



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

RENATO ROBERTO DA SILVA

**Influência das contagens de células somáticas e dos microrganismos
psicrotróficos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade e índice
proteolítico em leite UHT**

Patos de Minas - MG

2021

RENATO ROBERTO DA SILVA

Influência das contagens de células somáticas e dos microrganismos psicrotróficos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade e índice proteolítico em leite UHT

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia – campus Patos de Minas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadora: Milla Gabriela dos Santos

Patos de Minas - MG

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2021	<p>Silva, Renato Roberto da, 1985- Influência das contagens de células somáticas e dos microrganismos psicrotróficos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade e índice proteolítico em leite UHT [recurso eletrônico] / Renato Roberto da Silva. - 2021.</p> <p>Orientador: Milla Gabriela dos Santos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.635 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Alimentos - Indústria. I. Santos, Milla Gabriela dos, 1984-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 664</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Patos
 de Minas

Av. Getúlio Vargas, 230 - Bairro Centro, Patos de Minas-MG, CEP 38700-103
 Telefone: (34) 3823-3714 - www.ppgea.feq.ufu.br - coordppgea@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia de Alimentos				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico n. 10/2021 - PPGEA				
Data:	Vinte de dezembro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	15:00	Hora de encerramento:	17:34
Matrícula do Discente:	42012EAL015				
Nome do Discente:	Renato Roberto da Silva				
Título do Trabalho:	Influência das contagens de células somáticas e dos microrganismos psicrotróficos sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade e índice proteolítico em leite UHT				
Área de concentração:	Engenharia de Alimentos				
Linha de pesquisa:	Processos Biotecnológicos				

Reúne-se por webconferência (RNP - MConf) a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, assim composta: Milla Gabriela dos Santos (Presidente), Emiliane Andrade Araújo Naves e Felipe Machado de Sant'Anna.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa apresentou a Comissão Examinadora e o discente, agradeceu a participação do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da mesma se deu em conformidade às normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o discente. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos legais, a Banca Examinadora, em sessão secreta, atribuiu o conceito final, considerando o discente:

Aprovado.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico integra os requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme será assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Gabriela dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/12/2021, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Machado de Sant'Anna, Usuário Externo**, em 20/12/2021, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emiliane Andrade Araújo Naves, Usuário Externo**, em 20/12/2021, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3209904** e o código CRC **EC1706AF**.

Referência: Processo nº 23117.081759/2021-14

SEI nº 3209904

RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do nível das CS e dos PSI presentes em dez lotes de leite cru, sobre a qualidade do leite antes e após processamento UHT, no decorrer da vida de prateleira, avaliando os parâmetros físico-químicos de qualidade e índices de proteólise. O leite cru foi avaliado quanto ao nível de CS, bactérias totais, PSI e características físico-químicas, submetido à pasteurização rápida, clarificação e padronização da gordura, em seguida foi efetuada a esterilização comercial por processo UHT direto, depois envasado assepticamente. As análises do leite UHT foram realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 de armazenamento. Adicionalmente, os lotes foram categorizados em grupos de média, intermediária e alta CCS, foram também divididos em baixo, médio e alta contagem de PSI. Nos testes de significância estatística, ($p < 0,05$), para o leite cru, apenas a estabilidade ao álcool foi superior em níveis mais baixos de CS. Já no leite pasteurizado não foi observada influência da CS ou dos PSI nos parâmetros de qualidade avaliados. Ao comparar o leite cru com o pasteurizado, foi observada redução da CS em todas as amostras após pasteurização/clarificação. Para o leite UHT, não foram observadas alterações significativas nos resultados de acidez, gordura, extrato seco total, viscosidade, densidade e lactose relacionados aos grupos de CS ou de PSI. Os valores de pH, proteína verdadeira, caseína, índice de proteólise e sedimentação apresentaram alterações significativas ao longo do armazenamento. Os índices de proteólise e caseína foram influenciados pelos grupos de alta CS e PSI. A viscosidade aumentou no decorrer do armazenamento, porém sem diferença significativa entre os grupos estabelecidos. Conclui-se que, a CS e parte dos resultados de PSI apresentaram valores elevados, indicando que os aspectos higiênico-sanitários ainda deixam a desejar. As altas contagens influenciaram no aumento da proteólise da caseína, contudo foram em níveis que não causaram alterações visuais ou sensoriais que pudessem causar rejeição por parte dos consumidores.

Palavras-chave: células somáticas, psicrotróficos, leite UHT, mastite, proteólise.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the influence of the level of SC and PSI present in ten batches of raw milk, on the quality of milk before and after UHT, processing throughout its shelf life, evaluating the physicochemical quality parameters and indices of proteolysis. Raw milk was evaluated for SC level, total bacteria, PSI, and physicochemical characteristics, subjected to rapid pasteurization, clarification, and standardization of fat, followed by commercial sterilization by direct UHT process, then aseptically filled. UHT milk analyzes were performed on days 0, 30, 60, 90, and 120 of storage. Additionally, the lots were categorized into groups of the medium, intermediate and high SC, further divided into low, medium, and high PSI counts. In tests of statistical significance, ($p < 0.05$), for raw milk, only alcohol stability was superior at lower SC levels. In pasteurized milk, however, there was no influence of CS or PSI on the quality parameters evaluated. When comparing raw and pasteurized milk, a reduction in CS was observed in all samples after pasteurization/clarification. For UHT milk, no significant changes were observed in the results of acidity, fat, total dry extract, viscosity, density, and lactose related to CS or PSI groups. The values of pH, true protein, casein, proteolysis index, and sedimentation showed significant changes during storage. Proteolysis indices were influenced by high CS and PSI groups. Viscosity increased during storage, but with no significant difference between the established groups. It is concluded that CS and PSI presented high values, indicating that the hygienic-sanitary aspects still fall short. The high counts influenced the increase in casein proteolysis, however, they were at levels that did not cause visual or sensory changes that could cause rejection by consumers.

Keywords: somatic cells, psychrotrophics, UHT milk, mastitis, proteolysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem do arranjo micelar da caseína.....	22
Figura 2 – Planta UHT sistema injeção direta de vapor	45
Figure 3 - Divisão das amostras baseado nos resultados de CCS e PSI.....	53
Figura 4 - Estabilidade ao álcool em relação aos níveis de CCS estabelecidos	56
Figura 5 - Comparativo entre os resultados de mesófilos e psicotróficos das 10 amostras do estudo.....	57
Figura 6 - Comparativo entre os resultados de CCS, cru x pasteurizado, das 10 amostras do estudo.....	62
Figura 7 - Evolução do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	63
Figura 8 - Evolução do pH no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS .	64
Figura 9 - Evolução da acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento (CCS)	65
Figura 10 – Evolução do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	66
Figura 11 - Evolução do pH no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI .	67
Figura 12 - Evolução da acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	67
Figura 13 - Evolução da densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	69
Figura 14 – Evolução da densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	70
Figura 15– Evolução do EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	70
Figura 16 - Evolução do EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	71
Figura 17 - Evolução da lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	72
Figura 18 - Evolução da lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	72

Figura 19 - Evolução da gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	73
Figura 20 – Evolução da gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.	73
Figura 21 - Evolução da viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	74
Figura 22 - Evolução da viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	75
Figura 23 – Evolução da proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	77
Figura 24 - Evolução da proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	77
Figura 25 - Evolução da proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	78
Figura 26 - Evolução da proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	79
Figura 27 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	80
Figura 28 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	81
Figura 29 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	81
Figura 30 - Diferença significativa entre os grupos de CCS relacionada a variável caseína (Kjeldalh), representação do dia de estocagem 120.....	82
Figura 31 - Evolução da caseína no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS.....	82
Figura 32 – Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	83
Figura 33 – Evolução da Caseína no decorrer do período de armazenamento, representação do grupo alta PSI.....	84
Figura 34 – Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	86
Figura 35 - Diferença significativa entre os grupos de CCS relacionada a variável índice de proteólise (Kjeldalh), representação do dia de estocagem 120	86

Figura 36 - Evolução da proteólise no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS.....	86
Figura 37 – Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	87
Figura 38 - Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	89
Figura 39 - Evolução da proteólise no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI	89
Figura 40 - Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	90
Figura 41 - Evolução da proteólise (c-GMP) no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI.....	91
Figura 42 - Evolução da sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	93
Figura 43 - Evolução da sedimentação no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS.....	93
Figura 44 - Evolução da sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	94
Figura 45 - Evolução da sedimentação no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade em relação aos três níveis de CCS.	55
Tabela 2 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade em relação aos níveis de PSI.	56
Tabela 3 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade do leite pasteurizado em relação aos níveis de CCS.....	60
Tabela 4 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade do leite pasteurizado em relação aos níveis de PSI.....	61

Tabela 5 – Resultados do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	63
Tabela 6 - Resultados de acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	65
Tabela 7 - Resultados do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.	66
Tabela 8 – Resultados de acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	67
Tabela 9 – Resultados de densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS	69
Tabela 10 - Resultados de densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	69
Tabela 11 - Resultados de EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	70
Tabela 12 - Resultados de EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI	71
Tabela 13 – Resultados de lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	71
Tabela 14 – Resultados de lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	72
Tabela 15 – Resultados de gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	73
Tabela 16 – Resultados de gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	73
Tabela 17 – Resultados de viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	74
Tabela 18 – Resultados de viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	75
Tabela 19 - Resultados de proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	76
Tabela 20 – Resultados de proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	77
Tabela 21 - Resultados de proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	78

Tabela 22 - Resultados de proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	78
Tabela 23 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	80
Tabela 24 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	80
Tabela 25 – Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	81
Tabela 26 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	83
Tabela 27 – Resultados de índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	85
Tabela 28 - Resultados de índice de proteólise c-GMP do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	87
Tabela 29 - Resultados de índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	88
Tabela 30 - Resultados de índice de proteólise c-GMP do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	90
Tabela 31 - Resultados de sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.....	92
Tabela 32 - Resultados de sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL - Ácidos graxos livres

