



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE

FERNANDO CÉSAR DOS SANTOS

**EFEITO DOS FATORES SOBRE A ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA NA
VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE LONGA VIDA**

Londrina
2014

FERNANDO CÉSAR DOS SANTOS

EFEITO DOS FATORES SOBRE A ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA NA VIDA
DE PRATELEIRA DE LEITE LONGA VIDA

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Leite.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Garcia Botaro

LONDRINA
2014

FERNANDO CÉSAR DOS SANTOS

EFEITO DOS FATORES SOBRE A ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA SOBRE A
VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE LONGA VIDA

Dissertação aprovada em 30 de junho de 2014, pela banca examinadora constituída
pelos professores:

Profa. Dra. Marly Sayuri Katsuda
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Profa. Dra. Elsa Helena Walter Santana
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Bruno Garcia Botaro
Universidade Norte do Paraná

DEDICATÓRIA

*À toda minha família, em especial a minha
mãe Ângela por todo carinho, apoio e
compreensão, e meu tio “Valé” pelo
amparo e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Ào Prof. Dr. Bruno Garcia Botaro pela orientação, incentivo, dedicação e paciência.

À CONFEPAR pela disponibilidade e colaboração na coleta das amostras, em especial Fabiano Érisson da Cunha.

Às Profa. Dra. Marly Sayuri Katsuda e Dra. Lúcia Felicidade Dias pela parceria com o programa de Mestrado Profissional em Ciência de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

À todos os professores do programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, em especial Dra. Elsa Helena Walter de Santana, Dra. Christiane Maciel V. Barros De Rensis e Dr. Rafel Fagnani.

À aluna de iniciação científica Jaqueline Rodrigues, da UTFPR, pelo auxílio nas primeiras fases do experimento.

Ào ex-técnico e a técnica do laboratório de pesquisa do leite, Jorge de Moraes Donato e Geicy Colognese, pelo auxílio dentro do laboratório.

Aos amigos Josiane, Kelly, Rafael, Priscila, Danilo, Luciana, Geisa, Adriana e Christiane, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos amigos Henrique, Fabrício, Hendrui, Ítalo e Davi, pelos incontáveis momentos de diversão.

À toda minha família e amigos que me incentivaram.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“E aqueles que foram vistos dançando foram
julgados insanos por aqueles que não
podiam escutar a música.”*

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

EFEITO DOS FATORES SOBRE A ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA SOBRE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITE LONGA VIDA

RESUMO

Dentre os alimentos de origem animal de maior consumo destaca-se o leite e, em particular, o leite tratado por ultra alta temperatura (UHT), visto a sua praticidade de conservação e uso, além do longo período de vida comercial. Porém os tratamentos térmicos (pasteurização e processo UHT) aplicados ao produto, associados, por vezes, à reduzida qualidade da matéria-prima, atuam desfavoravelmente sobre as propriedades físico-químicas responsáveis pela manutenção do equilíbrio físico do produto. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de verificar as correlações existentes entre as características físico-químicas, microbiológicas e índice de proteólise durante o período de avaliação de vida de prateleira do leite UHT. Foram coletados 10 lotes de leite UHT e suas respectivas matérias-primas (leite cru e pasteurizado) em usina de beneficiamento na cidade de Londrina-PR. As amostras de leite UHT foram avaliadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 após a fabricação. Realizou-se a contagem de células somáticas (CCS), microrganismos mesófilos e psicrotóxicos do leite cru, e determinou-se pH, acidez titulável (°D), índice crioscópico (°H), gordura (%), densidade (g L^{-1}), extrato seco total e desengordurado, ácido siálico, frações proteicas (proteína verdadeira, proteína bruta e caseína), sedimentação e índice de proteólise em todas as amostras. Procedeu-se a correlação produto-momento de Pearson (r) para índice de proteólise e as contagens microbianas e de células somáticas, bem como o estudo da cinética de ordem (n) da proteólise da caseína. Observa-se que as correlações de Pearson em todas as comparações foram significativas para a maioria dos tempos de armazenamento dos leites UHT, tendo relação diretamente proporcional. A cinética de ordem para a degradação de caseína foi de 0,36, não se enquadrando nos modelos clássicos de cinética. A constante de velocidade de degradação de caseína (k) com base na ordem de cinética foi de $2,03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ por dia para as amostras estudadas. Os principais fatores determinantes da estabilidade física e degradação do leite, durante a vida de prateleira, são a qualidade microbiológica e de CCS da matéria-prima, relacionadas à liberação de enzimas termorresistentes, envolvidas na degradação das proteínas, levando ao fenômeno da geleificação e sedimentação, assim como de *off-flavors*.

Palavras-chave: Caseína. Células Somáticas. Lipases. Proteases. Psicrotóxicos.

EFFECT OF FACTORS ON THE PHYSICAL-CHEMICAL STABILITY ON THE SHELF LIFE MILK UHT

ABSTRACT

Among the animal foods most consumed milk stands out, in particular, milk treated by ultra-high temperature (UHT), since their practical conservation and use, and the long period of shelf life, but heat treatments (pasteurization and UHT), applied to the product, associated, sometimes, with poor quality of raw materials, act adversely on the physico-chemical properties responsible for maintaining the physical balance of the product. The objective of this study is to verify the correlation between physicochemical and microbiological characteristics and ripening index during the evaluation period of shelf life of UHT milk. 10 lots of UHT milk and their raw materials (raw and pasteurized milk) were collected in the processing plant in the city of Londrina-PR. The UHT milk samples were evaluated at days 0, 30, 60, 90 and 120 after manufacture. Was held on somatic cell count (SSC), mesophilic and psychrotrophic microorganisms in raw milk, pH, titratable acidity ($^{\circ}$ D), cryoscopic index ($^{\circ}$ H), fat (%), density (g L^{-1}), total dry stratum and degreased, sialic acid, protein fractions (true protein, crude protein and casein), sedimentation and rate of proteolysis in all samples. The Pearson correlation product moment (r) for proteolysis rate and microbial and somatic cell counts as well as the study of the kinetics of order (n) of the proteolysis of casein. It is observed that the Pearson correlations for all comparisons were significant for most of the storage time of UHT milks, having direct proportion. The order kinetics for the degradation of casein was 0.36, not fitting the classical kinetic models. The rate constant for degradation of casein (k) based on the order kinetics was $2.03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ per day for the samples studied. The main determinants of physical stability and degradation of milk during shelf life, are the microbiological quality and SCC in raw material, related to the release of heat resistant enzymes involved in the degradation of proteins, leading to the phenomenon of gelation and sedimentation, as well as off-flavors.

Keywords: Casein. Lipases. Proteases. Psychrotrophics. Somatic Cell.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Leite	13
3.2 Leite Pasteurizado	14
3.3 Leite UHT	15
3.4 Aspectos microbiológicos e de contagem de células somáticas da matéria-prima destinada ao leite fluído	16
3.5 Aspectos enzimáticos endógenos sobre a qualidade do leite e vida de prateleira	18
4 ARTIGO	21
5 REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de leite é a mais ampla do agronegócio brasileiro, estando presente em todo o território nacional, apresentando alto desempenho no setor alimentício, na geração de empregos e renda (SILVA; VELOSO, 2011), correspondendo a uma produção de 35 bilhões de litros em 2013 (MILK POINT, 2013).

A vida de prateleira do leite longa vida (UHT) é definido como sendo o tempo de armazenamento antes do qual os atributos qualitativos do leite sofram depreciação a níveis não aceitáveis para consumo. Destes, o sabor, a cor e a textura são os que maior relação possuem com o grau de aceitabilidade do produto entre consumidores (SCOTT, 2008).

Diferenças de sabor entre leites UHT integral recém-processados foram atribuídas predominantemente ao tipo de tratamento UHT aplicado (direto versus indireto) (SCOTT, 2008). Estes processos são responsáveis pelo aparecimento de sabores descritos como: leite aquecido; esterilizado (BURTON, 1988); e cozido (GOFF, 2008). Entretanto, a idade (PERKINS; DEETH, 2001) e a composição lipídica (OUPADISSAKOON; CHAMBERS; CHAMBERS, 2009) da matéria-prima já foram atribuídos como determinantes de *off-flavors* no leite UHT durante o armazenamento.

