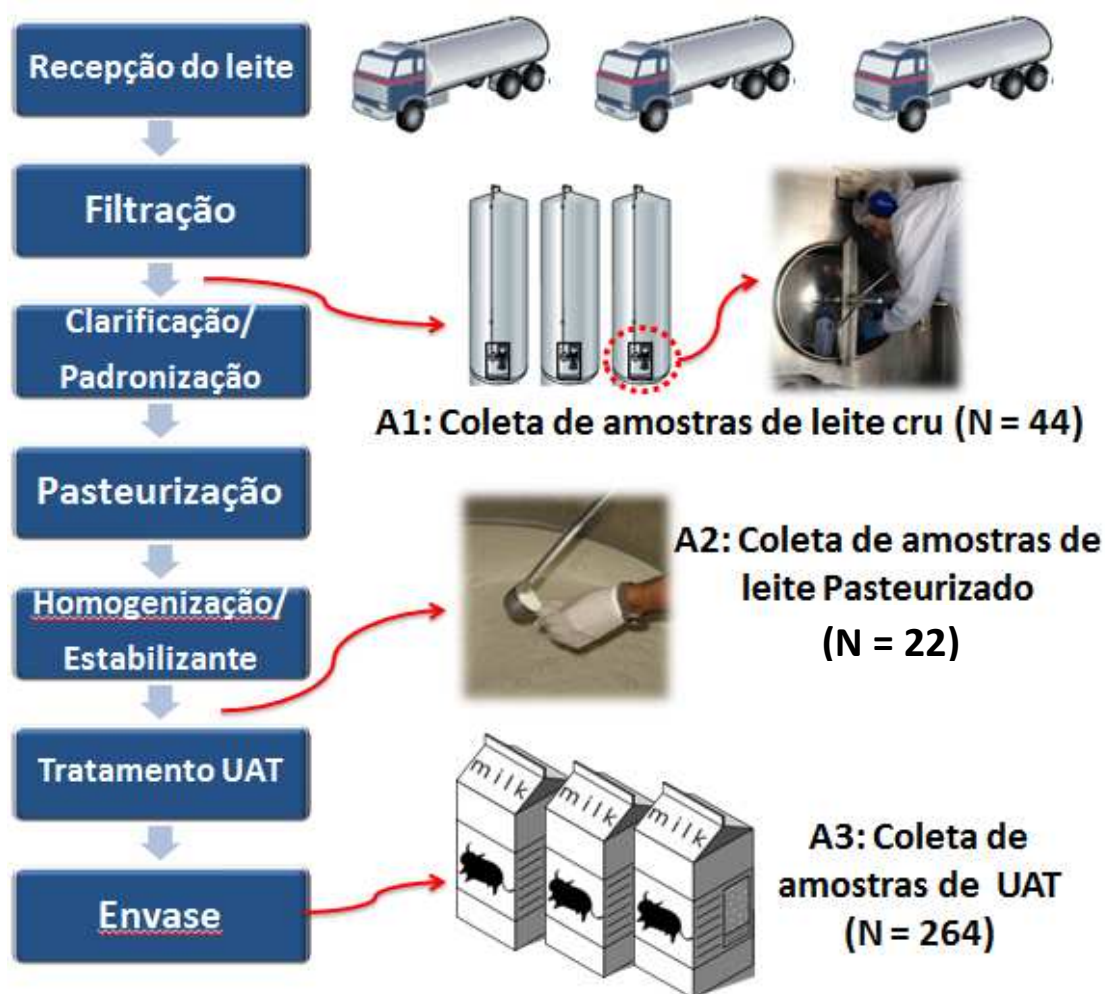


Figura 7: Esquema representativo do fluxo de coleta das amostras.

As amostras do grupo A1 foram fracionadas para realização dos ensaios físico-químicos, microbiológicos (contagem de psicrotróficos) e para análise de grau de proteólise conforme descrito adiante.

## 4.2 Preparo de soluções para análise de atividade enzimática de aminopeptidase no leite

### 4.2.1 Solução clarificante

A solução clarificante foi utilizada para melhorar a separação de bactérias a partir de amostras de leite (Manzano *et al.*, 2005). Esta solução foi composta por 0,15 M ADA (N-(2-acetamido) imino-diacetic acid a 2,85 g/100 mL), 0,5% de Triton (0,5 g/100 mL) e 0,01% de Micropartículas de poliestireno (0,01 g/100 mL). O Triton 100-X foi dissolvido em aproximadamente 75 mL de água sob agitação. Em seguida, foram adicionados 0,15 M ADA (N-(2-acetamido) imino-diacetic acid) neutralizado o pH para 7,0 com solução de NaOH 40%

gota-a-gota. Após, com o auxílio de uma micropipeta, as micropartículas de poliestireno previamente diluídas em água, foram adicionadas a solução.

#### 4.2.2 Solução 1000 ppm de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ )

Composta por  $\text{CoCl}_2$  na concentração de 1 g/L. Para constituição desta solução, foi dissolvido o cloreto de cobalto em água e transferido para um balão de 1 L.

#### 4.2.3 Tampão Tris HCl

Composto por 0,1 M de Trizma base (1,21 g/100 mL). Foram utilizados 6 mL de solução 1000 ppm de  $\text{CoCl}_2$  (equivalente a 6 mg de  $\text{Co}^{+2}$  livre). Após completa dissolução do Trizma base em 80 mL de água, foi adicionado 6 mL de solução de cloreto de cobalto 1000 ppm. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico 15%.

#### 4.2.4 Solução de Substrato

Composta por 0,1 g L-alanina-*p*-nitroanilida (0,1 g/100 mL). O reagente foi dissolvido em água, transferido para um balão volumétrico e a solução final foi armazenada em geladeira do próprio laboratório.

#### 4.2.5 Solução ácido acético

Composta por ácido acético em água a 20%. Em um balão volumétrico, adicionaram-se 20 mL de água destilada, seguido de 20 mL de ácido acético glacial. Completou-se o volume para atingir-se 100 mL.

#### 4.2.6 Solução nitrito de sódio

Composta por 0,2 g de nitrito de sódio em água (0,2 g/100 mL). O reagente foi dissolvido em água e em seguida avolumado em balão volumétrico.

#### 4.2.7 Solução de sulfamato de amônio

Composta por 2 g de sulfamato de amônio em água (2 g/100 mL). O reagente foi dissolvido em água e, em seguida, a solução foi avolumada em um balão volumétrico.

#### 4.2.8 Solução *n*-(1-naftil)-etilenodiamino

Composta por 0,1 g de *n*-(1-naftil)-etilenodiamino em água (0,1 g/100 mL). O reagente foi dissolvido em água e em seguida a solução foi avolumada em um balão volumétrico.