C - Caseína

CCS - Contagem de células somáticas

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CS - Células somáticas

CG – Contagem global de bactérias
c-GMP – glicomacropéptido de caseína
cP - Centipoise
EST - Sólidos totais
gr - Grama
HT-ST - High Temperature – Short Time
IC - Índice crioscópico
Kg - Quilograma
L - Litro
mg - Miligrama
mL - Mililitro
NNC - Nitrogênio não-caseinoso
NNP - Nitrogênio não-proteico
NT - Nitrogênio total
PV - Proteína verdadeira
PSI – Microrganismos psicotróficos
Rpm - Rotações por minuto
UFC - Unidade formadora de colônia
UHT – Ultra High Temperature

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Composição do Leite.....	19
2.2	Proteínas do Leite	20
2.2.1	Caseína.....	21
2.2.2	Proteínas do Soro	22
2.3	Considerações sobre Mastite e Contagem de Células Somáticas (CCS) 23	
2.3.1	Mastite clínica, mastite ambiental e mastite contagiosa.....	24
2.3.2	Mastite subclínica.....	25
2.3.3	Legislação acerca da CCS e incentivos para melhoria da qualidade 26	
2.3.4	Células Somáticas e seus efeitos na composição do leite	26
2.4	Proteólise	28
2.4.1	Proteases de origem bacteriana (Psicrotróficas).....	28
2.4.2	Proteases de origem endógena (Mastite)	31
2.4.3	Plasmina no leite.....	31
2.5	Processo UHT	33
2.5.1	Efeitos do aquecimento sobre os constituintes do leite.....	34
2.6	Estabilidade térmica do leite.....	37
2.7	Métodos de Monitoramento da Proteólise em Leite	38
2.7.1	Método da Ninidrina Ácida	40
2.7.2	Cromatografia – CLAE / HPLC.....	40
2.7.3	Outros métodos para detecção de CMP no Leite.	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43

3.1	Descrição da usina de beneficiamento do leite UHT	43
3.2	Leite cru refrigerado e leite pasteurizado	45
3.2.1	Amostragem.....	45
3.2.2	Análises Físico-químicas	45
3.2.2.1	Estabilidade ao álcool	46
3.2.2.2	Acidez	46
3.2.2.3	Proteína total, Lactose, Caseína, EST, Matéria Gorda, Índice de Crioscopia e Densidade.....	46
3.2.2.4	Determinação da viscosidade	47
3.2.3	Análises microbiológicas	47
3.2.3.1	Contagem de Células Somáticas.....	47
3.2.3.2	Contagem Global de bactérias Mesófilas e Psicotróficas	48
3.2.4	Avaliação da Proteólise.....	48
3.2.4.1	Stick c-GMP	49
3.2.4.2	Determinação da proteólise a partir das análises de frações de nitrogênio	49
3.3	Leite UHT	52
3.3.1	Amostragem.....	52
3.3.2	Análises Físico-químicas	52
3.3.2.1	Grau de sedimentação.....	52
3.3.3	Avaliação da Proteólise.....	53
3.4	Análise dos Resultados	53
3.4.1	Análise Estatística dos resultados.....	54
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Avaliação do Leite Cru	54
4.2	Avaliação do Leite Pasteurizado	59
4.2.1	CCS leite cru x CCS leite pasteurizado.....	62
4.3	Avaliação do Leite UHT	63

4.3.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade físico-químicos e índices de proteólise, relacionados aos resultados de CCS e PSI do leite cru.	63
4.3.1.1 pH e Acidez	63
4.3.1.2 Densidade, gordura, extrato seco total, lactose e viscosidade.....	68
4.3.1.3 Proteína, método Infravermelho e Kjeldahl.....	76
4.3.1.4 Caseína, método Infravermelho e Kjeldahl.....	79
4.3.1.5 Índices de proteólise, métodos Kjeldahl e Stick c-GMP	85
4.3.1.6 Sedimentação.....	92
5 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Art. 235 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (DECRETO 10.468, 2020), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas.

Trata-se de um alimento de alto valor nutritivo, fonte de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e sais minerais. Contém em torno de 87,6% de água, 12,4% de sólidos totais, 4,52% de lactose, 3,61% de gordura e 3,28% de proteína. A caseína é a principal proteína do leite, enquanto a lactose é o açúcar característico e o sólido mais predominante (ALMEIDA, 2013).

A qualidade do leite é definida por parâmetros físico-químicos, sanidade do animal lactante, higiene na ordenha e estocagem. Os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética, raça e sanidade do animal (ALMEIDA, 2013).

O leite longa vida UHT “ultra high temperature” consagrou-se como uma alternativa altamente segura e confiável para o consumo de leite no Brasil. Apresentada ao país em 1972, a tecnologia que prolonga a vida do leite dispensa utilização de conservantes e preserva as qualidades naturais do produto (SANTOS et al., 2018).

Alterações indesejáveis podem ocorrer durante o período de validade do UHT após processamento, como a sua desestabilização, com consequente formação de gel ou sedimentos no fundo da embalagem (SILVA, 2017).

A principal causa dos problemas observados no leite UHT é a má qualidade da matéria-prima. O processo UHT promove a “esterilização comercial” do leite, processo que elimina quase a totalidade da microbiota presente, no entanto, muitas enzimas proteolíticas e lipolíticas endógenas (secretadas pela glândula mamária) e exógenas (produzidas por microrganismos psicotróficos) permanecem estáveis ao tratamento térmico e continuam causando alterações durante o armazenamento do leite UHT (SILVA, 2014).

A inflamação da glândula mamária, denominada mastite, destaca-se como um dos principais fatores que alteram a qualidade do leite destinado ao consumo humano, devido ao aumento da liberação de células somáticas (CS) e aumento da atividade enzimática no leite (FERNANDES, 2007).

As Células Somáticas são todas as células presentes no leite, incluindo as originárias da corrente sanguínea como os leucócitos e as células de descamação do epitélio glandular secretor. Em quantidades elevadas exercem influência prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite. (MULLER, 2002).

Para mitigar alterações após o processamento UHT, é imprescindível que o leite cru que atenda padrões mínimos de qualidade. As consequências tecnológicas desfavoráveis tanto para o processamento como para o produto final, podem ser reduzidas quando são atendidos os quesitos básicos para a matéria prima que é entregue nas plataformas.

Este trabalho justifica-se pela importância econômica da produção de leite bovino no Brasil, em especial no estado de Minas Gerais, que movimenta a economia e contribui expressivamente na distribuição de renda e gera empregos no meio urbano e rural. Dessa forma, a avaliação do leite cru em níveis de Células Somáticas e de microrganismos psicotróficos é de grande importância, por se tratar de um dos quesitos mais envolvidos nas alterações do leite e derivados. Nos processos produtivos em laticínios, estas informações servem de embasamento para investimentos que promovam melhoria contínua da qualidade, visando garantir atividade viável e confiabilidade por parte dos consumidores.

1.1 Objetivos

Este estudo teve como propósito avaliar a influência do nível de células somáticas e dos microrganismos psicotróficos presentes no leite cru sobre a qualidade do leite UHT durante o tempo de vida de prateleira de 120 dias, através de avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos e dos índices de proteólise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição do Leite

A quantidade e a qualidade do leite, juntamente com sua composição, podem variar de acordo com fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre estes fatores destacam-se a raça, fisiologia, período de lactação, alimentação, saúde, período de cio, idade, características individuais, clima, espaço entre as ordenhas, estações do ano, doenças, fraudes e adulterações, dentre outros (VIDAL; SARAN NETTO, 2018).

A biossíntese de muitos constituintes do leite relaciona-se a constituição sanguínea e às condições do epitélio da glândula mamária, e está sobre o controle hormonal do animal. É estimado que exista cerca de cem mil constituintes distintos relacionados ao leite, embora a maioria deles não tenha ainda sido identificada (COSTA, 2014).

A água é a maior fração presente no leite, na qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes. E em sua maior parte encontrada como água livre, embora haja água ligada aos constituintes como proteínas, lactose e substâncias minerais (SILVA, 2003).

A estrutura lipídica presente no leite encontra-se em forma de pequenos glóbulos de gordura e contém, principalmente, triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoproteica. O leite de vaca possui, aproximadamente, 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oleico (COSTA, 2014).

A gordura é o constituinte mais susceptível a variações quantitativas e qualitativas, principalmente em razão da alimentação, raça, estação do ano e período de lactação. Além disso, essa fração lipídica pertencente ao leite tem como propriedade a absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (VALSECHI, 2001).

No leite também são encontrados muitos compostos nitrogenados, dentre esses, aproximadamente 95% são proteínas e 5% compostos nitrogenados não-proteicos. O nitrogênio proteico é a fração do leite, considerada mais importante do ponto de vista econômico, e é constituído de cerca de 80% de nitrogênio caseínico (caseínas) e de 20% de nitrogênio não-caseínico representado pelas proteínas do soro e outras frações peptídicas (COSTA, 2014).

O leite contém também diversas enzimas endógenas, como as lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. Algumas destas enzimas são utilizadas no controle de qualidade do leite, a exemplo da fosfatase alcalina, que é um dos indicadores de eficiência da pasteurização do leite (SILVA, 2003).

Os açúcares do leite são constituídos pela lactose, que é formada a partir da associação entre glicose e galactose. Este glicídio pode ser modificado em sua estrutura, principalmente, por ação de tratamentos térmicos, o que ocasiona possíveis reações de escurecimento, em que ocorre uma diminuição do valor nutricional do leite, proporcional à intensidade e o tempo de aquecimento (SILVA, 2003).

Dentre as principais propriedades nutricionais da lactose, destaca-se a ação benéfica sobre a microbiota intestinal de recém-nascidos, fonte de energia, acidificação do tubo digestivo e aumento na microbiota intestinal, além de contribuir com a síntese de outros elementos, como as proteínas e o colesterol (VASECHI, 2001).