Dentre os aspectos relacionados à textura, a geleificação e a sedimentação são os defeitos que mais impactam a qualidade final do leite UHT (HOLANOWSKI, 2008), e os que mais frequentemente preocupam a indústria, já que determinam acentuada redução de vida de prateleira do produto (SILVA; ABREU, 2003). Diversos são os fatores que influenciam a gelificação do leite UHT, incluindo a natureza do tratamento térmico, a composição do leite, a sazonalidade da produção e a temperatura de armazenamento (DATTA; DEETH, 2001). Entretanto, a maior parte das pesquisas creditam às bactérias, principalmente as do grupo dos psicrotróficos, o aparecimento de geleificação no leite UHT devido à ação de suas proteases e lipases termorresistentes (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009) sobre a matéria-prima com contagens a partir de 10^7 UFC mL⁻¹ destes organismos (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

O processo de geleificação no leite UHT já foi relatado em produtos provenientes de matéria-prima com baixa contagem do microrganismo (WIKING *et al.*, 2002), sugerindo, desta forma, a ação enzimática endógena como responsável por este fenômeno (FOX; KELLY, 2006). De fato, a ativação do sistema plasminogênio-plasmina detém o maior potencial para causar quebra de proteínas (GRIEVE; KITCHEN, 1985).

Se a contagem bacteriana do leite cru for menor que 25.000 UFC mL⁻¹, a contagem de células somáticas no leite cru será o fator determinante e mais importante da vida de prateleira em leite pasteurizado, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de defeitos sensoriais quando o crescimento bacteriano pós-pasteurização é controlado (<500.000 UFC mL⁻¹), devido a atividade enzimática endógena (BARBANO; MA; SANTOS, 2006; FOX; KELLY, 2006).

Aparentemente, as lipases endógenas são inativadas pela pasteurização não causando lipólise no leite pasteurizado e produtos derivados (DEETH; 1993), enquanto as de origem bacteriana sobrevivem ao tratamento UHT (SILVA; ABREU, 2003). A lipólise altera predominantemente o sabor no leite UHT (SCOTT, 2008), mas sua influência sobre a viscosidade parece ter relação com o pH, os teores de gordura e de caseína do leite (DEETH; 1993).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar as relações entre os fatores determinantes de vida de prateleira de leite UHT.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química dos leites crus e pasteurizados utilizados para o beneficiamento do leite UHT;
- Avaliar a qualidade microbiológica, físico-química e índice de proteólise do leite UHT em diferentes tempos durante a vida de prateleira;
- Correlacionar as características microbiológicas e físico-químicas da matéria-prima (leite cru) com a proteólise do leite UHT em diferentes tempos de vida de prateleira.
- Determinar a ordem de cinética (n) da degradação de caseína no leite UHT.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite

Define-se por leite o produto integral, sem colostro, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias. O leite em seu aspecto biológico é descrito como o produto das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cujo objetivo natural é o de alimentar a prole recém-nascida (BRASIL, 2011).

É a composição do leite que, segundo Walstra e Jenness (1987) determinam a qualidade de nutrientes, seu valor como matéria-prima para a fabricação de produtos alimentícios e suas propriedades. O produto biológico não é totalmente compreendido pela sua composição, devendo-se conhecer a sua estrutura física e a disposição espacial de seus componentes.

Em seu aspecto físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de substâncias como: lactose, glicérides, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, entre outras, que podem estar em emulsão (gordura e substâncias associadas), em suspensão (caseínas ligadas a sais minerais) e outras substâncias em solução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, entre outros) (ORDÓÑEZ, 2005). Os sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) representam todos os constituintes do leite, exceto a água. O extrato seco desengordurado (ESD) designa todos os componentes do leite, exceto a água e a gordura (TRONCO, 2008).

A composição média do leite, segundo Walstra e Jenness (1987), é representada na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1 – Composição média do leite

Constituinte	% Teor (m/m)	% Variação (m/m)
Água	87,3	85,5 – 88,7
Lactose	4,6	3,8 – 5,3
Gordura	3,9	2,4 – 5,5
Proteínas	3,25	2,3 – 4,4
Minerais	0,65	0,53 – 0,80
Ácidos orgânicos	0,18	0,13 – 0,22
Outros	0,14	--

Fonte: Walstra e Jennes (1987).

O leite cru, ao ser coletado, deve imediatamente ser resfriado à 4 °C a fim de se evitar o crescimento microbiano mesófilo. De acordo com a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), são estabelecidos critérios para controle da matéria prima (Tabela 2).

Tabela 2 – Requisitos físico-químicos e microbiológicos para leite cru refrigerado

Parâmetro	Limites
Gordura (g 100 g ⁻¹)	Mínimo de 3,0
Densidade relativa a 15 °C (g mL ⁻¹)	1,028 a 1,034
Acidez titulável em ácido láctico (g 100 mL ⁻¹)	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado (g 100 g ⁻¹)	Mínimo de 8,4
Índice crioscópico	- 0,530 °H a – 0,550 °H
Proteínas (g 100 g ⁻¹)	Mínimo de 2,9
Contagem padrão em placas (UFC mL ⁻¹)	Máximo de 6,0 x 10 ⁵ *
Contagem de células somáticas	Máximo de 6,0 x 10 ⁵ **

Fonte: Brasil (2011)

* Até 30/06/2014 para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste. A partir de 01/07/2014 o limite máximo será alterado para 3,0 x 10⁵.

** Até 30/06/2014 para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste. A partir de 01/07/2014 o limite máximo será alterado para 5,0 x 10⁵.

3.2 Leite Pasteurizado

Antes do tratamento UHT, o leite cru deve passar por um tratamento térmico prévio, sendo o mais adotado a pasteurização. Nesta fase deve-se avaliar a acidez, a densidade, a gordura e a crioscopia do leite, visando sua liberação para o tratamento por UHT (PRATA, 1998; SANDROW; ARVANITOYANNIS, 2000).

Conforme a Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), o leite pasteurizado é o leite fluído que foi submetido ao tratamento térmico adequado – teste negativo para fosfatase alcalina e positivo para peroxidase – seguido de resfriamento rápido até 4 °C, sendo envasado no menor tempo possível.

A pasteurização é um processo utilizado na indústria de alimentos. O objetivo a ser alcançado através deste processo no leite é o de eliminar as bactérias

patógenas. Como consequência, ocorrem também a redução de esporos bacterianos e a inativação de certas enzimas endógenas (CHANDAN; KILARA; SHAH, 2008).

Para tanto, o processo pode apresentar diversos binômios de tempo/temperatura, desde que em todos eles se observem os padrões estabelecidos pela legislação (teste negativo para fosfatase alcalina e positivo para peroxidase), sendo que o mais utilizado é à 72-75 °C por 15 segundos (SMIT, 2003).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011) estabelece os padrões mínimos de qualidade do leite pasteurizado, que estão descritos na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 – Requisitos físicos, químicos e microbiológicos para o leite pasteurizado

Requisitos	Limites
Gordura (g 100 g ⁻¹)	Integral: mínimo de 3,0 Semidesnatado: entre 0,6 e 2,9 Desnatado: máximo de 0,5
Acidez titulável em ácido láctico (g 100 mL ⁻¹)	0,14 a 0,18
Estabilidade ao Alizarol 72 % (v/v)	Estável
Sólidos não gordurosos (g 100 g ⁻¹)	Mínimo de 8,4*
Índice crioscópico (°H)	-0,530 a -0,550
Contagem padrão em placas (UFC mL ⁻¹)	n = 5; c = 2; m = 4,0 x 10 ⁴ M = 8,0 x 10 ⁴
Coliformes NMP mL ⁻¹ (30/35 °C)	n = 5 ; c = 2 ; m = 2 M = 4
Coliformes NMP mL ⁻¹ (45 °C)	n = 5; c = 1; m = 1 M = 2
Salmonella spp (em 25 mL)	n = 5; c = 0; m = ausência

Fonte: Brasil (2011).

* Teor mínimo de SNG, com base no leite integral. Para os demais teores de gordura, esse valor deve ser corrigido pela seguinte fórmula: $SNG = 8,652 - (0,084 \times G)$ (na qual SNG = Sólidos Não-Gordurosos, g 100 g⁻¹; G = Gordura, g 100 g⁻¹).

3.3 Leite UHT

Entende-se por leite UHT (*Ultra High Temperature*) o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura 130 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma

temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o leite UHT deve atender as seguintes características sensoriais: aspecto líquido, cor branca, odor e sabor característicos, sem sabores nem odores estranhos. Para o leite UHT Integral em particular, deve atender as seguintes características físico-químicas: no mínimo 3 % de gordura, acidez entre 14 e 18 °D, estabilidade ao álcool 68 % e, no mínimo, 8,2 % de estrato seco desengordurado (ESD).

De acordo com Tronco (2003), a esterilização pelo processo UHT, que dá origem ao termo “longa vida”, tem como objetivo a obtenção de um produto comercialmente estéril e que conserve as características nutritivas e sensoriais do produto fresco.