#### 4.2.9 Solução de calibração da curva padrão

Composta por p-nitroanilida (0,0125 g/L). Após a pesagem do reagente, este foi transferido para um balão volumétrico de 1 litro. Em seguida foi adicionada água até quase encher o balão volumétrico, mantendo sob agitação em agitador magnético até completa dissolução.

### 4.3 Determinações Analíticas

As amostras de leite cru e pasteurizado foram analisadas em relação à acidez, crioscopia, gordura, extrato seco total - EST, extrato seco desengordurado – ESD e densidade, segundo a Instrução Normativa nº 68 (Brasil, 2006). Ainda para leite cru, foi realizada contagem de psicrotróficos (APHA, 2001) bem como a atividade enzimática de aminopeptidase (expressa em µg de p-nitroanilina), segundo a metodologia indireta sugerida por Manzano *et al.*, (2005). Amostras de leite UAT foram estocadas por 180 dias e analisadas quanto ao grau de proteólise através de análises sensoriais, conforme descrito adiante.

#### 4.3.1 Grau de Proteólise no Leite Cru

A análise do grau de proteólise no leite cru foi realizada pela medição da atividade de aminopeptidase (expressa como µg de p-nitroanilina), utilizando o método indireto adaptado proposto no estudo de Manzano *et al.* (2005), com leitura instrumental de absorvância em 540nm, utilizando espectrofotômetro de feixe duplo DR2700 (Hatch®).

Para esta metodologia de ensaio da atividade enzimática, foram consideradas as etapas A – E descritas abaixo e ilustradas na figura 8.

**Etapa A** - Clarificação do leite: nesta fase, em cada tubo de ensaio de 50 mL foram adicionados 24 mL de leite cru e 9,6 mL de solução clarificante. Os tubos foram invertidos por 10 vezes.

**Etapa B** - Separação e ressuspensão dos micro-organismos: após a clarificação do leite, as amostras foram centrifugadas utilizando uma centrífuga refrigerada de bancada com abertura para 6 tubos, rotor de fibra de carbono de 20000 gf e refrigeração a 4°C, durante 10 minutos.

**Etapa C** – Pellet bacteriano: a camada de gordura e o sobrenadante, formados após a centrifugação, foram cuidadosamente retirados. Uma alíquota de 3 mL de solução tampão TRIS HCl pH 8,0 (Co<sup>+2</sup>) foi adicionada, seguido de agitação afim de ressuspender completamente o pellet bacteriano localizado no fundo do tubo e posteriormente iniciar o ensaio enzimático.

**Etapa D** - Ensaio enzimático: Para cada amostra foram utilizados dois tubos de ensaio (tubo amostra - TA e tubo branco - TB) os quais foram adicionados 1,2 mL de suspensão bacteriana. Em TA, foram adicionados mais 0,6 mL de solução de substrato. TB permaneceu sem a adição do substrato para ser utilizado como branco da análise. TA foi incubado em banho-maria a 37°C por 2 h enquanto TB foi mantido na geladeira durante o mesmo período. Após o período de incubação, uma alíquota de 0,6 mL de substrato foi adicionada a TB. As amostras contidas em TA e TB foram centrifugadas a 20000 gf durante 10 minutos, sob temperatura de 4°C, imediatamente após o banho.

**Etapa E** - Preparação e Leitura: Após a centrifugação, foi pipetada uma alíquota de 1 mL do filtrado e transferida para os tubos que foram colocados no espectrofotômetro onde foi realizada a leitura. Em cada tubo, foram adicionados 800 µl de solução ácido acético 20%, 400 µl de solução nitrito de sódio 0,2%, 400 µl de sulfamato de amônio 2% e 100 µl de solução n - (1 - naftil) - etilenodiamino 0,1%. O espectrofotômetro foi ajustado para leitura a 540 nm. As variações visuais observadas podem variar de rosa claro para rosa intensa, entretanto o padrão visual não foi considerado neste estudo. A atividade de aminopeptidase deve ser expressa como µg de p-nitroanilina.