Em se tratando dos sais minerais presentes no leite, aqueles que mais se destacam são os fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos, e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Desses, os mais importantes nutricionalmente são os sais associados ao cálcio e ao fósforo, pois contribuem para formação e manutenção óssea (COSTA, 2014).

As associações entre os sais e as proteínas do leite são determinantes para a estabilidade das caseínas frente a diferentes agentes desestabilizantes, principalmente fosfato de cálcio que, particularmente, faz parte da estrutura das micelas de caseína e proporciona a estabilidade da fase coloidal (SILVA JÚNIOR, 2001).

2.2 Proteínas do Leite

As proteínas do leite são as substâncias mais representativas da chamada fração nitrogenada do leite. Essa fração é constituída por dois grupos, dos quais o principal é o das proteínas, sendo o outro formado por matérias nitrogenadas não proteicas (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

O nitrogênio proteico do leite é constituído de cerca de 80 por cento de nitrogênio caseínico e de 20 por cento de nitrogênio não-caseínico (albuminas e globulinas). Diversos fatores influenciam na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça, alimentação e teor energético da alimentação (FILHO et al., 2009).

Em suma, são seis produtos genéticos da glândula mamária de caráter majoritário: α 1-caseínas, α 2-caseínas, β -caseínas, κ -caseínas, β lactoglobulinas e α -lactoalbuminas. Todas as caseínas formam um complexo esférico altamente hidratado, contendo fosfato de cálcio, denominado micela (COSTA, 2014).

2.2.1 Caseína

De acordo com Costa (2014), a caseína tem uma composição de aminoácidos apropriada para o desenvolvimento dos animais jovens. A micela não é formada apenas por caseína, mas também por compostos de baixo peso molecular, que recebem o nome de fosfato coloidal, também conhecido pela sigla CCP (*colloidal calcium phosphate*); apesar de seu nome, o CCP não é formado apenas de fosfato cálcico, mas também de citrato, magnésio e outros elementos minerais.

As micelas são partículas esféricas com diâmetro entre 40 μ m e 300 μ m ou mais e são bastante hidratadas. Graças às características anormais das caseínas e do complexo micelar, as proteínas do leite podem separar-se facilmente em duas das frações caseína e proteína do soro (VIDAL; SARAN NETTO, 2018).

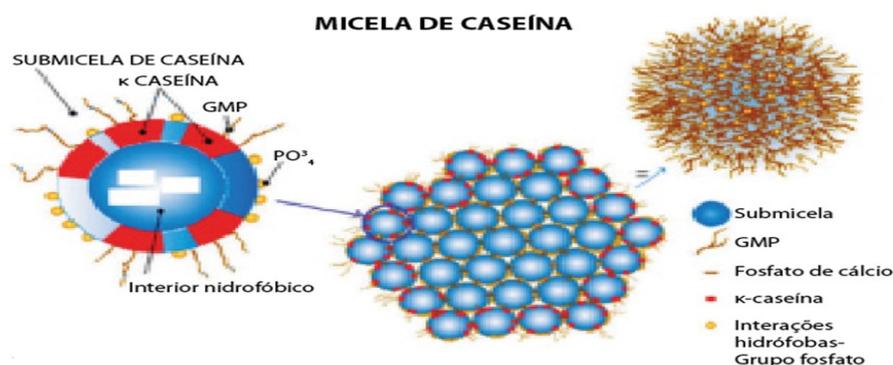
A caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica, constituída de subunidades micelares (submicelas) de 15 nm a 20 nm de diâmetro, que tem ao redor de 10 moléculas de outros quatro tipos de caseína (α 1, α 2, β , κ) em proporções variáveis (VIDAL; SARAN NETTO, 2018).

A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α 1-, α 2-, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela (MALMGREN et al., 2017)

De acordo com Vidal e Neto (2018), a estrutura micelar da caseína é importante na digestão do leite no estômago e no intestino. Também é a base para os produtos da indústria de laticínios e a base para separar facilmente componentes proteicos de outros componentes do leite.

O arranjo micelar das subunidades de caseína, conforme (Figura 1), confere à micela resistência aos tratamentos térmicos industriais e estabilidade aos derivados lácteos durante a armazenagem nas prateleiras do comércio varejista, uma vez que precipitados poderiam ocorrer se houvesse alterações principalmente na concentração de κ -caseína e de cálcio iônico do leite (BRASIL et al., 2015).

Figura 1 - Imagem do arranjo micelar da caseína.



Fonte: Di Martins, A. (2012). <http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/fatores-que-alteram-a-estabilidade-do-leite>.

A estrutura aberta das micelas de caseína, resultantes da clivagem da κ -caseína, facilita o acesso de proteinases. Essa clivagem expõe o interior hidrofóbico da micela de caseína, resultando em susceptibilidade das micelas de caseína em formar coágulo (FORTUNA, 2015).

2.2.2 Proteínas do Soro

Segundo Filho et al., (2009), as proteínas mais abundantes no soro de leite são a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina. No leite de vaca, a mais abundante é a β -lactoglobulina, que corresponde a 9,5% do nitrogênio total (NT) do leite e 50% das proteínas do soro.

Entre as quatro principais proteínas do soro, apenas duas são sintetizadas na glândula mamária (β -lactoglobulina e α -lactalbumina), enquanto as outras são originadas do sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). Em condições normais, a β -lactoglobulina é a proteína do soro presente em maior concentração no leite (AUGUSTO; REZENDE, 2010).

A função biológica da β -lactoglobulina ainda não é totalmente conhecida, mas está associada com o metabolismo do fosfato na glândula mamária e no transporte da vitamina A e outras moléculas hidrofóbicas, como os ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos (BRASIL et al., 2015).

A β -lactoglobulina é uma proteína termolábil e apresenta certa capacidade de sequestrar o cálcio em um dado pH; os níveis de cálcio determinam as interações da β -lactoglobulina com as demais proteínas do leite (BRASIL et al., 2015).

2.3 Considerações sobre Mastite e Contagem de Células Somáticas (CCS)

A inflamação da glândula mamária, denominada mastite, destaca-se como um dos principais fatores que diminuem a qualidade do leite destinado ao consumo humano, acarretando aumento na liberação de células somáticas (CS) no leite (DIAS, 2007).

Quando a glândula mamária é colonizada por algum agente patogênico, o organismo do animal reage, mandando para o local células de defesa, na tentativa de reverter o processo infeccioso. As células de defesa, somadas às células de descamação do epitélio secretor de leite nos alvéolos, são chamadas células somáticas do leite (NETO; ZAPPA, 2011).

A mastite pode ser causada por injúria química, mecânica ou infecção microbiológica, sendo esta última, a mais comum. Considerando-se a relação direta entre a ocorrência de mastite e a perda das características do leite, justifica-se o crescente interesse na realização de estudos que avaliem o impacto da contagem de células somáticas (CCS) sobre a qualidade do leite e seus derivados (LANGONI, 2013).

Cerca de 90% das mastites são ocasionadas por bactérias, principalmente dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. As espécies *Streptococcus agalactiae* e

Staphylococcus aureus são os agentes mais comuns da mastite (CUNHA et al., 2008a).

As consequências dessa patologia são alterações nas propriedades físico-químicas do leite e no parênquima glandular. Existem duas formas de apresentação, que se denominam mastite clínica, quando as alterações são visíveis macroscopicamente e mastite subclínica, quando as alterações não são visíveis a olho nu (HADRICH et al., 2018).

2.3.1 Mastite clínica, mastite ambiental e mastite contagiosa

A mastite caracteriza-se pelo aparecimento de edemas, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária ou aparecimento de grumos, pus ou quaisquer alterações das características do leite. Leva a perdas elevadas por descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas e até por morte do animal, pode ser de origem contagiosa ou ambiental. (FONSECA; SANTOS, 2001).

O diagnóstico da mastite clínica é possível pela avaliação do aspecto do leite, quanto às características peculiares desse produto, à existência de grumos e às alterações do parênquima glandular, como o aumento de temperatura, vermelhidão local e consistência enrijecida da glândula (MULLER, 2002).

A mastite clínica pode ser causada por vários patógenos, na maioria dos casos, os principais são os *Coliformes* e *Streptococos* ambientais, sendo que a maioria das mastites causadas por coliformes apresentam cura espontânea. Já as mastites causadas por *Streptococos* ambientais (Ex. *S. Uberis* e *S. dysgalactiae*) apresentam baixa taxa de cura espontânea, mas respondem bem ao tratamento quando realizado da forma correta (LANGONI, 2013).

Os microrganismos causadores da mastite clínica são classicamente divididos em espécies contagiosas ou ambientais. A distinção entre estes dois grupos de microrganismos depende, principalmente, de sua forma de transmissão. O perfil de bactérias contagiosas é caracterizado pela transmissão de vaca para vaca, enquanto o perfil de transmissão ambiental é caracterizado pela infecção da vaca por bactérias de origem do ambiente (CUNHA et al., 2008b).

O diagnóstico de mastite contagiosa ou ambiental em nível de rebanho só pode ser realizado com precisão quando as três fontes de informações (análise dos dados, avaliação dos fatores de risco e perfil de infecção) são avaliadas detalhadamente (DIAS, 2007).

2.3.2 Mastite subclínica

Por não apresentar sinais visíveis, a mastite subclínica pode passar despercebida. Promove alterações na composição do leite, tais como aumento na CCS e alterações nos teores de caseína, cálcio, gordura e lactose, determinando menor rendimento na produção dos seus derivados e diminuindo o tempo de prateleira dos produtos (DIAS, 2007).

Na mastite subclínica não existem sinais evidentes da doença, não sendo possível diagnosticá-la sem a utilização de testes auxiliares. Salientam, ainda, estes autores que o sinal clássico da mastite subclínica é a elevação da CCS, que pode ser mensurada direta ou indiretamente por meio dos testes *California Mastitis Test* (CMT), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) ou pela contagem eletrônica de células somáticas (CCS) (CUNHA et al., 2008b).