Vida de prateleira prolongada é o principal atributo conferido aos produtos lácteos submetidos ao processamento UHT. A vida de prateleira do leite UHT é definida como sendo o tempo de armazenamento antes do qual os atributos qualitativos do leite sofram depreciação a níveis não aceitáveis para consumo (SCOTT, 2008).

3.4 Aspectos microbiológicos e de contagem de células somáticas (CCS) da matéria-prima destinada ao leite fluído

Uma elevada carga de microrganismos do gênero mesófilos, psicrotróficos e/ou termófilos no leite, pelo seu desenvolvimento, degradam constituintes – tais como a caseína, promovendo a agregação das micelas no leite – ou produzem substâncias capazes de alterar as propriedades físico-químicas, importantes na manutenção do produto. Matérias-primas alteradas de algum modo sofrerão, quando houver o processo por UHT ou posterior armazenamento e comercialização, alterações irreversíveis, modificando e comprometendo a qualidade do produto, ressaltando-se que grande parte das proteínas solúveis é representada pelas albuminas e globulinas, de conhecida sensibilidade térmica (PRATA, 1998).

A maior parte das pesquisas creditam às bactérias, principalmente as do grupo dos psicotróficos, o aparecimento de geleificação no leite UHT devido à ação de suas proteases e lipases termorresistentes (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009) de matéria-prima com contagens a partir de 10^7 UFC mL⁻¹ destes organismos (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005). Mesmo na literatura, não existe um consenso quanto à quantidade destes microrganismos que tornariam a matéria prima inviável (ZENI *et al.*, 2013). A presença dos microrganismos psicotróficos no leite com alta contagem está diretamente ligada à falta de higiene durante a produção (MIGUEL; TEODORO; AHASHIRO, 2007).

Conforme Smithwell e Kailasapathy (1995), a intensidade da contaminação no leite é variável, dependente da população microbiana do ambiente em que o alimento foi obtido, a qualidade do produto fresco, o método de manipulação, o tempo e as condições do armazenamento. O ponto mais importante na determinação da qualidade do leite é a contaminação por microrganismos psicotróficos.

Segundo Bishop e White (1998) e Craven e Macauley (1992), os microrganismos psicotróficos produzem quantidades significativas de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes, comprometendo a estabilidade física e a qualidade sensorial do leite, comprometendo, assim, a produção de derivados. Os mais encontrados em leite refrigerado cru e pasteurizado são os Gram negativos, provenientes do meio ambiente e dos equipamentos de ordenha. Dentre estes, são encontrados com maior frequência os microrganismos do gênero *Pseudomonas* (MUIR, 1996; ROBINSON, 2002).

O processo de geleificação no leite UHT já foi relatado em produtos provenientes de matéria-prima com baixa contagem de microrganismos psicotróficos (WIKING *et al.*, 2002), sugerindo a ação enzimática endógena (FOX; KELLY, 2006). De fato, a ativação do sistema plasminogênio-plasmina detém o maior potencial para causar quebra de proteínas (GRIEVE; KITCHEN, 1985).

Se a contagem bacteriana do leite cru for menor que 25.000 UFC mL⁻¹, a contagem de células somáticas do leite cru será o fator determinante e mais importante da vida de prateleira em leite pasteurizado, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de defeitos sensoriais quando o crescimento bacteriano pós-pasteurização é controlado (<500.000 UFC mL⁻¹) (BARBANO; MA; SANTOS, 2006).

Neste sentido, Kennedy e Kelly (1997) encontraram um aumento significativo na atividade da plasmina no leite cru com mais de 8×10^5 células mL^{-1} em relação ao leite que possuía $1,5 \times 10^5$ células mL^{-1} . Em trabalho semelhante, Fernandes *et al.* (2008), ao analisarem o efeito da contagem de células somáticas em leites entre 2 e 8×10^5 células mL^{-1} , perceberam que no leite UHT cuja matéria-prima possuía maiores contagens houve uma redução de até 20 % nos valores percentuais de β -caseína quando comparados ao de menor contagem.

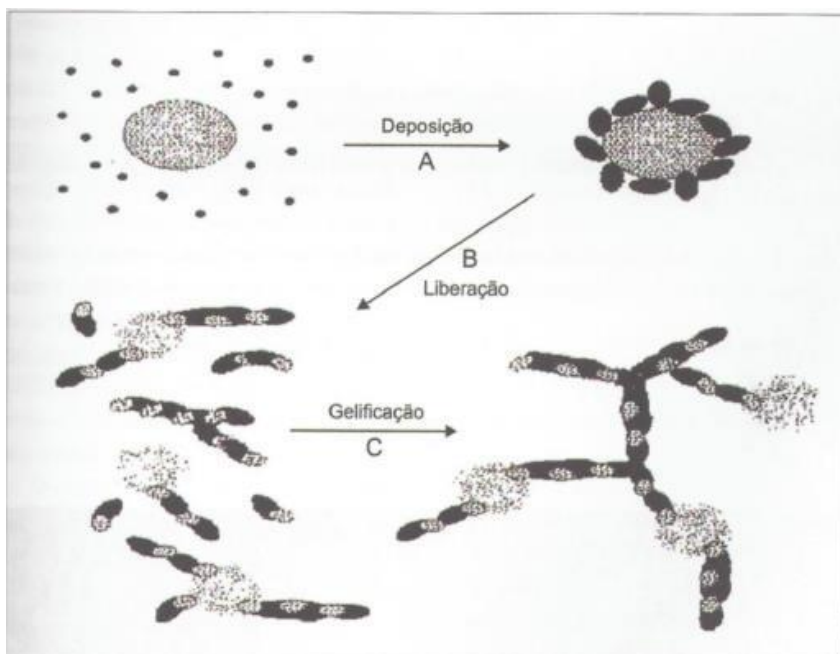
Diversos estudos são conflitantes quanto à influência de uma alta contagem de células somáticas e o aumento da lipólise no leite pasteurizado. Pesquisadores como Santos, Ma e Barbano (2003) encontraram relação entre uma alta CCS e o aumento da lipólise em leites pasteurizados. Já Cartier e Chilliard (1990) e Santos *et al.* (2007) não encontraram influência de CCS e aumento ou diminuição de lipólise em leites pasteurizados.

3.5 Aspectos enzimáticos sobre a qualidade do leite e vida de prateleira

O leite contém naturalmente enzimas que podem afetar a vida de prateleira dos produtos derivados. Existem aproximadamente 50 tipos diferentes de enzimas endógenas no leite, sendo as de principal estudo e importância as lipases e as proteases (RICHARDSON, 1983).

As proteases são enzimas que têm o poder de degradar a fração protéica do leite, sendo que a principal presente no leite é a plasmina, sendo responsável por até 90 % da proteólise (BARRY; DONNELLY, 1981). Em pH ácido e neutro, esta enzima não se inativa com os processos de pasteurização e UHT, o que a torna um problema para os produtos que tenham “longa vida” (SMIT, 2003). Além disto, o plasminogênio pode ser convertido em plasmina, principalmente em leites com alta contagem de células somática (VERDI; BARBANO, 1991). Sedimentação e geleificação são frequentemente relacionadas com a proteólise do leite, ou seja, diretamente com a atividade da plasmina (ARCURI *et al.*, 2008; VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

O mecanismo atualmente mais aceito para a geleificação em leites UHT é a proposta por Datta e Deeth (2001), onde este fenômeno se dá pela degradação proteica através das proteases. Na Figura 1 a seguir podemos compreender como funciona este mecanismo.



Fonte: Datta e Deeth (2001)

Figura 1- Esquema hipotético da formação de gel em leite UHT

Conforme a Figura 1, na reação A temos a deposição da β -lactoglobulina sobre κ -caseína durante o aquecimento UHT e formação do complexo β -lactoglobulina- κ -caseína. Na reação B ocorre a dissociação do complexo β -lactoglobulina- κ -caseína das micelas durante a estocagem do leite UHT devido a presença de proteases termorresistente. Na reação C é onde se dá a geleificação do leite pela formação de ligações cruzadas entre o complexo β -lactoglobulina- κ -caseína (DATTA; DEETH, 2001).

Diversos autores encontraram geleificação em leite UHT durante a estocagem. Santos, Okura e Rensis (2007) verificaram geleificação no leite UHT aos 60 dias de vida de prateleira. Datta e Deeth (2003) estudaram a geleificação proveniente de proteinases produzidas por *Pseudomonas* spp. e pela plasmina. Observaram que a geleificação causado pelas enzimas provenientes dos microrganismos formavam um gel firme e compacto, pois atuaram sobre a κ -caseína, assim como ocorre com a renina, já a plasmina degradava a β -caseína do interior da micela, não permitindo a formação de um gel coeso.