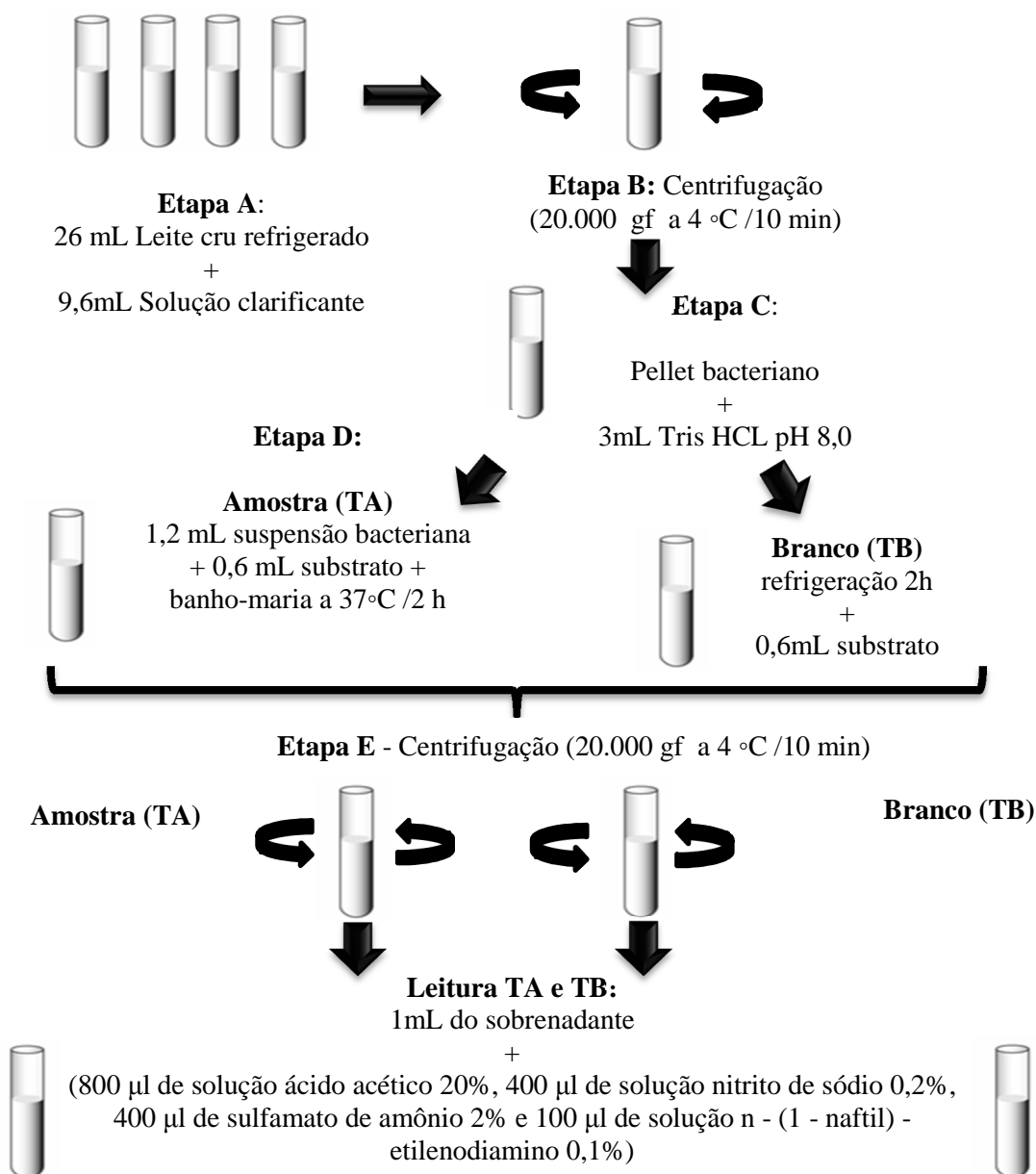


Figura 8: Representação esquemática do ensaio de aminopeptidase para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru.

Fonte: Adaptado de Manzano *et al.*, (2005)

#### 4.3.2 Grau de proteólise de leite UAT

As amostras de leite UAT foram previamente codificadas com dados do lote de produção, contendo data e hora de envase, número do lote, linha de envase, turno de produção, tipo de leite (integral, semi-desnatado ou desnatado) e data prevista para realização da análise sensorial. Todas as amostras foram mantidas estocadas na própria indústria, em ambiente fechado a temperatura ambiente de 25 °C.



Para leite UAT, 264 amostras foram coletadas e estocadas na unidade sob temperatura ambiente. Deste total de amostras, o grau de proteólise de 251 amostras foi mensurado qualitativamente por avaliação sensorial do leite, considerando aparência, odor, sabor e textura conforme especificação técnica padrão definida pela equipe sensorial do laticínio (Quadro 1). A amostragem de coleta (264) difere-se da amostragem analisada devido ao período de estocagem de 180 dias, ou seja, ainda existem amostras estocadas que irão ser avaliadas dentro do previsto para cada tempo de análise sensorial. A avaliação sensorial foi realizada por 2 pessoas que compõem a equipe técnica previamente treinada em análises sensoriais de leite fluido, do laboratório da unidade industrial beneficiadora de leite, no qual o estudo foi realizado.

Quadro 1: Descrição do padrão sensorial para os leites integral, semi-desnatado e desnatado

Tipo	Aparência* <sup>1</sup>	Odor* <sup>2</sup>	Sabor* <sup>2</sup>	Textura* <sup>3</sup>
Integral	Textura aparente levemente consistente ( <b>moderada</b> formação de película no tubo de ensaio ao incliná-lo).	<b>Moderado a muito</b> odor de cozido, ausência de odor ácido.	Pouco a moderado gosto doce, moderado sabor de cozido com moderada permanência na boca, muito leve gosto salgado, ausente de gosto ácido, sabor de ranço, metálico. Ausente de adstringência.	<b>Pouco a moderado</b> corpo na boca.
Semi-desnatado	Textura aparente levemente consistente ( <b>com pouca</b> formação de película no tubo de ensaio ao incliná-lo).	<b>Pouco a moderado</b> odor de cozido, ausência de odor ácido.	Pouco gosto doce, pouco a moderado sabor de cozido com pouca a moderada permanência na boca, muito leve gosto salgado, ausente de gosto ácido, sabor de ranço, metálico, adstringente.	<b>Pouco</b> corpo na boca.
Desnatado	Textura aparente levemente consistente ( <b>com muito pouca</b> formação de película no tubo de ensaio ao incliná-lo).	<b>Pouco</b> odor de cozido, ausência de odor ácido.	Muito pouco gosto doce, pouco sabor de cozido com pouca permanência na boca, muito leve gosto salgado, pouca adstringência, ausente de gosto ácido, sabor de ranço, metálico.	<b>Muito pouco</b> corpo na boca

\*<sup>1</sup> Para todos os tipos: cor branca com fundo muito levemente amarelado, ausente de separação de gordura e precipitação de proteína.

\*<sup>2</sup> Para todos os tipos: durante o ano pode apresentar leve variação devido à variações na alimentação do animal.

\*<sup>3</sup> Corpo na boca significa que ao provar pequenas quantidades do produto, tem-se a sensação de que a boca está cheia

Para iniciar a análise sensorial, primeiramente, após abrir totalmente a embalagem cortando sua parte superior, foi observado o critério “Aparência” (Figura 9). Para avaliação dos critérios

“Cor” e “Textura aparente”, uma alíquota de leite foi colocada em tubo de ensaio (aproximadamente meio tubo, conforme figura 10).



Figura 9: Padrão de abertura de embalagem de leite UAT para análise sensorial.

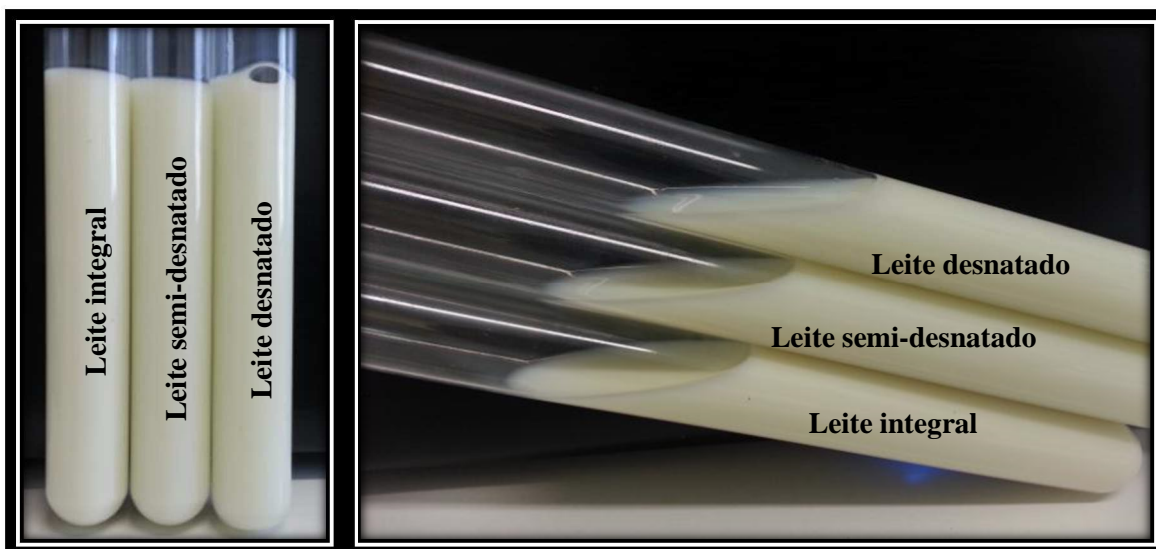


Figura 10: Padrão de Cor e Textura aparente em leite UAT integral, semi-desnatado e desnatado.