O teste CMT é prático, pois pode ser feito na hora da ordenha, possibilitando a detecção de vacas com a doença subclínica. Os primeiros jatos de cada teto devem ser colocados numa placa especial, na qual é adicionado o reagente púrpura de bormocresol. Por meio de agitação da placa e o aspecto que a mistura adquirir (leite mais reagente) referente a viscosidade e formação de grumos, pode-se saber se há ou não presença de infecção (LANGONI, 2013).

Já a contagem de células somáticas (CCS) no leite é um exame laboratorial específico, que expressa o número de células somáticas por mililitro de leite, determinada através de citometria de fluxo que, com o auxílio de produtos químicos como o brometo de etídio, marca o DNA nas células somáticas do leite, as quais por tornarem-se fluorescentes, emitem um flash de luz, que passará por uma série de filtros ópticos que as contarão (Somacount 300, Bentley Instruments, EUA) (SILVA et al., 2012).

2.3.3 Legislação acerca da CCS e incentivos para melhoria da qualidade

Os parâmetros microbiológicos recentemente sofreram alterações importantes. Para o leite cru refrigerado, além da redução dos valores para contagem bacteriana total, está estabelecida pela Instrução Normativa Nº 76/2018 que para a contagem de células somáticas (CCS) a média geométrica trimestral máxima ficou estabelecida em 500.000 células/mL em nível de produtor de leite. A periodicidade de análises CCS continua mensal (BRASIL, 2018).

É importante esclarecer as diferenças entre pagamento por qualidade e regulamentação da qualidade. Ainda que sejam temas correlacionados, as normas de produção de leite no Brasil não implicam que haverá pagamento por qualidade (MATTIELLO et al., 2018).

Programas de pagamento baseados na qualidade do leite são utilizados em vários países do mundo, inclusive no Brasil, como incentivo para melhoria da qualidade do leite. Desta forma, os laticínios oferecem recompensas financeiras aos produtores que atendem aos parâmetros estipulados (SILVA, 2017).

Trata se de um acordo entre fornecedor e comprador, devendo, todavia, ser consideradas as várias peculiaridades de cada indústria e de cada região. Desta forma, parâmetros de legislação e pagamento por qualidade não devem ser considerados sinônimos, e em muitos casos não têm relação direta entre si (SANTOS, 2007).

2.3.4 Células Somáticas e seus efeitos na composição do leite

A alta CCS implica em consideráveis prejuízos à indústria de laticínios, relacionados às alterações que provoca na composição do leite, reduzindo os teores de cálcio, lactose, caseína e gordura, além de aumentar os níveis de íons sódio, cloro e de proteínas séricas (CUNHA et al., 2008a).

As alterações de composição do leite ocorrem em consequência à inflamação, que causa diminuição na capacidade de síntese da glândula mamária e aumento da permeabilidade vascular (PINTO et al., 2016).

Por outro lado, vacas com mastite produzem leite com maior teor de proteínas do soro, as quais são compostas principalmente por imunoglobulinas e enzimas. Do ponto de vista de processamento do leite, as alterações de composição causadas pela mastite resultam em redução do rendimento de fabricação de derivados lácteos como os queijos e o leite em pó (CUNHA et al., 2008).

O teor de gordura, por sua vez, normalmente é maior entre as amostras do leite de animais com maior CCS. Entretanto, ao avaliar as variáveis segundo a classe de CCS, aumento é referente à redução na produção de leite dos animais com mastite subclínica. Por sua vez, o maior percentual proteico verificado entre os animais com alta CCS se justifica pela maior concentração de proteínas séricas no leite, resultado da maior inflamação da glândula mamária (MATTIELLO et al., 2018).

No leite pasteurizado com alta CCS, pode ocorrer o desenvolvimento de “rancidez” entre 14 e 21 dias após o processamento, enquanto o leite com baixa CCS não apresenta este defeito, devido ao fato das células somáticas podem produzir lipases resistentes à pasteurização e que reduzem a vida de prateleira do leite pasteurizado (FERNANDES, 2007).

Além do efeito negativo sobre as características sensoriais e rendimento industrial, a mastite causa aumento da atividade enzimática do leite, pois tanto a presença de maior CCS quanto as alterações causadas pela inflamação aumentam significativamente a concentração de enzimas proteolíticas e lipolíticas (FERNANDES, 2007).

O número destas células é usualmente, menor que 200.000 células/mL de leite. Uma glândula mamária saudável apresenta de 50.000 a 200.000 células/mL, já acima de 283.000 células/mL, a glândula é considerada infectada e, nos casos clínicos, a contagem de células somáticas chega a milhões de células por mL (MELO JUNIOR, 2005).

Segundo Fernandes (2007), nos seus estudos sobre o efeito da CCS do leite sobre a qualidade do leite ultrapasteurizado (UHT), foram encontradas diferenças nas características sensoriais do leite produzido com leite contendo alta CCS e também apresentou tendência a coagular durante o armazenamento mais rapidamente do que o leite normal.

Os lisossomos das células somáticas contêm enzimas proteolíticas, dentre elas a catepsina D, que pode produzir caseínomacropeptídeo a partir da κ -caseína, em altas concentrações, pode causar a coagulação do leite (HURLEY et al., 2000).

A origem da catepsina D no leite não é conhecida, pode ser secretada tanto por células epiteliais mamárias e por células secretoras de leite, uma vez que os linfócitos ativados podem secretar enzimas lisossomais (FOX; KELLY, 2006).

De acordo com Silva (2003) foi encontrada correlação positiva ($P < 0,05$) entre a contagem de células somáticas no leite cru e a massa de sedimentos no leite UHT com 120 dias de estocagem, com coeficiente 0,7643, $n=7$. Fundamentando-se nos resultados obtidos, ficou comprovada a influência da alta contagem de células somáticas sobre a ocorrência de geleificação e sobre a formação de sedimentos durante o período de armazenamento do leite UHT.

2.4 Proteólise

A proteólise no leite UHT durante o armazenamento é um exemplo de redução da estabilidade, devido à formação de sedimento ou gel, configurando assim um problema de qualidade (SANTOS, 2003).

A presença de geleificação ou sedimentos durante a estocagem é considerado um grande problema na indústria de leite UHT, uma vez que reduz a vida de prateleira e pode ocasionar rejeição do leite pelo consumidor (LIMA, 2012)

A proteólise consiste na quebra das ligações peptídicas das proteínas presentes no leite pela ação de enzimas específicas, fenômeno chamado clivagem hidrolítica. Estas enzimas podem ser provenientes do sangue do animal lactante, como em caso de mastite, contendo proteases endógenas que estão naturalmente presentes no leite ou podem ser resultantes do metabolismo de bactérias psicotróficas (LIMA, 2012).

2.4.1 Proteases de origem bacteriana (Psicotróficas)

Em geral, o leite não é diretamente processado após a ordenha, dependerá da logística da fazenda até o laticínio e também da legislação de cada país. Em algumas

situações, o leite pode ser mantido armazenado refrigerado na fazenda por até 4 dias. Este armazenamento refrigerado por período longo cria condições seletivas para o desenvolvimento bacteriano, neste caso as bactérias psicotróficas (PINTO et al., 2016).

No Brasil, o leite pode ser mantido refrigerado por até 48 horas na fazenda até ser transferido para a indústria. A legislação brasileira recomenda que nesse tempo o leite seja mantido numa temperatura em torno de 4°C para inibir a deterioração do produto por bactérias mesófilas (DECRETO 10.468, 2020). Contudo, ao minimizar tal problema, outro imediatamente surge, já que temperaturas abaixo de 7°C facilitam a proliferação de bactérias psicotróficas (SANVIDO, 2007).

A contaminação antes e pós-processamento do leite e produtos lácteos está comumente associada à higienização deficiente de equipamentos e superfícies em contato com alimentos (LIMA, 2012).

A contagem de microrganismos psicotróficos no leite cru está relacionada com as condições higiênicas de produção em combinação com tempo / temperatura que o leite permanece estocado até o momento do processamento. Em condições higiênico-sanitárias adequadas de obtenção do leite, a microbiota psicotrófica representa menos que 10% da microbiota total inicial, comparada a mais de 75% sob condições não sanitárias. A estocagem prolongada e temperaturas de refrigeração oscilatórias potencializam a multiplicação de psicotróficos no leite cru (PINTO et al., 2016).

Ainda que durante a pasteurização do leite a maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes (LIMA, 2012).

A maioria das bactérias psicotróficas contaminantes do leite inclui espécies de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium spp.* Dentre as bactérias psicotróficas contaminantes, *Pseudomonas* constitui o gênero encontrado com maior frequência no leite e em derivados mantidos sob-refrigeração (PINTO et al., 2016).

Bactérias psicrotróficas podem produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, que estão diretamente relacionados à perda de qualidade e vida útil reduzida do leite, mesmo após o tratamento térmico, uma vez que tais enzimas são altamente resistentes (MURPHY et al., 2016).

Além da questão da proteólise em UHT, o resultado de altas contagens de bactérias totais e psicrotróficas no leite são a instabilidade ao calor, pode sofrer alterações físico-químicas como coagulação durante o aquecimento, geleificação durante armazenamento e desenvolvimento de sabores estranhos (HARYANI et al., 2003).

Nem todas as amostras de leite com altos níveis de bactérias psicrotróficas produzem proteinases. Datta e Deeth (2003), em seus estudos observaram que algumas amostras de leites cru com alta contagem de psicrotróficos, não apresentaram evidências de enzimas proteolíticas no leite UHT, enquanto outras amostras de leite armazenados em condições semelhantes e com contagens de psicrotróficos semelhantes apresentavam altos níveis de enzimas proteolíticas.

Recio (2000), Zhang (2018), citam em seus estudos que, na maioria dos casos a geleificação causada pelas enzimas de origem psicrotrófica é geralmente atribuída à hidrólise de κ -caseína, produzindo "para- κ -caseína" e um subproduto semelhante a um "glicomacropéptido" de fase sérica.

Esta hidrólise de κ -caseína é acompanhada por hidrólise das outras frações de caseína, em particular β -caseína, mas geralmente menos extenso do que a κ -caseína. A hidrólise da κ -caseína que se manifesta rapidamente em micelas de caseína muito instáveis (MACHADO et al., 2017b).