As proteinases de origem bacteriana podem ainda atuar de forma a acentuar a atividade da plasmina e do plasminogênio, já que estes se encontram associados às micelas de caseína e, ao ocorrer o rompimento destas micelas, conseqüentemente ocorrerá também a liberação da plasmina e do plasminogênio (BASTIAN; BROW, 1996; FAJARDO-LIRA; NIELSEN, 1998).

As lipases são enzimas que degradam os triacilgliceróis, que correspondem a 98 % dos lipídios do leite, produzindo ácidos graxos livres (SMIT, 2003). Aparentemente, as lipases endógenas são inativadas pela pasteurização não causando lipólise no leite pasteurizado e produtos derivados (DEETH; 1993), enquanto as de origem bacteriana sobrevivem ao tratamento UHT (SILVA; ABREU, 2003).

A lipólise altera predominantemente o sabor no leite UHT (SCOTT, 2008), mas sua influência sobre a viscosidade parece ter relação com o pH, os teores de gordura e de caseína do leite (DEETH; 1993).

Pesquisadores observaram um decréscimo no teor de gordura do leite UHT durante 150 dias de vida de prateleira, provavelmente devido à lipólise originada por lipases termorresistentes provenientes de microrganismos psicrotróficos que se desenvolveram no leite cru, sendo o teor inicial de 3,1 % decaindo para até 2,4 % de gordura (SANTOS; OKUMURA; RENSIS, 2007).

4 ARTIGO**CORRELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DA MATÉRIA PRIMA E ÍNDICE DE
PROTEÓLISE E DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE CINÉTICA DA
DEGRADAÇÃO DA CASEÍNA EM LEITE LONGA VIDA**

F.C. Santos¹; F.C. Erisson²; L.F. Dias²; M.S. Katsuda²; E.H.W. Santana¹; B.G. Botaro^{*1}

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Av. Paris,
675, Londrina, 86041-100, Paraná, Brasil.

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Tecnológica do
Paraná, Rua dos Pioneiros, 3131, Londrina, 860356-370, Paraná, Brasil.

* Autor para correspondência: Bruno Garcia Botaro, Fone: 55 43 3379 1565 - E-mail:
botaro.bruno@gmail.com

RESUMO

Os tratamentos térmicos (pasteurização e processo UHT) aplicados ao leite, associados, por vezes, à reduzida qualidade da matéria-prima, atuam desfavoravelmente sobre as propriedades físico-químicas responsáveis pela manutenção do equilíbrio físico do produto. Assim, o objetivo do presente estudo é o de verificar as correlações existentes entre as características físico-químicas, microbiológicas e índice de proteólise durante o período de avaliação de vida de prateleira do leite UHT. Foram coletados 10 lotes de leite UHT e suas respectivas matérias-primas (leite cru e pasteurizado) em usina de beneficiamento na cidade de Londrina-PR. As amostras de leite UHT foram avaliadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 após a fabricação. Realizou-se a contagem de células somáticas (CCS), microrganismos mesófilos e psicrotróficos do leite cru, de pH, acidez titulável ($^{\circ}\text{D}$), índice crioscópico ($^{\circ}\text{H}$), gordura (%), densidade (g L^{-1}), estrato seco total e desengordurado, ácido siálico, frações proteicas (proteína verdadeira, proteína bruta e caseína), sedimentação e índice de proteólise em todas as amostras. Procedeu-se a correlação produto-momento de Pearson (r) para índice de proteólise e as contagens microbianas e de células somáticas, bem como o estudo da cinética de ordem (n) da proteólise da caseína. Observa-se que as correlações de Pearson em todas as comparações foram significativas para a maioria dos tempos de armazenamento dos leites UHT, tendo relação diretamente proporcional. A cinética de ordem para a degradação de caseína foi de 0,36, não se enquadrando nos modelos clássicos de cinética. A constante de velocidade de degradação de caseína (k) com base na ordem de cinética foi de $2,03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ por dia para as amostras estudadas. Os principais fatores determinantes da estabilidade física e degradação do leite, durante a vida de prateleira, são a qualidade microbiológica e de CCS da matéria-prima, relacionadas à liberação de enzimas termorresistentes, envolvidas na degradação das proteínas, levando a ao fenômeno da geleificação e sedimentação, assim como de *off-flavors*.

Palavras-chave: Caseína. Células Somáticas. Lipases. Proteases. Psicrotróficos.

ABSTRACT

Heat treatments (pasteurization and UHT), applied to the milk, associated, sometimes, with poor quality of raw materials, act adversely on the physico-chemical properties responsible for maintaining the physical balance of the product. The objective of this study is to verify the correlation between physicochemical and microbiological characteristics and ripening index during the evaluation period of shelf life of UHT milk. 10 lots of UHT milk and their raw materials (raw and pasteurized milk) were collected in the processing plant in the city of Londrina-PR. The UHT milk samples were evaluated at days 0, 30, 60, 90 and 120 after manufacture. Was held on somatic cell count (SSC), mesophilic and psychrotrophic microorganisms in raw milk, pH, titratable acidity ($^{\circ}$ D), cryoscopic index ($^{\circ}$ H), fat (%), density (g L^{-1}), total dry stratum and degreased, sialic acid, protein fractions (true protein, crude protein and casein), sedimentation and rate of proteolysis in all samples. The Pearson correlation product moment (r) for proteolysis rate and microbial and somatic cell counts as well as the study of the kinetics of order (n) of the proteolysis of casein. It is observed that the Pearson correlations for all comparisons were significant for most of the storage time of UHT milks, having direct proportion. The order kinetics for the degradation of casein was 0.36, not fitting the classical kinetic models. The rate constant for degradation of casein (k) based on the order kinetics was $2.03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ per day}$ for the samples studied. The main determinants of physical stability and degradation of milk during shelf life, are the microbiological quality and SCC in raw material, related to the release of heat resistant enzymes involved in the degradation of proteins, leading to the phenomenon of gelation and sedimentation, as well as off-flavors.

Keywords: Casein. Lactic Lipases. Lactic Proteases. Psychrotrophics. Somatic Cell.

INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de leite é a mais ampla do agronegócio brasileiro, estando presente em todo o território nacional, apresentando alto desempenho no setor alimentício, na geração de empregos e renda (SILVA; VELOSO, 2011), correspondendo a uma produção de 35 bilhões de litros em 2013 (MILK POINT, 2013).

A vida de prateleira do leite UHT é definida como sendo o tempo de armazenamento antes do qual os atributos qualitativos do leite sofram depreciação a níveis não aceitáveis para consumo. Destes, o sabor, a cor e a textura são os que maior relação possuem com o grau de aceitabilidade do produto entre consumidores (SCOTT, 2008).

Diferenças de sabor entre leites UHT integral recém-processados foram atribuídas predominantemente ao tipo de tratamento UHT aplicado (direto versus indireto) (SCOTT, 2008). Estes processos são responsáveis pelo aparecimento de sabores descritos como: leite aquecido; esterilizado (BURTON, 1988); e cozido (GOFF, 2008). Entretanto, a idade (PERKINS, DEETH, 2001) e a composição lipídica (OUPADISSAKOON; CHAMBERS; CHAMBERS, 2009) da matéria-prima já foram atribuídos como determinantes de *off-flavors* no leite UHT durante o armazenamento.

Dentre os aspectos relacionados à textura, a geleificação e a sedimentação são os defeitos que mais impactam a qualidade final do leite UHT (HOLANOWSKI, 2008), e os que mais frequentemente preocupam a indústria, já que determinam acentuada redução de vida de prateleira do produto (SILVA; ABREU, 2003). Diversos são os fatores que influenciam a geleificação do leite UHT, incluindo a natureza do tratamento térmico, a composição do leite, a sazonalidade da produção e a temperatura de armazenamento (DATTA; DEETH, 2001). Entretanto, a maior parte das pesquisas creditam às bactérias, principalmente as do grupo dos psicrotróficos, o aparecimento de gelificação no leite UHT devido à ação de suas proteases e lipases termorresistentes (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009) sobre a matéria-prima com contagens a partir de 10^7 UFC mL⁻¹ destes organismos (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

O processo de geleificação no leite UHT já foi relatado em produtos provenientes de matéria-prima com baixa contagem do microrganismo (WIKING *et al.*, 2002), sugerindo, desta forma, a ação enzimática endógena como responsável por este fenômeno (FOX; KELLY, 2006). De fato, a ativação do sistema plasminogênio-plasmina detém o maior potencial para causar quebra de proteínas (GRIEVE; KITCHEN, 1985).