Para avaliação dos critérios “Odor” e “Sabor e textura”, 50 mL de leite foram colocados em um copo plástico descartável para prova, sem necessidade de engolir a amostra. A cada prova, o analista sensorial realizou o branco, enxaguando a boca com água potável à temperatura ambiente e cheirando um guardanapo de papel. Posteriormente os resultados das análises sensoriais foram agrupados conforme escore do quadro 2.

Quadro 2: Escore para classificação sensorial de Leite UAT

Escore	Características sensoriais* <sup>1</sup>
1	Sem alteração e Sem coagulação
2	Amargor e Sem coagulação
3	Sem alteração e coagulado
4	Amargor e coagulado

\*<sup>1</sup> Considerou-se “Sem alteração” quando não houve alterações de odor ou sabor

Para cada tipo de leite (integral, semi-desnatado e desnatado), o índice de não-conformidade foi calculado dividindo-se o número de amostras não-conformes, pelo total de amostras analisadas no grupo. Este índice indica a incidência de ocorrência de não-conformidade para cada tipo de leite.

A primeira análise sensorial ocorreu após 15 dias de estocagem das amostras de leite UAT. As demais repetições foram realizadas a cada 15 dias, contados a partir da primeira análise sensorial (análises sensoriais com 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165 e 180 de

estocagem), totalizando seis meses de estocagem para cada semana de coleta de leite cru (34 semanas de coleta). A programação das análises sensoriais (figura 11) foi realizada até completar os 180 dias de estocagem.

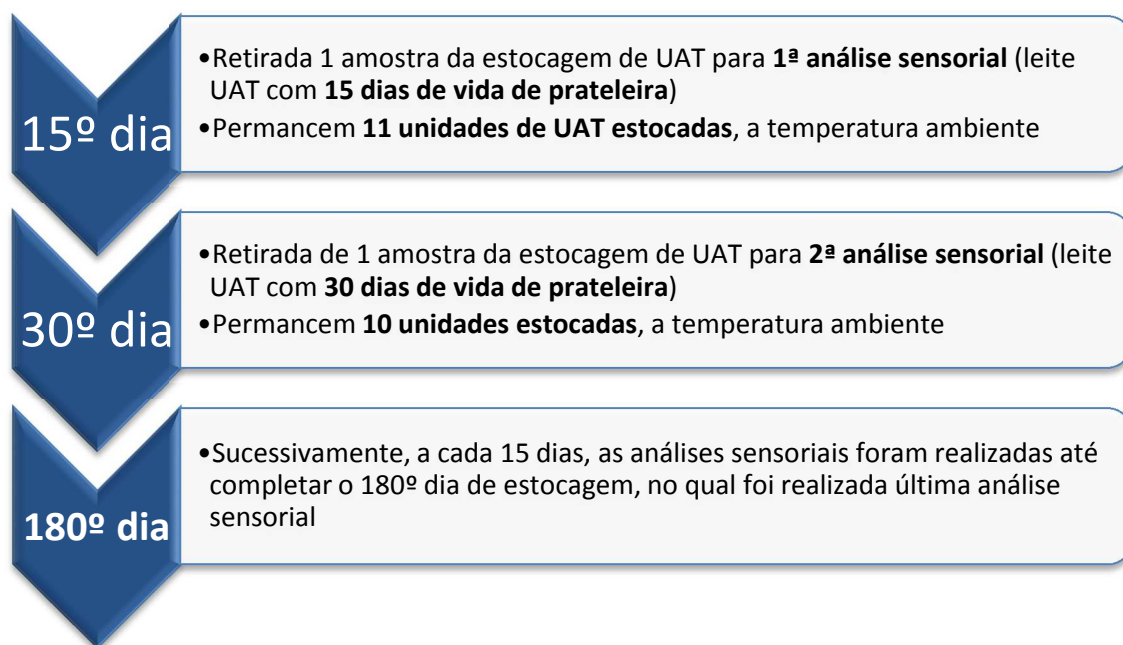


Figura 11: Programação das análises sensoriais de leite UAT estocado em diferentes tempos.

#### 4.4 Contagem de psicotróficos

Paralelamente à análise de grau de proteólise, foi realizada a contagem de micro-organismos psicotróficos no leite cru obtido dos silos de estocagem da recepção.

O procedimento conforme detalhado abaixo, segue a metodologia sugerida pela Associação Americana de Saúde Pública – APHA (2001). Os resultados foram expressos em UFC/ml ou UFC/g, unidades formadoras de colônias por mililitro ou grama de produto.

##### 4.4.1 Técnica para contagem de psicotróficos

Primeiramente foram preparadas as diluições das amostras pipetando-se, assepticamente, 25 mL da amostra, e transferindo para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada

0,1% esterilizada (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até  $10^{-6}$ , empregando-se o mesmo diluente.

Após a realização das diluições decimais, foram adicionados de 15 a 20 mL de ágar padrão fundido e resfriado à temperatura em torno de 45°C em placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, foi realizada a semeadura utilizando 0,1 mL do inóculo depositado sobre a superfície do ágar com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas a temperatura de 7°C durante 10 dias.

#### 4.4.2 Leitura das placas de psicrotróficos

As contagens foram realizadas utilizando-se um contador de colônias, segundo técnica padrão, em placas com 25 a 250 colônias, e na sequência foram efetuados os cálculos. Para contagem dos micro-organismos psicrotróficos, além do número de colônias a ser multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes, também foi considerado multiplicar-se por 10, pois foi utilizado apenas 0,1 mL de cada diluição (considerando que o volume inoculado no plaqueamento em superfície é dez vezes menor).

#### 4.5 Análises Estatísticas

Os dados referentes ao estudo foram analisados comparando-se a média e o desvio padrão entre os tipos de leite integral, semi-desnatado e desnatado, por meio da análise de variância com teste de comparações múltiplas e a correlação de Pearson a 5% de probabilidade. Além disso, foi realizada uma análise descritiva de tempo entre a leitura da atividade de aminopeptidase e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados no estudo. Empregou-se, para as análises estatísticas, o software de Análises de Dados e Estatística - Stata (2012).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre os parâmetros físico-químicos avaliados (acidez, alizarol, pH, extrato seco total, extrato seco desengordurado e densidade) para leite cru e pasteurizado, quando comparado com seus respectivos leites UAT classificados como conformes e não-conformes (Tabela 8). Amostras não-conformes são aquelas que apresentaram características sensoriais alteradas durante a estocagem, tais como alteração de sabor, odor, aparência e/ou formação de coágulo.