Em suma, como as bactérias psicrotróficas produzem enzimas extracelulares no final da fase de crescimento exponencial, um leite de boa qualidade que é pasteurizado logo após a coleta na fazenda e processado por UHT rapidamente, não terá problemas com geleificação através por enzimas exógenas (STOECKEL et al., 2016b).

2.4.2 Proteases de origem endógena (Mastite)

A contagem de células somáticas (CCS) do tanque tem sido utilizada como a prática mais usual para identificação de leite proveniente de vacas com mastite subclínica (MULLER, 2002).

O efeito da mastite sobre a concentração total de proteína do leite é variável. Entretanto, devido ao aumento do influxo de proteína de origem do sangue, como imunoglobulinas e soroalbumina bovina, e a concomitante diminuição da síntese de proteína nas células epiteliais (α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), o efeito geral é de manutenção de níveis proteína total relativamente constante ou de mudanças muito pequenas (SANTOS; FONSECA, 2007).

Por ser a proteína de maior concentração no leite e possuir alta susceptibilidade devido à sua estrutura desorganizada, a caseína é a mais atingida pela proteólise, conseqüentemente, a que mais sofre redução, sendo a plasmina, principal protease presente no leite, a responsável por sua hidrólise (VERDI; BARBANO, 1991).

As proteínas do soro também são afetadas pela alta CCS, já que elas apresentam uma elevação em seus números, assim como a soroalbumina bovina e imunoglobulinas em razão do aumento do já citado influxo de substâncias do sangue para o leite. β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, como são sintetizadas na glândula mamária, apresentam considerável redução em seus níveis (AULDIST et al., 1996).

A atividade proteolítica endógena no leite pode ser estimulada por duas classes distintas de proteases, o plasminogênio e as enzimas proteolíticas provenientes dos leucócitos (SANTOS et al., 2018).

2.4.3 Plasmina no leite

Plasmina é uma importante enzima presente no sangue dos mamíferos, responsável por degradar muitas proteínas do plasma sanguíneo, mais notavelmente os coágulos de fibrina em processos de hemostasia (DRAXLER; MEDCALF, 2015).

A plasmina é considerada a principal protease do leite de origem endógena. Origina-se do sangue e sua atividade no leite é regulada por um sistema complexo, composto por diversas proteínas (proteases séricas e inibidores), que regulam a

geração de plasmina, uma enzima ativa, produzida a partir de uma proenzima inativa (plasminogênio) (KELLY; FOX, 2006).

Em vacas com mastite, há um aumento da permeabilidade vascular nos alvéolos do úbere, aumentando o influxo de componentes de origem do sangue para o leite (p. ex., imunoglobulinas e soroalbumina bovina, neutrófilos e linfócitos) e concomitante proteases como a plasmina (NETO; ZAPPA, 2011).

A plasmina é considerada uma enzima endógena do leite, classificada como uma proteinase alcalina. No leite normal, a plasmina é encontrada na forma de precursor inativo, o plasminogênio (SILVA, 2003).

O plasminogênio encontra-se associado às micelas de caseína e às membranas dos glóbulos de gordura, concentrações mais altas desta substância são encontradas na fração caseínica do leite, comparadas às concentrações existentes no soro e na gordura (PINTO et al., 2016).

De acordo com Pinto et al., 2015, no leite de boa qualidade, relação entre plasmina ativa e plasminogênio é, na maioria dos casos, de 1:5. No leite estão presentes também substâncias termolábeis inibidoras de plasmina. Como consequência, o potencial de degradação do sistema plasmina-plasminogênio no leite depende do balanço entre enzima ativa e seus precursores e inibidores.

Em função da baixa concentração de plasmina no leite, problemas tecnológicos não se manifestam em produtos de vida de prateleira curta. Entretanto, em concentrações moderadas, a atividade desta enzima pode ser deletéria para produtos de vida de prateleira longa (MARÉCHAL et al., 2011).

A gelificação do leite UHT pode ocorrer mesmo em baixa concentração de plasmina (0,15 mg/L), durante o período de estocagem à temperatura ambiente. A gelificação é acompanhada de um aumento da viscosidade (FERNANDES, 2007).

Segundo Gaucher et al., (2008), qualquer fator que converta o plasminogênio em plasmina resulta na proteólise da caseína, e proporciona um impacto negativo na funcionalidade da proteína do leite. Os constituintes das células somáticas são capazes de realizar esta conversão.

A ativação de plasminogênio no leite é promovida principalmente pela presença das células somáticas. Os principais ativadores da plasmina são a trombina, catepsina D, proteases ácidas do leite e aminopeptidases, além das proteases derivadas de células somáticas (PINTO et al., 2016).

De acordo Zhang et al (2018) a β -a caseína é mais suscetível à ação da plasmina, seguida por α 1-caseína e α 2-caseína. Embora a κ -caseína contenha resíduos de lisina, parece ser mais resistente à plasmina.

Zhang et al (2018) em seus estudos também identificaram que a estrutura do gel induzido pela plasmina ao hidrolisar a β - e α -caseína é macia e frágil. Propriedades físicas semelhantes de géis induzidos por plasmina foram relatadas por Kohlmann, Nielsen e Ladisch (1988), Kelly e Foley (1997), Newstead et al. (2006) e Rauh, Sundgren et al (2014).

A contribuição da atividade proteolítica além da plasmina é normalmente significativa apenas quando a CCS é mantida acima de 1 milhão de cels/mL. Em termos gerais, em altos níveis de CCS do leite também ocorre aumento da atividade proteolítica de origem das células somáticas, através da liberação de proteases ativas no leite (SILVA, 2003).

2.5 Processo UHT

Entende-se por leite UHT ou UAT, o leite (integral, parcialmente desnatado ou semidesnatado e desnatado) homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4,5 segundos, à temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, homogeneizado por pressão e na sequência resfriado a temperatura inferior a 32 °C e envasado em condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (RIISPOA, 2017; DECRETO 10.468, 2020).

Antes do processamento UHT, o leite passa pelo controle da matéria-prima, filtragem, resfriamento a temperaturas inferiores a 4°C, pasteurização, clarificação por centrifugação, padronização do teor de gordura e por fim, o leite segue para o tratamento UHT (SILVA, 2007).

Existem dois métodos, o indireto, que é feito mediante trocadores de calor e o direto, por injeção de vapor. A homogeneização por pressão pode ser feita antes ou

depois do superaquecimento. Após o tratamento térmico, o leite sofre um resfriamento rápido a temperatura ambiente e acondicionamento asséptico (TETRA PACK, 2020).

O objetivo do UHT é maximizar a eliminação de microrganismos com o mínimo de alterações químicas ao produto. Isso significa encontrar a combinação ideal de temperatura e tempo de processamento (TETRA PACK, 2020).

De acordo com a *International Dairy Federation*, durante o tratamento UHT, as características do leite são preservadas: a aparência, a consistência, o aroma e o sabor. O leite UHT apresenta a mesma quantidade de proteína e o mesmo valor nutricional do leite cru (BOCKELMANN, B.; BOCKELMANN, 1988).

Conforme atesta relatório conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o processo de ultrapasteurização preserva a grande maioria das qualidades nutritivas do leite. Iguale-se ao leite pasteurizado não somente quanto ao valor nutritivo, como também quanto à cor e ao sabor (BOCKELMANN, B.; BOCKELMANN, 1988).

Desta maneira, o processamento UHT é uma forma confiável de conservação de alimentos, e garante a qualidade e segurança microbiológica dos leites e produtos à base de leite sem interferir nos benefícios nutricionais tão importantes para a saúde (TETRA PACK, 2020).

2.5.1 Efeitos do aquecimento sobre os constituintes do leite

Os melhores processos são aqueles capazes de promover a eliminação de microrganismos patogênicos e deterioradores e a inativação de enzimas, sem, contudo, provocar modificações indesejáveis nas características gerais das matérias-primas submetidas ao tratamento (ROCHA, 2004).

O termo “esterilização comercial” indica que o alimento é microbiologicamente estável, visto que os microrganismos que sobreviveram à esterilização são espécies termófilas e só conseguem se desenvolver em temperaturas superiores a 45°C e, portanto, não são capazes de se desenvolver nas condições normais de armazenamento do leite (SILVA, et al., 2007).

De acordo com Rocha (2004), o tratamento térmico do leite origina a desnaturação das proteínas do soro. O efeito varia dependendo da severidade do aquecimento desde a desnaturação parcial durante a pasteurização até a total na esterilização convencional. As imunoglobulinas são as proteínas mais lábeis e em ordem crescente de estabilidade, a albumina sérica, β - lactoglobulina e α -lactoalbumina.

As caseínas não se comportam, frente ao aquecimento, como as proteínas solúveis. Para poder constatar alguma modificação, é necessário o aquecimento a temperaturas muito elevadas, superiores a 120°C, por mais de 10 minutos (SILVA et al., 2012).

Os componentes da matéria gorda são pouco sensíveis aos tratamentos térmicos moderados. É preciso alcançar temperaturas muito superiores a 100°C e realizar um aquecimento prolongado durante várias horas a 70-80°C para detectar uma degradação dos glicérides (MATTIELLO et al., 2018).

Em se tratando de vitaminas, as lipossolúveis A, D e E e as hidrossolúveis biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e riboflavina, são relativamente estáveis ao calor e não se produzem perdas muito significativas das mesmas durante a pasteurização e nem na maior parte dos tratamentos UHT (MATTIELLO et al., 2018).

Durante a pasteurização perde-se menos de 10% de ácido fólico, tiamina, vitamina B6 e vitamina B12; as perdas de vitamina B6 são ligeiramente maiores no tratamento UHT. As perdas mais importantes se produzem na vitamina C, cujo conteúdo total (ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico) se reduz a 10-25% durante a pasteurização e em 25% ou mais durante o tratamento UHT (ROCHA, 2004).