Se a contagem bacteriana do leite cru for menor que 25.000 UFC mL⁻¹, a contagem de células somáticas no leite cru será o fator determinante e mais importante da vida de prateleira em leite pasteurizado, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de defeitos sensoriais quando o crescimento bacteriano pós-pasteurização é controlado (<500.000 UFC mL⁻¹) (BARBANO; MA; SANTOS, 2006).

Aparentemente, as lipases endógenas são inativadas pela pasteurização não causando lipólise no leite pasteurizado e produtos derivados (DEETH; 1993), enquanto as de origem bacteriana sobrevivem ao tratamento UHT (SILVA; ABREU, 2003). A lipólise altera predominantemente o sabor no leite UHT (SCOTT, 2008), mas sua influência sobre a viscosidade parece ter relação com o pH, os teores de gordura e de caseína do leite (DEETH; 1993).

O objetivo deste trabalho foi correlacionar a qualidade da matéria prima utilizada para beneficiamento do leite UHT com seu índice de proteólise em diferentes tempos durante a vida de prateleira, bem como determinar a ordem de cinética para a degradação da caseína no leite UHT.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e frequência de coleta de amostras

As amostras de leite foram coletadas durante o período de abril de 2013 a maio de 2013 em usina de beneficiamento localizada no Município de Londrina-PR, com volume de produção diária média de 400.000 litros de leite UHT. Foram coletados 10 lotes de leite UHT (constituídos de 12 amostras cada um – sendo cada amostra uma caixa de 1 L – totalizando 120 amostras), e de seus respectivos

pasteurizados e crus que originaram aquele produto. As amostras foram coletadas em dias aleatoriamente selecionados durante o período de coleta.

Caracterização das amostras

Amostras de leite cru: a matéria-prima utilizada para beneficiamento proveu das mesorregiões norte central, nordeste e centro-ocidental paranaense, de rebanhos leiteiros com produção diária média de 100 litros. O leite cru, após ordenhado, era mantido refrigerado ($3 - 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) nas propriedades leiteiras por período máximo de 48 horas, quando era então transportado em tanques isotérmicos inoxidáveis até a usina, onde permanecia em silo único com volume de 70.000 litros, *in natura*, sob homogeneização contínua à temperatura de $1 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 6 horas até sua pasteurização. As amostras de leite cru foram coletadas diretamente dos silos antes da pasteurização, no volume de 1 L, e imediatamente submetidas às análises.

Amostras de leite pasteurizado: O leite foi submetido à pasteurização *High Temperature Short Time (HTST – Alta Temperatura Curto Tempo)* em trocador de calor em placas (TETRA PAK[®], 1996). Após o tratamento térmico, o leite era então acondicionado em silo único com volume de 70.000 litros e mantido à temperatura de $1 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período máximo de 3 horas até sua esterilização. As amostras de leite pasteurizado foram coletadas diretamente dos silos antes da esterilização, no volume de 1 L, e imediatamente submetidas às análises.

Amostras de leite UHT: o método de processamento UHT na referida usina foi o de injeção direta de vapor no leite, em sistema fechado, com trocador de calor em placas (TETRA PAK[®], 1996), em equipamentos com capacidade produtiva horária de 18.000 litros de leite. Antes do processamento UHT, o leite pasteurizado foi adicionado de citrato de sódio e *blend* de fosfatos de sódio (mono, di e trifosfato), nas concentrações de $0,03\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$ e $0,03\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 1997). As amostras de leite UHT foram coletadas imediatamente após o envase e submetidas ao armazenamento à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e U.R. de 70 % ($\pm 1\text{ }%$) durante 0, 30, 60, 90 e 120 dias após fabricação.

Análises microbiológicas

Contagem total de bactérias mesófilas (CTBM): foram determinadas conforme metodologia descrita na Instrução Normativa 62 do MAPA, através de contagem padrão por placas, com semeadura de diferentes diluições em meio de cultura ágar padrão (PCA) e incubação em temperatura de 36 ± 1 °C por 48 horas. A contagem foi realizada nas placas que continham entre 25 e 250 colônias e os resultados expressos em UFC mL⁻¹, descrito pela AOAC (WEHR & FRANK, 2004).

Contagem total de bactérias psicrotólicas (CTBP): foram determinadas conforme metodologia descrita na Instrução Normativa 62 do MAPA. Nessa determinação, utilizou-se o método de contagem padrão por placas, com semeadura de diferentes diluições em meio de cultura ágar padrão (PCA) e incubação a 7 °C por 10 dias, aprovado por Standard Methods for the Examination of Dairy Products / APHA – American Public Health Association e MAPA – AUP n. 894/2001; descrito pela AOAC (WEHR & FRANK, 2004).

Análises físico-químicas

As amostras de leite cru e UHT em todos os tempos de armazenamento foram submetidas às análises de pH, acidez titulável de Dornic (°D), índice crioscópico (°H), gordura (%), densidade (g L⁻¹), EST (%) e ESD (%) conforme descrito por AOAC (2003); e a prova de estabilidade ao etanol a 80 °GL, conforme CHAVEZ *et al.* (2003).

Avaliação da concentração de ácido siálico: a determinação de ácido siálico nas amostras de leite foi realizada conforme metodologia aprovada pela Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006), por meio da avaliação da presença de glicomacropéptido por espectrofotometria a 470 nm, liberado após a hidrólise da κ -caseína (FUKUDA *et al.*, 1994), sendo os resultados expressos em mg mL⁻¹.

Contagem de células somáticas: a contagem de células somáticas (CCS) da amostra de leite cru foi realizada por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico (International Organization for Standardization & International Dairy Federation, International Standard - ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:

2006), utilizando-se equipamento Somacount 300[®] (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN, EUA), no Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (BRASIL, 2011), e os resultados expressos em células somáticas por mililitro de leite (CS mL⁻¹).

Avaliação da composição das frações proteicas: as análises para determinação dos teores de nitrogênio proteico, proteína verdadeira e caseína das amostras de leite cru, pasteurizado e UHT foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Leite do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Norte do Paraná, Londrina, como descrito:

Proteína Bruta: a determinação do teor de proteína bruta (PB) foi baseada na mensuração da concentração do nitrogênio total (NT) pelo método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists*; método número 33.2.11; 991.20 (AOAC, 2003). Para a expressão do resultado em PB, a concentração de NT obtida foi multiplicada pelo fator 6,38, pois o nitrogênio presente em proteínas do leite representam aproximadamente 15,68 % (m/m).

Proteína Verdadeira: a proteína verdadeira foi precipitada em solução de ácido tricloracético a 12%. Após a precipitação, a fração foi separada por filtração e a concentração de nitrogênio contida no filtrado, o nitrogênio não proteico (NNP), foi determinada pelo método de Kjeldahl. Assim, o teor de proteína verdadeira do leite foi obtido pela subtração do valor de NNP da concentração de NT da amostra, multiplicado pelo fator de 6,38 (LYNCH; BARBANO; FLEMING, 1998).

Caseína: a caseína foi precipitada em pH 4,6 (ponto isoelétrico) usando-se solução de ácido acético e, em seguida, adicionado o acetato de sódio para neutralização do pH. Após a precipitação, a fração foi separada por filtração e a concentração de nitrogênio contida no filtrado, o nitrogênio não caseinoso (NNC), determinada pelo método de Kjeldahl. Assim, a concentração de caseína do leite foi obtida pela subtração do valor de NNC da concentração de NT da amostra, multiplicado pelo fator de 6,38 (LYNCH; BARBANO; FLEMING, 1998).

Avaliação do índice de proteólise: o índice de proteólise das amostras de leite cru, pasteurizado e UHT em todos os tempos de armazenamento foi

estimado a partir da avaliação da relação da concentração de caseína pela de proteína verdadeira.

Avaliação da integridade de barreira da embalagem: após a abertura da embalagem UHT, para o posterior curso das respectivas análises da amostra, a mesma foi avaliada quanto sua hermeticidade e integridade, conforme orientação do fabricante da mesma (TETRA PAK[®], 1996) de modo a excluir aquelas amostras cuja barreira física estivesse rompida.

Análise da sedimentação e geleificação: a avaliação da sedimentação e geleificação foram realizadas de forma qualitativa, conforme descrito por Ramsey e Swartzel (1984) e Hassan, Amjad, e Mahmood (2009).

Delineamento experimental e análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Realizou-se então a estatística descritiva dos dados.

De modo a remover a heterogeneidade das variâncias, os dados de CCS e de contagens bacterianas mesofílicas e psicrotróficas foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 (\log_{10}) para a análise estatística, e à função antilogarítmica para apresentação dos resultados. A análise dos dados foi precedida de teste de homogeneidade de variâncias, verificando a distribuição dos dados. Os tempos de armazenamento foram separados e categorizados.