Tabela 8: Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos avaliados em leite cru e pasteurizado para cada grupo de UAT conforme e não-conforme

Parâmetros	Leite Cru		Leite Pasteurizado	
	UAT Conforme	UAT Não-conforme	UAT Conforme	UAT Não-conforme
Acidez (°D)	15,2 ± 0,38	15,3 ± 0,45	15,1 ± 0,37	15,0 ± 0,42
Alizarol (°GL)	76 ± 0,74	75,8 ± 1,23	80 ± 0,0	80 ± 0,0
Crioscopia (°H)	0,539 ± 0,003	0,538 ± 0,002	0,544 ± 0,004	0,545 ± 0,003
Gordura (%)	3,9 ± 0,17	3,9 ± 0,13	2,8 ± 0,9	2,2 ± 1,3
pH	6,75 ± 0,05	6,75 ± 0,05	6,8 ± 0,05	6,8 ± 0,03
EST (%)	12,6 ± 0,25	12,57 ± 0,28	11,4 ± 0,95	10,8 ± 1,29
ESD (%)	8,68 ± 0,11	8,67 ± 0,17	8,6 ± 0,13	8,6 ± 0,14
Densidade (g/mL)	1030,5 ± 0,38	1030,5 ± 0,61	1031,2 ± 0,73	1031,7 ± 1,24

A diferença observada no teor de gordura do leite pasteurizado deve-se ao fato das amostras pertencerem a três tipos de leite (integral, semi-desnatado e desnatado) e neste momento já estão padronizadas para o teor de gordura correspondente a cada tipo a ser produzido. As pequenas variações de crioscopia em relação a leite cru e pasteurizado estão associadas à adição de citrato e fosfato, estabilizantes proteicos permitidos pela legislação (Brasil, 2002) para suportarem o processo térmico envolvido na produção de leites UAT. Demais valores obtidos nas análises estiveram de acordo com a legislação disposta na Instrução Normativa 62 (Brasil, 2011) e apresentaram variações semelhantes as observadas por Vidal-Martins *et al.*, (2005) para o leite cru, utilizado para fabricação de leite longa vida.

Não houve diferença estatística significativa entre a correlação ( $P < 0,05$ ) dos parâmetros físico-químicos, contagem de psicotróficos e leitura de atividade de aminopeptidase tanto no leite cru quanto no leite pasteurizado (Tabela 9). Entretanto baixo número de repetições (n) pode gerar incerteza no resultado apresentado, o que faz com estes resultados sejam desconsiderados.

Lopez Fandiño *et al.*, (1993), citado por Cunha, (2001) afirmam que já existem estudos que indiquem que extensão da proteólise é influenciada pelo teor de gordura presente no leite UAT, em que a velocidade da proteólise das amostras de leite UHT desnatadas é superior à de leite integral. Entretanto neste estudo, não foi possível constatar esta condição.

Tabela 9: Correlação entre parâmetros físico-químicos, contagem de psicotróficos e leitura de atividade de aminopeptidase no leite cru e pasteurizado

Parâmetros	Leite Cru (n=22)		Leite Pasteurizado (n=20)	
	Aminopeptidase	Psicotróficos	Aminopeptidase	Psicotróficos
Psicotróficos	-0,286	1	-0,198	1
Acidez	0,073	0,300	0,032	0,287
Alizarol	-0,137	-0,077	-	-
Crioscopia	0,154	-0,015	0,097	-0,048
Gordura	-0,381	-0,113	-0,27	0,207
pH	-0,04	0,158	-0,206	0,274
EST	-0,237	-0,157	-0,242	0,226
ESD	-0,014	-0,170	0,206	0,192
Densidade	0,083	-0,163	0,348	-0,084

Na figura 12 observa-se que do total de 251 amostras de leite UAT avaliadas na análise sensorial, 79% foram classificadas como "Conforme" (sem alteração sensoriais) e 21% (53 amostras) como "Não-conforme" (fora do padrão sensorial). Considerando a contagem de psicotróficos, foi observada média de  $9,5 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> para amostras de leite cru que deram origem a leites UAT classificados como conformes e média de  $15,2 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> para amostras de leite cru que deram origem a leites UAT classificados como não-conformes.

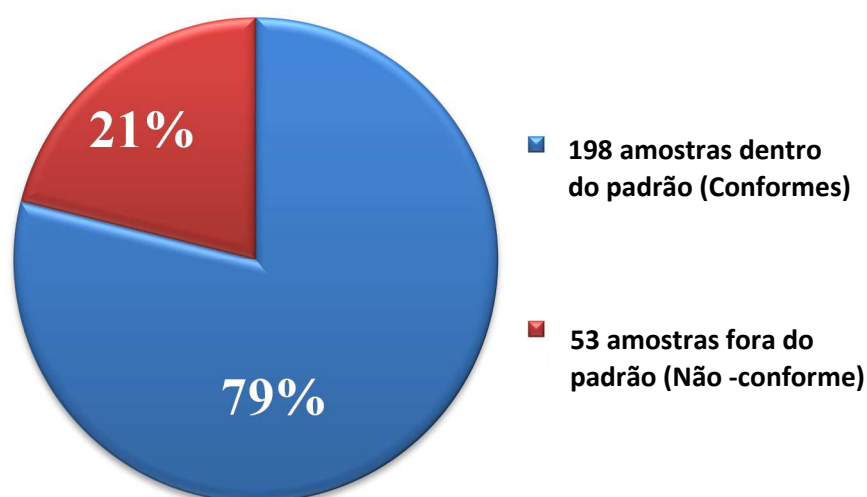


Figura 12: Percentual de conformidade do leite UAT estocado em diferentes tempos.

Na tabela 10, pode-se observar a distribuição de amostras dentro e fora do padrão, por tipo de leite, representadas pelo índice de conformidade. Considerando as amostras conformes (79%), observa-se que o índice de conformidade para as amostras de leite integral, semi-desnatado e desnatado, foram respectivamente, 85%, 17% e 67%. Já para as amostras não-conformes, verifica-se que o maior índice (83%) ocorreu para o leite tipo semi-desnatado, o que pode ser explicado pelo fato das 12 amostras de leite semi-desnatado UAT estocadas pertencerem a um mesmo lote no qual a contagem de psicrotróficos no leite cru correspondente foi de  $2,0 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>, enquanto a média dos outros tipos de leite foi de  $1,4 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Segundo Cunha (2001), maior rapidez no aparecimento da alteração de sabor (amargor) e a caracterização destas amostras como não-conformes, mais precocemente (antes dos 45 dias de estocagem) do que as dos outros grupos (após 45 dias de estocagem), está associado aos níveis de contaminação de micro-organismos psicrotróficos.