As perdas do conteúdo total de vitamina C se devem quase por completo a sua instabilidade ao calor da forma oxidada, o ácido dehidroascórbico, e, portanto, podem reduzir-se limitando a quantidade de oxigênio dissolvido que contém no leite (ROCHA, 2004).

No que diz respeito ao comportamento dos minerais frente aos tratamentos térmicos, os sais do leite são de dois tipos: os que não passam por nenhuma modificação como o sódio, potássio, cloro e enxofre e os que são afetados pelo aquecimento como cálcio, magnésio, citrato e fosfato. O tratamento UHT modifica os

equilíbrios dos sais de cálcio produzindo uma diminuição do cálcio solúvel e a precipitação do fosfato de cálcio (MACHADO et al., 2017a).

A diminuição de cálcio solúvel e precipitação do fosfato de cálcio, tornando cálcio e fósforo menos disponíveis para a absorção, podem ser as principais modificações causadas pelo processamento UHT aos minerais do leite. Cerca de 40% a 50% do cálcio solúvel aparece na fase coloidal, com diminuição da absorção deste pelo organismo (VIDAL; SARAN NETTO, 2018).

Já com relação a lactose, o aquecimento acarreta consequências tecnológicas importantes, sobretudo quando o açúcar está em presença de proteína. Isto é a origem do escurecimento não enzimático observado durante a fabricação e armazenamento dos diversos produtos lácteos, porém pouco perceptíveis em leite UHT (ROCHA, 2004).

Outra transformação sofrida pela lactose durante o aquecimento, é o processo de isomerização, se transformando em lactulose, um dissacarídeo formado por resíduos de frutose e galactose (NEVES, 2015).

De acordo com Neves (2015) a lactulose não ocorre naturalmente no leite sendo formada apenas em produtos lácteos submetidos ao calor e, portanto, é considerada um bom indicador de tratamento térmico para leite e derivados.

A Comissão Europeia bem como a Federação Internacional de Lácteos (International Dairy Federation - IDF) propõem que para classificar um leite como UHT, deve apresentar um teor de lactulose entre 100 mg/L e 600 mg/L (ELLIOTT et al., 2005).

No tratamento UHT, várias enzimas do leite são inativadas e as provas da inativação enzimática, como os testes de fosfatase alcalina e lactoperoxidase, são utilizadas desde muitos anos para comprovar que o leite tenha recebido tratamento térmico adequado (ELLIOTT et al., 2005).

As lipases naturais do leite também se inativam, já a principal proteinase do leite, plasmina, é muito resistente à pasteurização e ultrapasteurização (ROCHA, 2004).

Segundo Montanhin (2016), as lipases e proteases bacterianas apresentam elevada resistência térmica, mantendo seu potencial de degradação enzimático mesmo após o leite ser submetido aos tratamentos mais drásticos aplicados pela indústria de produtos lácteos, como o processo Ultra Alta Temperatura (UAT ou UHT).

Por esta razão, considera-se tecnicamente inviável a inativação térmica destas enzimas, uma vez que a temperatura necessária para sua desnaturação provocaria, paralelamente, danos irreparáveis aos componentes do leite (MONTANHINI, 2016).

2.6 Estabilidade térmica do leite

A estabilidade térmica do leite está diretamente relacionada com a capacidade de o leite resistir à coagulação pelo calor e, portanto, às suas características de processamento. Diversos fatores afetam a estabilidade do leite: tempo x temperatura, pH, equilíbrio salino, concentração de uréia, estágio de lactação, alimentação e ocorrência de mastite (SILVA, 2007).

De forma geral, considera-se aceitável estimar a estabilidade térmica do leite pelo emprego da prova do álcool ou do alizarol, que é um teste muito utilizado para determinar a aptidão do leite para o tratamento térmico. Atualmente, a prova do álcool é muito empregada nas indústrias de laticínios como um teste para aceitação ou rejeição do leite no momento da recepção na plataforma ou mesmo de fazenda leiteira (BRITO, 2009).

Os resultados positivos dessa prova podem ser observados quando ocorre acidez excessiva do leite decorrente da fermentação da lactose e produção de ácido láctico, causada por micro-organismos. Tal acidez é considerada um dos principais fatores da estabilidade reduzida do leite, além disso, tem sido relatado que mudanças repentinas na dieta dos animais, subalimentação, bem como acidose metabólica também podem diminuir a estabilidade do leite (MARQUES et al., 2011).

A legislação brasileira estabelece que, para recebimento, o leite seja estável ao etanol a 68°GL (v/v) (DECRETO 10.468, 2020).

Apesar deste parâmetro mínimo na exigência legal, indústrias utilizam soluções de teor alcoólico acima desta concentração, isto é, 78°GL ou mesmo 80°GL,

dependendo para qual seja seu uso industrial. Para que ocorra rejeição por parte da indústria, o leite coagula ao ser testado nas graduações mais baixas, provando estar impróprio para o processamento devido à instabilidade e desenvolvimento de elevada acidez (MARQUES et al., 2011).

A baixa estabilidade pode levar a sedimentação, entendida como a perda da estabilidade proteica do leite submetido a tratamentos térmicos. Ocorre formação de sedimentos decorrente da alta temperatura empregada no processamento, e se deve à maior quantidade de proteínas desnaturadas e à precipitação dos sais minerais (SILVA, 2014).

O pH é outro um fator importantíssimo para se determinar a estabilidade do leite. Para o leite com pH abaixo de 6,2, pode-se considerar como nula a estabilidade térmica, uma vez que a quantidade de cálcio iônico no leite se elevará, aumentando a chance de ocorrer a precipitação (FORTUNA, 2015).

O equilíbrio salino é outro ponto a ser destacado, é determinado pelas concentrações de cálcio, fósforo e citrato presentes no leite e estes componentes influenciam diretamente a estabilidade térmica do leite. As micelas de caseína são unidas pelo fosfato de cálcio, e a força de união entre elas é determinante para a estabilidade do leite. Alterações no equilíbrio entre cálcio solúvel (iônico e ligado ao citrato e fosfato) e coloidal (ligado a proteínas) afetam diretamente os resultados da prova do álcool e, conseqüentemente, a estabilidade térmica do leite (SILVA, 2007).

Outro fator relacionado ao equilíbrio salino é a mastite, uma vez que altera a permeabilidade vascular das células secretoras de leite, afetando o equilíbrio dos sais no leite (Na, Cl, Ca, P e K). Além disso, o leite com elevada contagem de células somáticas apresenta enzimas proteolíticas que podem causar a desestabilização das micelas (SANTOS, 2007).

2.7 Métodos de Monitoramento da Proteólise em Leite

A proteólise do leite ocorre devido à ação de enzimas nativas, como a plasmina, por enzimas adicionadas ao leite, como a renina utilizada na fabricação de queijos ou ainda por enzimas produzidas por micro-organismos presentes no leite (LASMAR et al., 2011).

O caseinomacropéptido (CMP) é um péptido presente no soro de queijo, que é formado a partir da quebra da κ -caseína pela ação da quimosina, durante a produção de queijo. Porém, pode ocorrer também a formação do pseudo-CMP pela ação de proteases endógenas do leite e bacterianas sobre a κ -caseína (MOTTA; HOFF; BARRETO, 2014).

Apesar destas enzimas não clivarem a κ -caseína na posição específica 105-106 (no caso da quimosina), elas conseguem hidrolisar ligações peptídicas próximas, como ligações entre a metionina (posição 106) e alanina (posição 107), por exemplo. Isso resulta em polipéptidos (pseudo-CMP) com mesmo tamanho, ou próximo, e que não se distingue do CMP usando apenas High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (LOBATO et al., 2020).

Friedrich et al., (2010), citado por Lobato (2014) avaliaram a estabilidade de amostras de leite UHT e de leite *in natura* em relação à temperatura e ao tempo de armazenamento, quanto ao índice de CMP utilizando HPLC. Verificaram que a proteólise foi progressiva tanto para as amostras de leite UHT como para leite *in natura* refrigerado, durante o período de armazenamento, sendo o principal indicador do aumento dos níveis de CMP, indicando que nem sempre uma concentração de CMP acima de 30 mg L⁻¹, valor estabelecido pelo MAPA, representa adulteração por adição de soro.

Problemas associados à produção e qualidade da matéria prima, processamento tecnológico e outros, ao longo de toda cadeia produtiva do leite, podem prejudicar a exatidão dos métodos analíticos, baseados principalmente na identificação do CMP, consistindo ainda em um desafio a ser vencido (FURTADO, 2010).

Para determinar quantitativamente o caseinomacropéptido (CMP), resultante da ação proteolítica de enzimas, existem diferentes métodos. No Brasil, há uma legislação que trata dessa quantificação, visando detectar fraude por adição de soro.

A legislação vigente é a Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006), que estabeleceu dois métodos para a determinação de CMP no leite. Um dos métodos é baseado na determinação do CMP por HPLC, o outro método é o da ninidrina ácida, que é baseado na determinação espectrofotométrica quantitativa

do ácido siálico ligado ao caseinomacropéptido que é liberado da kcaseína, na região visível do espectro, a 470 nm (FUKUDA, 2003).

2.7.1 Método da Ninidrina Ácida

Baseia-se na presença do ácido siálico, também denominado de NANA (ácido N-acetil neuroamínico), que é um dos carboidratos ligados ao CMP. Para a execução dessa técnica é necessária a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. O macropéptido ficará no filtrado e para o isolamento do ácido siálico, é necessário precipitá-lo com a adição de ácido fosfotúngstico (AFT). Após duas lavagens com etanol e secagem, o NANA é liberado como cromóforo púrpura devido a reação com o resorcinol (FUKUDA et al., 2009).

Fukuda et al. (2003), propuseram a padronização do método da ninidrina ácida para a determinação quantitativa do ácido siálico (NANA) livre ou ligado ao glicomacropéptido, utilizando a espectrofotometria a 470 nm. O método obteve bons resultados com pequenas variações (ao redor de 2%), e mostrou-se de fácil execução, podendo ser usado na rotina por não requerer equipamentos sofisticados e mão de obra qualificada.