Os dados das análises físico-químicas foram submetidos a análise de variância, seguida do teste de Tukey para a determinação das diferenças considerando $p < 0,05$ para o nível de significância, por meio do programa *MINITAB Statistical Software*, versão 13. Quando aplicável, a relação causal entre a variável resposta e o fator independente foi mensurada por meio da análise do coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (PIMENTEL GOMES, 1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação microbiológica e de contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) em leite é fundamental para indicar a qualidade físico-química do leite (SANTOS; MA; BARBANO, 2003). De acordo com a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), a contagem de células somáticas no leite cru não deve ultrapassar o limite de 600.000 células mL⁻¹.

TABELA 1

Desta forma, pode-se observar que nenhum dos lotes ultrapassam o limite estabelecido pela Instrução Normativa nº 62. Observou-se ainda que para os lotes 2 e 3 os valores encontrados de CCS estão abaixo dos demais, o que pode indicar um alto controle destes produtores em relação à mastite (ZAFALON *et al*, 2008). É importante salientar que a mastite pode levar a alterações na composição do leite, principalmente em suas frações proteicas, podendo ocorrer um decréscimo na quantidade total de caseína com aumento das proteínas do soro, mesmo sem haver alterações aparentes na proteína total do leite (FONSECA; SANTOS, 2000).

Avaliação Físico-Química

A Tabela 2 a seguir descreve as médias para as avaliações físico-químicas do leite UHT nos diferentes tempos de armazenamento.

TABELA 2

Pode-se observar que os valores para a acidez titulável têm aumento significativo ($p < 0,05$) ao longo do tempo, de 0,7 °D, considerando-se o de 0 a 120 dias de armazenamento. Da mesma forma, observa-se um decréscimo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no valor do pH ao longo dos 120 dias de armazenamento. Isto pode ser explicado pela atuação da lipases termorresistente, provenientes de microrganismos psicotróficos contidos no leite cru, que degradam os lipídios produzindo ácidos graxos livres (DEETH; 1993; SILVA; ABREU, 2003; SHIPE, 1981). Pesquisas indicam que a maior associação de *off-flavors* em leite UHT é proveniente da

degradação da fração lipídica (SCOTT, 2008), principalmente os triacilgliceróis, que compõem cerca de 98 % destes compostos (SMIT, 2003).

Não se observou alterações significativas ($p < 0,05$) no conteúdo de gordura (entre 3,01 e 3,04 %) e ácido siálico (entre 4,54 e 4,70 $\mu \text{ mL}^{-1}$) durante os 120 dias de armazenagem do leite UHT.

Nas análises físicas de crioscopia, as amostras não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), bem como se mantiveram dentro dos padrões de qualidade. Em relação à densidade, a amostra no tempo zero se diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais, porém todas as amostras se encontraram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1997).

O estrato seco total (EST) se manteve entre 11,58 e 11,71 % (m/v), sendo que as amostras apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$). Para o estrato seco desengordurado (ESD) apenas a amostra com 0 dias de armazenamento diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais, estando, em todas as amostras, acima do mínimo exigido pela legislação (BRASIL, 1997).

Avaliação do índice de proteólise

Na Tabela 3 a seguir são apresentados os índices de proteólise para os leites cru, pasteurizado e UHT no tempo de armazenamento zero dos dez lotes.

TABELA 3

Apesar dos coeficientes apresentarem um aumento do leite cru para o pasteurizado e UHT, isto não significa que houve diminuição do índice de proteólise. Como a proteólise foi determinada através da relação caseína:proteína verdadeira, ou os valores de caseína aumentam, ou o de proteína verdadeira diminuem. Conforme os dados de caseína e proteína verdadeira obtidos, a primeira afirmação é a que se mostrou correta. Este “aumento” nos teores de caseína é explicado através da formação do complexo β -lactoglobulina- κ -caseína, formado devido à desnaturação da β -lactoglobulina ocasionada pelo processamento térmico UHT, passando esta então a se ligar a κ -caseína (DATTA; DEETH, 2001).

A formação deste complexo é citada por Datta e Deeth (2001) como o principal fator para a ocorrência da geleificação em leites UHT (sem ocorrência em leite cru e pasteurizado), pois é exatamente devido à proteólise deste complexo proteico e posterior formação de ligações cruzadas (sítios polares e apolares) levando a formação de uma “rede”, que e ao chegar em um ponto crítico ocorre o fenômeno da geleificação.

Correlação entre índice de proteólise e avaliação microbiológica e de CCS

Na Tabela 4 a seguir podemos observar os resultados para a correlação produto-momento de Pearson entre as contagens microbiológicas (mesófilos e psicrotróficos) e CCS com os índices de proteólise (caseína:proteína verdadeira) dos leites cru, pasteurizado e UHT nos diferentes tempos de armazenamento.

TABELA 4

Segundo Cohen (1988), a interpretação da correlação de Pearson (r) ocorre da seguinte forma: valores entre 0,10 e 0,29 podem ser considerados pequenos; valores entre 0,30 e 0,49 podem ser considerados médios; e valores entre 0,50 e 1 podem ser interpretados como grandes.

Desta forma, ao observa-se na Tabela 3 que a correlação entre mesófilos e proteólise no leite cru, pasteurizado, UHT T₀, T₃₀ e T₆₀ pode ser considerada grande, enquanto que com o UHT T₉₀ não houve correlação. Quanto aos psicrotróficos, verificamos que apenas no cru não é observada correlação. Ao analisarmos a CCS, existe um score de correlação grande com o leite cru, pasteurizado, UHT T₀ e T₉₀, não tendo correlação nas amostras UHT T₃₀ e T₆₀.

Ao se analisar estes dados, pode-se verificar que o maior fator determinante para a proteólise em leite UHT será a contagem total de bactérias psicrotróficas. A maioria das pesquisas credita a estes microrganismos a aparição de defeitos durante a vida de prateleira do produto, principalmente o fenômeno da geleificação, devido à liberação de enzimas proteolíticas que não são inativadas pelo processo de esterilização UHT (DATTA; DEETH, 2003; NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009; VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

Determinação da ordem de cinética da degradação da caseína

Na Tabela 5 a seguir se encontram os resultados de caseína e a relação caseína:proteína verdadeira nos diferentes tempos de vida de prateleira do leite UHT.

TABELA 5

Para os resultados de caseína o tempo 0 apresentou-se significativamente diferente ($p < 0,05$) dos demais, sendo que os tempos 30 e 60 são iguais entre si, assim como os tempos 90 e 120. Através dos resultados, pode-se afirmar que a caseína diminui com o passar do tempo de armazenamento. O decréscimo entre o dia 0 e 120 foi de aproximadamente 21 % (0,51 unidades).

A partir das médias de caseína nos diferentes tempos de vida de prateleira analisados construiu-se um gráfico (Figura 1). A partir deste, calculou-se a correlação linear, obtendo-se assim uma equação para a reta (Equação 1). O coeficiente de determinação (R^2) pôde então ser obtido, correspondendo a um valor de 0,97628. Apesar de não existir um valor fixo para referência do coeficiente de determinação, nas ciências exatas entende-se que valores acima de 0,90 são satisfatórios (SAMOHYL, 2009).

$$y = -0,00417x + 2,338 \quad \text{(Equação 1)}$$

FIGURA 1

A partir da extrapolação da reta na análise de correlação linear, estimou-se o tempo de meia vida, um quarto de vida, um terço de vida, três quartos de vida e de total degradação da caseína nos lotes de leite. O tempo de meia vida estimado foi de aproximadamente 276 dias, já um quarto de vida em 134 dias, um terço de vida em 181 dias, três quartos de vida 418 dias e o tempo de total degradação estimado foi de aproximadamente 560 dias.

Realizou-se então a determinação da ordem da cinética de reação através do método de Tempos de Vida Parciais (utilizando-se $T_{1/2}$, $T_{1/3}$, $T_{3/4}$ e $T_{1/4}$) (LEVENSPIEL, 1998). O valor encontrado para a ordem de cinética foi de 0,36. Segundo Oliveira e Faria (2010), ao serem encontradas cinéticas de ordens não inteiras há uma indicação de que estão ocorrendo mecanismos mais complexos do que

nos casos clássicos de ordens inteiras. Conforme Azeredo (2012), em alimentos a simplificação em ordens inteiras não é apreciável, devido à complexidade das alterações que ocorrem.