O maior número de amostras analisadas de leite UAT integral ocorreu em função da maior produção deste leite pelo laticínio utilizado no presente estudo. Apesar do menor número de amostras analisadas de leite semi-desnatado, verificou-se maior ocorrência de não conformidade neste tipo de leite UAT.

Tabela 10: Índice de conformidade segundo análise sensorial por tipo de leite UAT

Tipo de leite	Total de amostras UAT	Nº de amostras conformes	Nº de amostras não-conformes	Índice de não-conformidade por tipo UAT
Integral	203	172	31	15%
Desnatado	36	24	12	33%
Semi-desnatado	12	2	10	83%

De acordo com o agrupamento de escores (1 a 4) sugeridos no estudo, observa-se que contagens de psicrotróficos no leite cru acima de  $9,5 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> (Tabela 11), já são suficientes para alterar o padrão sensorial do leite UAT ao qual foram destinados e que não necessariamente, características relacionadas a alteração de sabor como amargor, deverão vir acompanhadas da presença de coagulação. Segundo Datta *et al.* (2003), a k-caseína localizada na superfície da micela de caseína é preferencialmente hidrolisada, e esta hidrólise causa o desenvolvimento de gosto amargo e induz o aumento da viscosidade, com eventual formação de coagulação do leite UAT/ UHT (Cunha, 2001), quando submetido a prolongado período de armazenamento. Isto pode explicar a não ocorrência de coagulação nas amostras classificadas no escore 2, apesar da contagem de psicrotróficos de  $1,75 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>.



Durante os ensaios de análise sensorial, notaram-se diferentes intensidades para o atributo amargor, com percepção mais intensa nas amostras de leite semi-desnatado e desnatado, o que provavelmente está atribuído ao menor teor de gordura que facilita a percepção do amargor quando em baixa intensidade (média de gordura de 3,1% para leite integral, 1,1% para semi desnatado e 0,2% para desnatado). Entretanto, este atributo será considerado neste estudo apenas como um fator qualitativo, indicando a presença ou ausência de amargor. Observa-se ainda, que todas as 31 amostras que compõe o atributo 4 (Amargor e Coagulado) apresentaram estas características no intervalo entre 90 e 180 dias, alterações esperadas decorrentes do período final de vida útil do produto, estimado para 120 dias, em que ocorre a desestabilização das micelas de caseína induzida por modificações físico-químicas (Cunha, 2001). Fernandes *et al.*, (2012) encontraram correlações significativas entre psicrotróficos e a fração k-caseína, indicando que quanto maior o número de bactérias psicrotróficas no leite cru, maior foi a quantidade de frações k-caseína encontradas no leite longa vida ao final da vida de prateleira (aos 120 dias).

Tabela 11: Contagem média de psicrotróficos por escala sensorial de classificação do leite UAT

Escore	Características	Amostras N (%)	Contagem de psicrotróficos (UFCx ml <sup>-1</sup> )
1	Sem alteração e Sem coagulação	198 (79%)	9,5x 10 <sup>7</sup>
2	Amargor e Sem Coagulação	11 (4%)	1,75 x 10 <sup>8</sup>
3	Sem alteração e Coagulado	11 (4%)	1,18 x 10 <sup>8</sup>
4	Amargor e Coagulado	31 (12%)	1,57 x 10 <sup>8</sup>

As médias de leitura da atividade de aminopeptidase (absorvância em 540nm) e as contagem de psicrotróficos do leite cru para cada tempo de estocagem em que foi realizado a análise sensorial (15 a 180 dias), estão representadas para as amostras conformes e não-conformes (Figura 13). Pode-se observar que a contagem de psicrotróficos, em média, variou de 1,26 - 2,1x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> e 4,3 x10<sup>7</sup> a 1,08x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> para leites crus correspondentes aos leites UAT não-conformes e conformes, respectivamente. A absorvância de aminopeptidase correspondente a µg de p-nitroanilina variou para amostras não-conformes de 0,463 – 0,531 (2,82 – 3,24 µg de p-nitroanilina) e para amostras conformes de 0,499 – 0,675 (3,04 – 4,12 µg de p-nitroanilina). Valores semelhantes e/ou muito próximos de leitura, foram observados para leites conformes e não-conformes, diferenciando o grupo apenas na contagem de psicrotróficos, o que indica que leituras de aminopeptidase não devem ser utilizadas como classificatórias para se prever o tempo e o padrão (conformidade ou não-conformidade) de leites UAT.

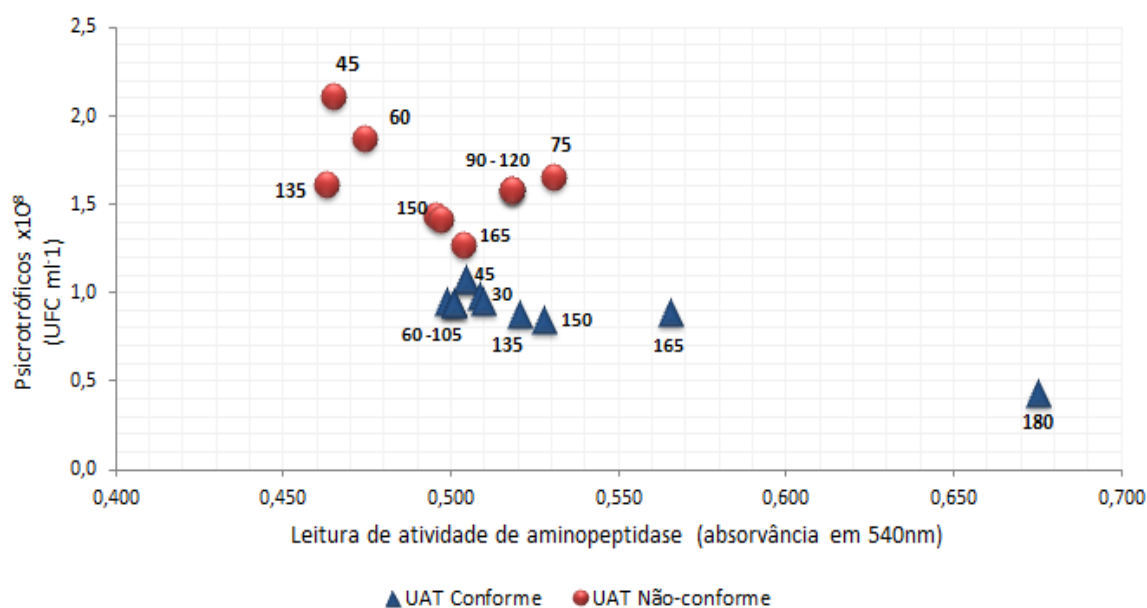


Figura 13: Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicrotróficos de leites cru e tempo de análise de leite UAT correspondente.