Furlanetti e Prata (2009), utilizaram o método da ninidrina ácida para análise de leite bovino durante a lactação, e concluíram que o CMP livre varia em função do período de lactação e em consequência de mastites clínicas e subclínicas.

2.7.2 Cromatografia – CLAE / HPLC

O HPLC, também conhecido como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) possui a capacidade de realizar análises quantitativas de amostras em que estão presentes uma grande quantidade de compostos, em poucos minutos e com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Por exemplo, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência com filtração em gel (CLAE-FG), para determinar a quantidade de CMP no leite é considerado um método sensível e rápido (CUNHA et al., 2008b).

Vidal-Martins et al. (2005) observaram que a proteólise decorrente de bactérias psicrófilas do leite cru aumenta no decorrer do tempo de armazenamento do leite UHT. O CMP, devido a sua constituição, possui caráter hidrofílico, estabilidade térmica

elevada e peso molecular de 8.000 Daltons e pode ser separado de outros peptídeos e proteínas pela CLAE.

O MAPA oficializou a CLAE como o método físico-químico oficial para a detecção do CMP em leite e produtos lácteos. A curva de calibração do equipamento de cromatografia deve ser feita com padrões de CMP para que o método se torne ainda mais seguro. O resultado é expresso em concentração de CMP, em mg/L (IN n°68 do MAPA) (MAPA, 2006).

De acordo com a IN n°69 do MAPA (2006), somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L o leite poderá ser destinado ao consumo direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 e 75mg/L este poderá ser destinado à produção de alguns derivados lácteos. Em valores acima de 75 mg/L resultará em destinação à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

Souza (2007) comparou as técnicas de CLAE, ninidrina ácida e o método colorimétrico adaptado por OLIVEIRA et al. (1998) para detecção de soro de queijo em leite. Os autores concluíram que o método da ninidrina ácida possui sensibilidade inferior a CLAE, mas em contrapartida podem ser usados como teste de triagem por serem de fácil execução e rápidos.

Segundo Magalhães (2008), outros métodos para detecção de soro e proteólise no leite têm sido estudados, mas estes métodos ainda apresentam baixa sensibilidade e longo tempo de análises.

2.7.3 Outros métodos para detecção de CMP no Leite.

Bremer et al.(2008) testaram um ensaio imunoenzimático inibitório (ELISA) para a detecção de soro de queijo bovino em leite em pó. Este teste foi criado com objetivo de ser um método de triagem alternativo, de fácil utilização, barato e específico. O método ELISA foi considerado de fácil execução e tempo de ensaio curto, quando comparado com a CLAE-FG, método oficial pela UE (União Européia).

Um teste qualitativo imunocromatográfico (Stick c-GMP) para detecção de CMP no leite também foi desenvolvido, sendo considerado rápido e sensível. O teste é

baseado na reação do c-GMP presente nas amostras de leite com as partículas coloidais que estão recobertas com o anticorpo monoclonal específico frente ao glicomacropéptido (LOBATO et al., 2020).

Hernández et al. (2009) avaliaram o desempenho do teste (Stick c-GMP) em leite em pó desnatado, pasteurizado e UHT adicionados de 0, 1, 2, 4 ou 16 % (v/v) de soro de queijo. As amostras com adição de soro de queijo de 2 a 16% foram claramente detectadas como positivas enquanto as amostras de leite adicionadas de 1% de soro de queijo foram classificadas como fracamente ou muito fracamente positivas.

Sessenta amostras de leite cru provenientes de fazendas leiteiras também foram analisadas pelo Stick c-GMP e os resultados comparados a CLAE-FG e aos métodos à base de ácido siálico. Em geral, os resultados obtidos pelos três métodos foram semelhantes ao método CLAE-FG e foram mais confiáveis do que os do método colorimétrico (LOBATO et al., 2020).

Dessa forma, os autores propõem o uso deste método como uma ferramenta de triagem. As vantagens seriam a rapidez e eficiência, assim como pouca necessidade de treinamento ou equipamento sofisticado. Seria, então, uma ferramenta para aplicação na plataforma de recepção do leite nos laticínios, permitindo que ação seja tomada antes que o leite seja processado (LOBATO et al., 2020).

Recio et al. (2000), citado por Lobato (2020) estudaram a aplicação da eletroforese capilar para detecção de sólidos de soro de queijo em amostras de leite UAT genuínas e adulteradas, bem como amostras comerciais. Além disso, dois lotes de leite, com e sem soro de leite, foram adicionados ao leite UHT, sob condições controladas de armazenamento e temperaturas diferentes, para avaliar a influência da atividade proteolítica durante o armazenamento.

O índice de proteólise do leite também pode ser calculado quantitativamente através da relação caseína (C) / proteína verdadeira (PV). Este índice expressa a diminuição dos teores de caseína em relação à proteína verdadeira (FERNANDES, 2007).

Para a determinação do NT, utiliza-se o método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela AOAC (1995). A determinação do nitrogênio não proteico (NNP) pode ser efetuada após prévia precipitação das proteínas do leite UAT com ácido tricloroacético a 15%, seguido de filtração e análise do filtrado através do método de Kjeldahl (COSTA, 2014).

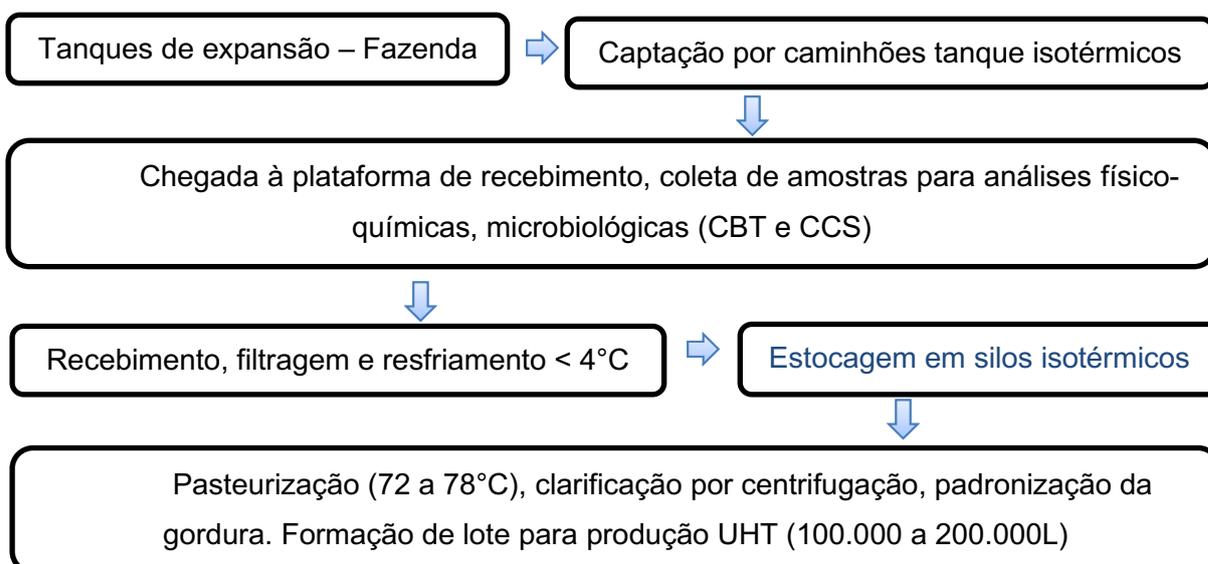
O NNC é determinado através do procedimento descrito por Lynch e Barbano (1998), os quais preconizam a precipitação da caseína com solução de ácido acético e acetato de sódio (pH = 4,6), seguida de filtração e análise da concentração de N no filtrado mediante o método de Kjeldahl. Do resultado final (NNC) é subtraído do valor de NT, fornecendo assim a concentração de caseína na amostra (FERNANDES, 2007).

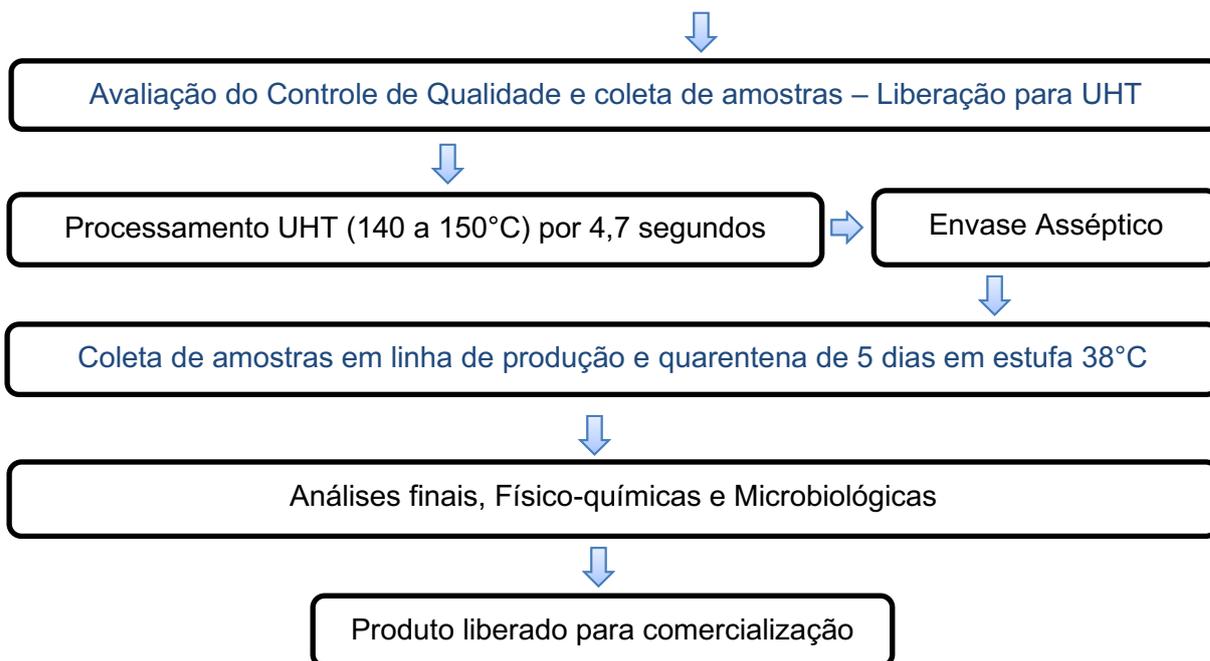
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da usina de beneficiamento do leite UHT

As amostras de leite cru, pasteurizado e UHT utilizadas neste estudo foram coletadas em uma usina de beneficiamento localizada no Município de Patos de Minas - MG, submetida ao controle higiênico-sanitário permanente, através do Serviço de Inspeção Federal (SIF), na qual o volume médio de produção de leite UHT é de 400.000 L/dia.