A partir do cálculo da ordem de cinética, procedeu-se a determinação da constante de velocidade de reação (k) a partir da média dos valores obtidos na Equação 2.

$$k = \frac{(1,33)^{n-1} - 1}{(n-1)t_{1/4}C_{A0}^{n-1}} \quad \frac{(1,50)^{n-1} - 1}{(n-1)t_{1/3}C_{A0}^{n-1}} \quad \frac{2^{n-1} - 1}{(n-1)t_{1/2}C_{A0}^{n-1}} \quad \frac{4^{n-1} - 1}{(n-1)t_{3/4}C_{A0}^{n-1}} \quad \text{(Equação 2)}$$

Encontrou-se um valor de $2,03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ por dia, ou seja, pode-se afirmar que a cada dia de armazenamento há uma degradação de $2,03 \times 10^{-3}$ gramas de caseína para cada 100 gramas de leite. A unidade comercial de leite UHT são caixas contendo aproximadamente 1.031 gramas do produto (1.000 mL; densidade média de $1,031 \text{ g cm}^3$), o que leva a uma degradação diária de aproximadamente 0,021 gramas de caseína.

CONCLUSÃO

Os padrões físico-químicos se encontraram dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Houve correlação significativa entre a contagem de células somáticas e microbiológicas com o índice de proteólise para a maioria dos casos analisados, indicando uma relação diretamente proporcional, devido à produção de enzimas exógenas e/ou ativação das endógenas. Os resultados demonstram que a vida de prateleira do leite UHT está diretamente relacionada à qualidade da matéria prima.

A ordem de cinética para a degradação de caseína não pôde ser enquadrada em ordens clássicas inteiras, demonstrando a complexidade das reações envolvidas. A constante de velocidade para a degradação de caseína foi de $2,03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ por dia, com um tempo de meia vida de 276 dias.

5 CONCLUSÃO

Os padrões físico-químicos se encontraram dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Houve correlação significativa entre a contagem de células somáticas e microbiológicas com o índice de proteólise para a maioria dos casos analisados, indicando uma relação diretamente proporcional, devido à produção de enzimas exógenas e/ou ativação das endógenas. Os resultados demonstram que a vida de prateleira do leite UHT está diretamente relacionada à qualidade da matéria prima.

A ordem de cinética para a degradação de caseína não pôde ser enquadrada em ordens clássicas inteiras, demonstrando a complexidade das reações envolvidas. A constante de velocidade para a degradação de caseína foi de $2,03 \times 10^{-3} \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ por dia, com um tempo de meia vida de 276 dias.

6 REFERÊNCIAS

[AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 11.ed. Arlington, 1990.

[AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 23 ed. Arlington, 2003.

[APHA] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington, APHA, 1992.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGEL, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, Santa Maria, 2008.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2 ed. DF, Brasília: Embrapa, 2012.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**. V. 89, E. Suppl., p. 15-19, 2006.

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.

BASTIAN, E. D.; BROW, R. J. Plasmin in milk and dairy products un update. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 435-437, 1996.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. **Journal of Food Protection**, v. 52, 0. 805-807, 1988.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT), 1997. Disponível em: <http://www.agais.com/normas/leite/leite_uat.htm>. Acesso em: 30 out. 2012.

_____. Portaria nº 56, de 07 de dezembro de 1999. Submete à consulta pública os regulamentos técnicos sobre produção, identidade e qualidade de todos os tipos de leite e coleta de leite cru resfriado e transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 de dez. de 1999.

_____. 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

_____. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, 2011. Disponível em: <[www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011\(2\)](http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011(2))>. Acesso em: 30 out. 2012.

BURTON, H. Ultra-High Temperature Processing of Milk and Milk Products. **Elsevier Applied Science Publishers**, London, 1988.

CARTIER, P.; CHILLIARD, Y. Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of nine characteristics in native milk. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 5, p. 1178-1186, 1990.

CHANDAN, R. C.; KILARA, A.; SHAH, N. P. **Dairy processing and quality assurance**. Iowa, Ames: Wiley-Blackwell, 2008.

CHAVEZ, M.S.; NEGRI, L.M.; TAVERNA, M.A.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal Dairy Research**, v.71, p. 201-206, 2004.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale, NJ, Erlbaum, 1988.

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 47, p. 38-45, 1992.

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

_____. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Wädenswil, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.

DEETH, H. C. Lipase activity and its effects on milk quality. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 48, p. 96-8, 1993.

FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 901-908, 1998.

FERNANDES, A. M.; BOVO, F.; MORETTI, T. S.; ROSIM, R. E.; LIMA, C. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Casein fractions of ultra high temperature milk with diferente somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 149-152, 2008.

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

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 500-516, 2006.

FUKUDA, S. P.; ROIG, S. M.; PRATA, L. F. Metodologia analítica para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. In: **12º Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora. Anais, ILCT, p. 144-20, 1994.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Vet. J.**, v. 176, p. 50-57, 2008.

GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. **Journal of Dairy Research**, v. 52, p. 101-12, 1985.

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

HOLANOWSKI, A. **Tetra Pak UHT Technology Seminar LTH**. Disponível em: <http://www.foodandnutrition.lth.se/fileadmin/livsmedelsteknik/images/BLT0100303/UHT_theory_LTH.pdf>. Acesso em: 10 out 2012.

IDF- International IDF Standard, 148-2: 2006.

KENNEDY, A.; KELLY, A. L. The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. **International Dairy Journal**, v.7, p.717-721, 1997.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas: cinética química aplicada**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998.

LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M.; FLEMING, J. R. Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 81, p. 763-74, 1998.

MIGUEL, E. M.; TEODORO, V. A. M.; AHASHIRO, E. K. N. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 63, n. 355, p. 38-42, 2007.

MILK POINT. **Produção de leite no Brasil deve ser de 37 bilhões de litros em 2014.** 2013. Disponível em: < <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/producao-de-leite-no-brasil-deve-ser-de-37-bilhoes-de-litros-em-2014-86951n.aspx>>. Acesso em: 25 de junho de 2014.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 67-72, 1996.

NÖRNBERG, M. F. B.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, A. P.; FARIA, R. B. Ordens não inteiras em cinética química. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1412-1415, 2010 .

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. v. 2. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

OUPADISSAKOON, G.; CHAMBERS, D. H.; CHAMBERS, E. Comparison of the sensory properties of UHT milk from different countries. **Journal of sensory studies**, v. 24, p. 427-440, 2009.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JR., L. C. G. **Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos**. Juiz de Fora: Epamig, 2001.

PERKINS, M. L.; DEETH, H. C. A survey of Australian consumers' attitudes towards UHT milk. **Aust. J. Dairy Technol**, v. 56, p. 28–34, 2001.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1985.

PRATA, L. F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 54, p. 10-15, 1998.

RAMSEY, J. A.; SWARTZEL, K. R. Effect of UHT processing and storage conditions on rates of sedimentation and fat separation of aseptically packaged milk. **Journal Food Science**, v. 49, p. 257-262, 1984.

RICHARDSON, B. C. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 18, p. 233-245, 1983.

ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook**. 3 ed. N.Y., New York, Wiley-Interscience, 2002.

SAMOHYL, R. W. **Controle estatístico de qualidade**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2009.

SANDROW, D. K.; ARVANITOYANNIS, I. S. Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) to the dairy industry: current status and perspectives. **Food Reviews International**, London, v. 16, n. 1, p. 77-111, 2000.

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

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

SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R.; BOTARO, B. G. Efeito da remoção de células somáticas pela microfiltração sobre a lipólise do leite. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 315-321, 2007.

SCOTT, D. UHT processing and aseptic filling of dairy foods. 2008. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – KANSAS STATE UNIVERSITY, Manhattan, KANSAS, EUA, 2008.

SILVA, P. H. F.; ABREU, L. R. Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n.334, p. 19-25, 2003.

SILVA, J. P. M; VELOSO, C. M. **Manejo para maior qualidade do leite**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2011.

SMIT, G. **Dairy processing: improving quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2003.

SMITHWELL, N.; KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk: problems with shelf life. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 29-31, 1995.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-41, 1997.

SHIPE, W.F.; SENYK, G.F. Effects of processing conditions on lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 2146-9, 1981.

TETRA PAK. Dairy processing handbook. Lund, Sweden, 1996. 1 CD-ROM.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do Leite**. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2003.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2008.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 772-782, 1991.

VIDAL-MARTINS, A. M. *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.

ZAFALON, L.F; NADER, A. F.; CARVALHO, M. R. B.; LIMA, T. M. A. Influência da mastite subclínica bovina sobre as frações proteicas do leite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.2, p.135-140, abr./jun., 2008.

ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc e Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987.

WEHR, H.H., FRANK, J.F. Microbiological count methods. In: **Standard Methods for the examination of dairy products**. 17.ed. Washington: American Public Health Association, 2004.

WIKING, L.; FIRST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H.. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, p. 190-194, 2002.