A figura 14 apresenta o tempo de estocagem em que foi detectada a primeira alteração sensorial do leite UAT. A leitura da atividade de aminopeptidase (absorvância em 540 nm) nas amostras de leite cru que corresponderam apenas aos leites UAT não-conformes (figura 14) foi detectada entre 0,188 - 0,814 (1,14 - 4,97  $\mu\text{g}$  de p-nitroanilina) e a contagem de psicrotróficos observada para o mesmo grupo foi de  $6,0 \times 10^6$  a  $2,2 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>. Amostras de leite desnatado e semi-desnatado apresentaram amargor com 45 dias de estocagem e contagem de psicrotróficos de  $2,0 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> e  $2,2 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Vidal-Martins *et al.* (2005) também observaram contagens médias acima de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> e aumento da proteólise no decorrer do armazenamento após 60 dias de estocagem, provavelmente relacionados à presença de proteases de bactérias psicrotróficas do leite cru.

Na indústria em que foi realizado o presente estudo, a partir de 120 dias já eram esperadas características que tornavam o leite UAT integral não-conforme. Entretanto, algumas amostras de leite integral apresentaram alteração sensorial com apenas 60, 75 e 90 dias de estocagem. Cunha (2001) e Manzano *et al.*, (2005) consideram contagens de psicrotróficos acima de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, suficientes para garantir níveis significativos de enzimas extracelulares e problemas decorrentes de sua presença. Considerando apenas as amostras não-conformes (figura 14), a média de psicrotróficos no leite cru correspondente foi  $2,2 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> e  $2,0 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>,

respectivamente para leite desnatado e semi-desnatado, contagens que podem justificar o índice de não-conformidade nas amostras de leite UAT avaliadas.

De acordo com Vidal-Martins *et al.*, (2005) e Fernandes *et al.*, (2012), altas contagens sugerem que as alterações sensoriais observadas são decorrentes de atividades enzimáticas, principalmente enzimas extracelulares, particularmente lipases e proteases, produzidas por estas bactérias contaminantes do leite, que ainda, que a vida útil do produto está diretamente relacionada com a qualidade higiênica da matéria-prima.

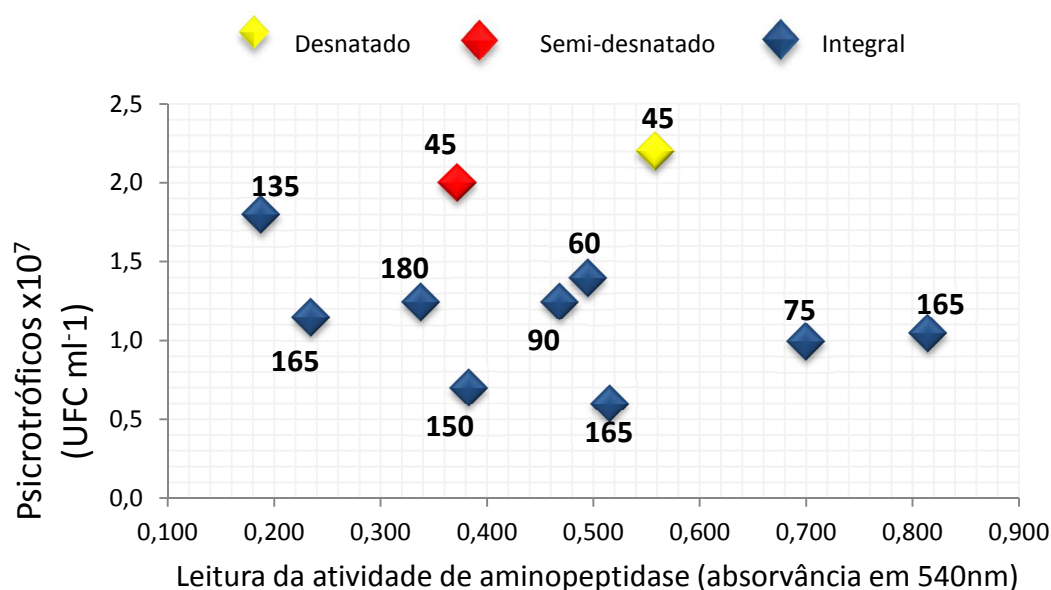


Figura 14: Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicrotróficos de leites cru e tempo de análise de leite UAT correspondente, em que foi observada a primeira alteração sensorial para os diferentes tipos de leite.

Os resultados obtidos podem ter sido influenciados pelo baixo número de repetições e por possíveis variações sazonais não contempladas no presente estudo. Assim, sugere-se que novos trabalhos sejam realizados com amostragem mais representativa a fim de validar este método como uma alternativa de baixo custo para detecção de proteólise e perda de estabilidade de leite UAT por testes de rotina de fácil realização.

## 6. CONCLUSÕES

Os parâmetros de qualidade do leite cru (teor de gordura, acidez, crioscopia, pH, densidade, extrato seco desengordurado, extrato seco total) não influenciaram a não conformidade de leite UAT (perda de estabilidade e o grau de proteólise);

Alterações sensoriais de leites UAT relacionaram-se à maior contagem de psicotróficos no leite cru;

Alterações sensoriais de leites UAT foram detectadas com períodos curtos de estocagem e relacionadas a altas contagens de psicotróficos em leite cru;

A atividade da aminopeptidase não foi capaz de prever ocorrência de proteólise em leite UAT e não teve correlação com a contagem de psicotróficos em leite cru.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLV. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. São Paulo: [s.n.], 2014. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Estatisticas.aspx>>. Acesso em: 08 dez. 2014.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on microbiological methods for foods. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association, 2001. 4ª ed. Chapter 6, p.53-67.

ARCURI, F.E.; DA SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P. *et al.* Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, nov. 2008, vol. 38, ed. 8, p.2250-2255. 6p. Disponível em: Food Science Source. Acesso em: 10 dez. 2014.

BARRY, J.G.; DONNELLY, W.J. Casein compositional studies. II. The effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. *Journal of Dairy Research*, v.48, p.437-46, 1981. doi: 10.1017/S0022029900021919.