ANEXOS

Tabela 1 – Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e contagem de células somáticas dos 10 lotes de leite cru refrigerado, representativas das matérias-primas utilizadas para a fabricação do leite UHT integral durante os meses de abril a maio de 2013 em cooperativa de Londrina, PR.

Lotes	Data	Mesófilos (UFC mL⁻¹)	Psicrotróficos (UFC mL⁻¹)	CCS¹ (CS mL⁻¹)
1	09/04/2013	1,24 x 10 ⁷	1,12 x 10 ⁷	1,50 x 10 ⁵
2	11/04/2013	2,35 x 10 ⁷	6,85 x 10 ⁶	0,29 x 10 ⁵
3	12/04/2013	2,40 x 10 ⁷	2,00 x 10 ⁷	0,18 x 10 ⁵
4	14/04/2013	7,50 x 10 ⁶	8,50 x 10 ⁶	4,81 x 10 ⁵
5	14/04/2013	5,20 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁷	4,60 x 10 ⁵
6	21/04/2013	2,60 x 10 ⁷	4,55 x 10 ⁷	4,83 x 10 ⁵
7	22/04/2013	1,85 x 10 ⁷	1,88 x 10 ⁷	4,51 x 10 ⁵
8	24/04/2013	6,10 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁶	3,91 x 10 ⁵
9	30/04/2013	3,10 x 10 ⁷	2,58 x 10 ⁷	4,11 x 10 ⁵
10	01/05/2013	3,50 x 10 ⁶	6,60 x 10 ⁶	3,84 x 10 ⁵

Fonte: Autor.

¹ Contagem de células somáticas

Tabela 2 – Índice de proteólise de 10 lotes de leite UHT integral imediatamente após fabricação (T₀), pasteurizado e cru, determinadas pela relação caseína:proteína verdadeira, durante os meses de abril a maio de 2013 em cooperativa de Londrina, PR.

Lotes	Leite Cru	Leite Pasteurizado	Leite UHT
1	0.54	0.58	0.77
2	0.60	0,66	0.74
3	0.62	0,70	0.77
4	0.52	0.58	0.83
5	0.52	0.53	0.76
6	0.55	0.69	0.75
7	0.58	0.64	0.82
8	0.80	0.80	0.77
9	0.57	0.60	0.73
10	0.59	0.59	0.75

Fonte: Autor.

Tabela 3 – Análise da correlação (r) entre as contagens de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, contagem de células somáticas, obtidas de 10 lotes de leite cru durante os meses de abril a maio de 2013, e o índice de proteólise (C:PV) mensurado no leite cru, pasteurizado e UHT integral após 0, 30, 60 e 90 dias da vida de prateleira fabricados durante o mesmo período em cooperativa de Londrina, PR.

Variável	Cru	Pasteurizado	UHT (T ₀)	UHT (T ₃₀)	UHT (T ₆₀)	UHT (T ₉₀)
Mesófilos	0,710	0,531	0,517	0,694	0,547	0,079
Psicrotróficos	0,192	0,682	0,799	0,786	0,770	0,575
CCS ¹	0,972	0,777	0,530	0,037	0,062	0,580

Fonte: Autor.

¹ Contagem de células somáticas

$p < 0,05$, com nível de significância de 5%.

Tabela 4 - Médias e erros-padrão ($\bar{x} \pm s$) das variáveis físico-químicas avaliadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias da vida de prateleira de 10 amostras de lotes de leite UHT integral, fabricados durante os meses de abril a maio de 2013 em cooperativa de Londrina, PR.

Variável	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	T ₁₂₀
Acidez (°D)	14,7 ^d ± 0,1	14,8 ^{c, d} ± 0,1	14,9 ^{b, c} ± 0,1	15,2 ^b ± 0,2	15,4 ^a ± 0,1
pH	6,72 ^a ± 0,01	6,70 ^b ± 0,01	6,68 ^c ± 0,01	6,67 ^{a, b, c, d} ± 0,13	6,66 ^d ± 0,01
Gordura (% m/v)	3,04 ^a ± 0,02	3,01 ^a ± 0,03	3,03 ^a ± 0,03	3,03 ^a ± 0,03	3,03 ^a ± 0,03
Crioscopia (°H)	0,541 ^a ± 0,002	0,541 ^a ± 0,001	0,541 ^a ± 0,001	0,540 ^a ± 0,001	0,539 ^a ± 0,001
Densidade (g mL ⁻¹)	1030,7 ^b ± 0,2	1031,1 ^a ± 0,1	1031,3 ^a ± 0,2	1031,1 ^a ± 0,2	1031,2 ^a ± 0,2
EST (% m/v)	11,58 ^b ± 0,03	11,63 ^{a, b} ± 0,05	11,71 ^a ± 0,05	11,66 ^{a, b} ± 0,06	11,68 ^a ± 0,06
ESD (% m/v)	8,53 ^b ± 0,04	8,61 ^a ± 0,03	8,67 ^a ± 0,05	8,63 ^a ± 0,05	8,65 ^a ± 0,05
Ácido siálico (µg mL ⁻¹)	4,54 ^a ± 0,29	4,65 ^a ± 0,27	4,63 ^a ± 0,30	4,70 ^a ± 0,29	4,65 ^a ± 0,28

Fonte: Autor.

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de vida de prateleira para a variável avaliada

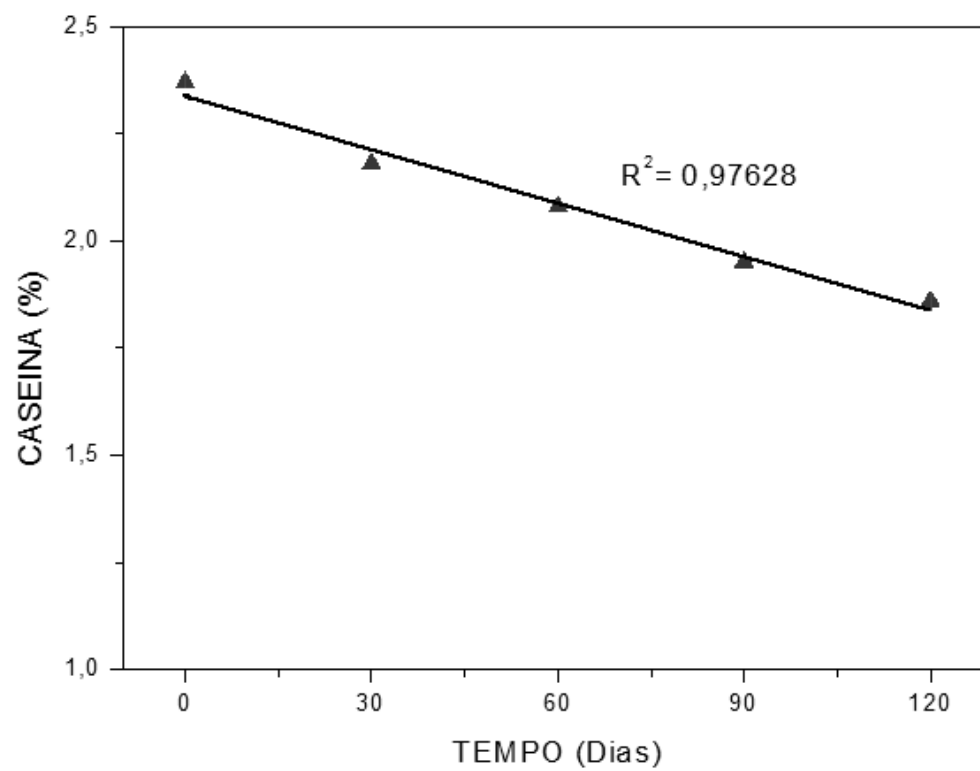
Tabela 5 – Médias e erros-padrão das médias caseína e relação caseína:proteína verdadeira avaliados nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias da vida de prateleira de 10 amostras de lotes de leite UHT integral, fabricados durante os meses de abril a maio de 2013 em cooperativa de Londrina, PR.

Vida de Prateleira (dias)	Caseína (%)	Caseína:PV
0	2,37 ^a ± 0,284	0,769 ^a ± 0,0103
30	2,18 ^b ± 0,0622	0,705 ^b ± 0,0093
60	2,08 ^b ± 0,0529	0,659 ^b ± 0,0121
90	1,95 ^c ± 0,0721	0,614 ^{bc} ± 0,0150
120	1,86 ^c ± 0,0742	0,578 ^c ± 0,0185

Fonte: Autor.

^{abc} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de vida de prateleira para a variável avaliada

Figura 1 - Gráfico de degradação de caseína ao longo de 120 dias de vida de prateleira.



Fonte: Autor.