BRASIL. Portaria nº 146 de 07 mar . 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). *Diário Oficial da União*, Brasília, 11 mar. set. 1996, seção 1, p.3977.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 set. 2002. 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, 18 set. 2002, seção 1, p.13.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 26 ago. 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 set. 2003, seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, 14 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011, que altera a Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 dez. 2011, seção 1, p. 6-11. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. *Projeções do Agronegócio*, Brasil 2013/14 a 2022/23. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13:255-75. 2003.

CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.D. Atividade de plasmina e plasminogênio no leite longa vida com alta e baixa contagem de células somáticas durante o armazenamento. *Ciência Rural*. 40, 12, 2588-2592, Dec. 2010. ISSN: 01038478.

CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; KOBASHIGAWA, E. et al. Relação entre atividade de plasmina e frações de caseína durante o armazenamento do leite longa vida. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, v. 16, n. 1, p. 29-33, jan./mar. 2013

CUNHA, M.F. Revisão: Leite UHT e o fenômeno de gelatinização. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 341, jul./dez. 2001.

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

EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. Agronegócio Leite. Tipos de Microorganismos. [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_182\\_21720039246.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html). Acesso em: dez. 2014.

ENTIS, P.; FUNG, D.Y.C.; GRIFFITHS, M.W. *et al.*, Rapid methods for detection, identification and enumeration. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, (4th ed.) (pp. 89–126). Washington, DC: American Public Health Association, 2001.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTAT* Database, 2014. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 06 dez. 2014.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S. *et al.* Relação Entre Psicrotróficos e Frações de Caseína do Leite Longa Vida Durante o Armazenamento. *UNOPAR CIENTÍFICA*. Ciências Biológicas e da Saúde 2012;14(4):227-30

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

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar, ed. Artmed, 2002, 424p.

FUNDAÇÃO PROCON SP. Cadastro Estadual de Reclamações Fundamentadas 2013. Disponível em: <[http://www.procon.sp.gov.br/pdf/kit\\_imprensa\\_2013.pdf](http://www.procon.sp.gov.br/pdf/kit_imprensa_2013.pdf)> . Acesso em: nov, 2014.

FUNDAÇÃO PROCON RJ. Clipping Imprensa 2014. Disponível em: <<http://www.procon.rj.gov.br/index.php/clipping/detalhar/172>> Acesso em: nov, 2014.

FUNG, D.Y.C. Overview of rapid methods of microbiological analysis. In M. L. Tortorello, & S. M. Gendel (Eds.), *Food Microbiological Analysis*. New Technologies, p. 1–23, 1997.

FRANK, J.F. *et al.* Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). Standard methods for the examination of dairy products. 16.ed. Washington: *American Public Health Association*, 1992. p.271-286.

GEBRE-EGZIABHER, A; HUMBERT ES & BLANKENAGEL, G. Hydrolisis of milk proteins by microbial enzymes. *Journal of Food Protection*, 43:709-712. 1980.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. *O*

*compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo, RS: UPF, 2004. 331p.

GRIFFITHS, M.W. Improving the safety and quality of milk: Milk production and processing. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited, 2010. 482 p.

HARDING, F. *Milk quality*. London: Chapman & Hall, 1995. 166p.

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

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2013. Disponível em <http://www.IBGE.gov/>. Acesso em: dez 2014.

IZIDORO, T.B. *et al.* Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. *Revista Ceres*. jul/ago, vol. 60 Issue 4, p452-457. 6p., 2013

MANZANO, S.; A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, n. 15, p. 79–84, 2005.

MENEZES, M.F.C.; SIMEONI, C.P.; ETCHEPARE, M.A. *et al.* Microbiota e Conservação do Leite, REGET - Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. UFSM, v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 76-89. ISSN 2236 1170

MINTEL. *Relatório Leite Brasil*, 2014. Disponível em <<http://www.mintel.com/>>. Acesso em: jan. 2015.



NICOLAOU, N.; XU, Y.; GOODACRE, R. Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 12, 2010. doi: 10.3168/jds.

PATEL, P. D. *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 1999.

SÁ, F.V. de; BARBOSA, M. *O leite e os seus produtos*. 5. ed. Lisboa, Portugal: Clássica, 519 p., 1990.

SANTOS, M. G.; OKURA, M. H.; DE RENSIS, C. M. V. B. Avaliação da qualidade do leite UHT durante o período de estocagem. *Anais da V Jornada Científica da FAZU*, outubro de 2006.

SILVA, P. H. F. Leite UHT: *Fatores Determinantes para Sedimentação e Gelificação*. Juiz de Fora: Oficina de Impressões Gráficas e Editora Ltda, 2004. 128 p. ISBN 85-904345-1-6.

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de microorganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. *Higiene Alimentar*, v. 12, n. 55, p. 21-27, 2000.

STATA CORP, L. *Stata 12 statistical software*: College Station, TX 2012.

TETRA PAK. Dairy Processing Hand Book. The Chemistry of Milk, v.2, p.13-36, 1996. Disponível em < <http://www.tetrapak.com/usprocessing/media/dairy-processing-handbook>> Acessado em: jan. 2015.

TORRES, E.; Leche UHT em Bolsa. *Revista Indústria Alimentícia*. Jun 2010, Vol. 21 ed. 6, p34-34. 1p ISSN: 0326-9000

VASAVADA, P. C. *Rapid methods and automation in dairy microbiology. Journal of Dairy Science*, 76, 3101–3113, 1993.

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

VIDAL-MARTINS, A.M.; SALOTTI, B.M; 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*, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, 73: 1965-1979, 1990

WEHLING, R.L. Spectroscopy: Infrared spectroscopy. In: NIELSEN, S.S. (Ed.) *Food Analysis*. 4th ed. Columbia: Springer US, 2010. XIV, ch. 23, p.407-420.

## ANEXO 1 - CUSTOS DOS REAGENTES UTILIZADOS NA METODOLOGIA DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMINOPEPTIDASE

Custo da metodologia de mensuração da atividade enzimática de aminopeptidase considerando apenas os custos dos reagentes utilizados para cada análise (Custo dos reagentes por ensaio foi de R\$ 1,70 por análise).

Reagentes	Custo (R\$/análise)
0,15 M ADAN-(2-acetamido)imino-diacetic acid)	1,27
0,5% Triton X-100	0,01
0,01 Micropartículas de Poliestireno	0,06
0,1 M Trizma Base	0,05
L-alanina-p-nitroanilida	0,30
Ácido Acético	0,001
Nitrio de Sódio	0,001
Sulfamato de Amônio	0,001
n-(1-naftill)-etilenoiamino	0,01
Custo total de reagentes por análise realizada	R\$ 1,70

Fonte: Dados pessoais