O processo produtivo de UHT deste laticínio está representado no fluxograma abaixo:



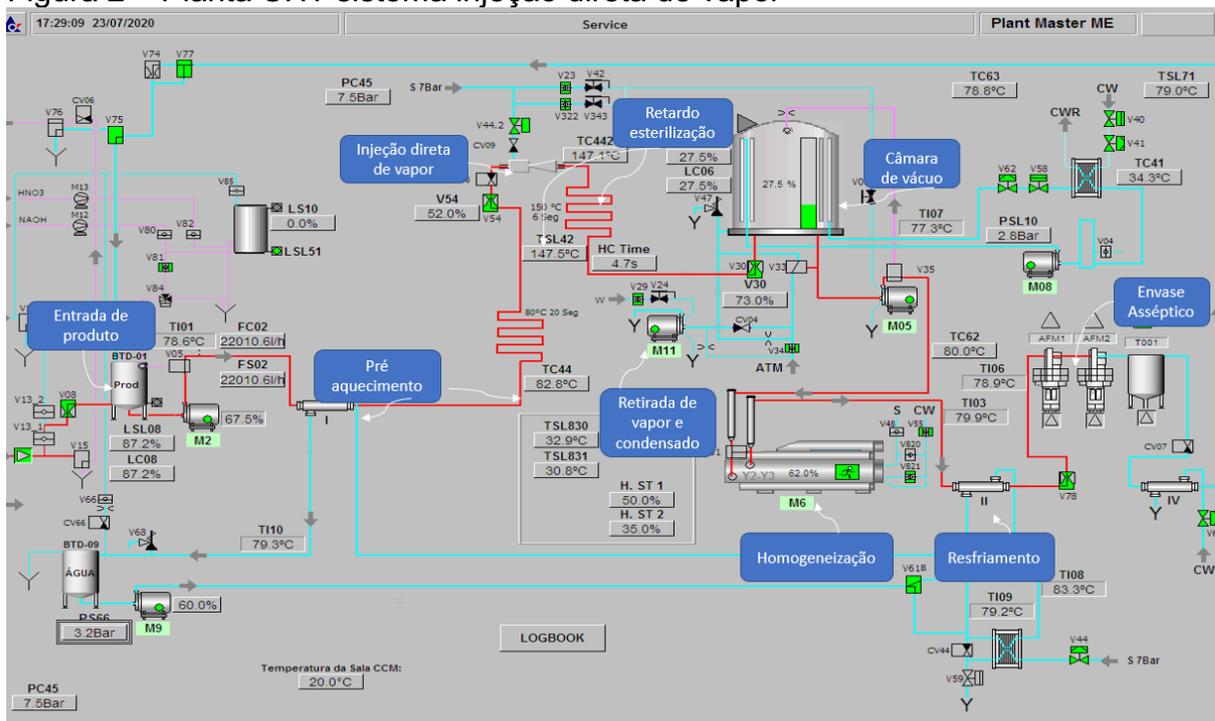


Fonte: Próprio autor (em azul foram os momentos de coleta das amostras)

O recebimento e resfriamento são realizados logo que o leite cru é aprovado pelo controle de qualidade. A pasteurização é realizada logo em seguida, assim que são recebidos 100.000 litros de leite em um silo de estocagem.

O processamento de leite UHT neste laticínio é realizado pelo método direto, ou seja, com injeção de vapor diretamente ao leite em sistema fechado, conforme fluxograma abaixo (figura 2). O volume dos lotes processados varia entre 100.000 a 200.000 litros. Para este estudo, coletamos amostras dos lotes de 100.000 litros.

Figura 2 – Planta UHT sistema injeção direta de vapor



Fonte: Supervisório Plant Master Tetra Pack

3.2 Leite cru refrigerado e leite pasteurizado

3.2.1 Amostragem

As coletas do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado foram realizadas conforme o recebimento do leite a granel do laticínio, em dias e horários diferentes, nos meses de março e abril de 2021, totalizando 10 amostragens, referentes a 1.000.000 de litros, divididos em 10 lotes de UHT processados. O ponto de coleta do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado está destacado em azul no fluxograma do item 3.1.

3.2.2 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado foram realizadas no laboratório da própria usina de beneficiamento.

3.2.2.1 Estabilidade ao álcool

Foi utilizado o método descrito por Pereira et al., (2000). Utilizando pipetas graduadas, foram adicionados 2mL de leite em uma placa de petri, em seguida, adicionados 2mL de álcool junto ao leite na placa e na sequência foi homogeneizado com movimentos circulares. O leite foi considerado estável a graduação alcoólica testada quando não foi observada a formação de grumos na placa.

3.2.2.2 Acidez

Para a acidez titulável do leite, foi determinada por titulação ácido-base, conforme Brasil (2003), utilizando uma solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,111N (Dornic) como titulante. Na prática, o que foi mensurado é o volume de hidróxido de sódio necessário para neutralizar o ácido láctico presente no leite.

Utilizando uma pipeta graduada, foram adicionados 10mL de leite em um copo Becker de 50mL, em seguida, com auxílio de um conta gotas foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$) a 1% (m/v). Na sequência foi realizada a titulação com solução Dornic até atingir coloração rosa claro na amostra. Cada 1 mL de NaOH 0,11N equivale a 0,0090 g de ácido láctico presente na amostra.

3.2.2.3 Proteína total, Lactose, Caseína, EST, Matéria Gorda, Índice de Crioscopia e Densidade

Para avaliação destes quesitos de qualidade, foram realizadas análises utilizando o analisador FOOS Milkoscan FT1, que utiliza a tecnologia do infravermelho médio com Transformada de Fourier (FTIR).

A precisão e repetibilidade do método são parelhos aos métodos tradicionais. A performance está de acordo com a AOAC (Association of analytical chemists) e IDF (International dairy federation).

Para as análises físico-químicas citadas utilizando o Milkoscan, foram utilizadas amostras de 200mL de leite. Na prática, as amostras são succionadas para a câmara de processamento por infravermelho, a leitura e processamento são realizados em cerca de 30 segundos. Os resultados foram lançados em um software, depois

exportados via planilha de Excel. O analisador é utilizado no laticínio 24h por dia. Nas rotinas laboratoriais, o Milkoskan é aferido 3 vezes ao dia com amostra piloto e calibrado semanalmente utilizando solução padrão para cada item analisado.

3.2.2.4 Determinação da viscosidade

A viscosidade aparente foi realizada utilizando-se um reômetro, marca Brookfield, modelo DV-III, conforme metodologia descrita por Pereira et al., (2000). Foram utilizados cerca de 500mL por amostra, previamente homogeneizada e acondicionada em um béquer com capacidade de 600mL e, em seguida, foram realizadas às leituras, a cada período de um minuto, totalizando vinte minutos por análise. Os valores de viscosidade aparente foram expressos e registrados em centipoise (cP).

3.2.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado foram realizadas no laboratório de microbiologia da referida usina de beneficiamento. As análises de CCS foram realizadas na Clínica do Leite (USP/ESALQ).

3.2.3.1 Contagem de Células Somáticas

Para as análises de CCS, foram coletadas amostras de 50 mL de leite cru depois do recebimento e também após a pasteurização e clarificação. Foram utilizados frascos específicos com conservante Bronopol e estocadas sob refrigeração a 2°C, em seguida foram encaminhadas para análises de CCS na Clínica do Leite – (USP / ESALQ). As análises foram realizadas através dos métodos de determinação da contagem de células somáticas presentes no leite cru (CCS), realizadas através do equipamento Somacount 300, que utiliza a metodologia de citometria de fluxo, cujo resultado expresso em número de células em cada mL de leite (CCS/mL de leite), conforme previsto na IN 67 de 2018 seguindo a metodologia descrita na International Dairy Federation 148A (1995).

3.2.3.2 Contagem Global de bactérias Mesófilas e Psicrotróficas

Para a contagem padrão em placas (CPP), foi utilizado o método referenciado pela International Dairy Federation (IDF) e pela American Public Health Association (APHA) para a contagem bacteriana total no leite cru.

Esta técnica baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem, seguida de incubação em temperatura de 21°C para contagem de bactérias psicrotróficas e a 37°C para bactérias mesófilas.

As placas foram identificadas com a data da análise, data da coleta do produto, tipo da análise, diluição e origem da amostra analisada;

Em uma capela de fluxo laminar, foram realizadas três diluições em água peptonada esterilizada, utilizando pipetas e tubos de ensaio estéreis. Em seguida 2 ml da amostra diluída foi inoculada em duas placas de petri, 1mL em cada. Cada amostra foi testada em duplicata.

Foram adicionados à placa de petri contendo a amostra aproximadamente 15 mL do meio de cultura (PCA) já fundido e resfriado a 55°C, na sequência homogeneizadas, girando as placas em movimentos em forma de oito.

Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 21°C e 37°C por 48 horas. Após este período de incubação, foram contadas, com o auxílio de um contador de colônias todas as colônias desenvolvidas sobre o ágar nas placas;

Para expressar os resultados em UFC/mL, foi multiplicado o número de colônias encontrado, pelo inverso da diluição realizada;

3.2.4 Avaliação da Proteólise

Para avaliar a proteólise, optou-se por analisar a quantidade de glicomacropéptido de caseína (c-GMP). Este composto é liberado da proteína após esta sofrer uma ação proteolítica. Assim, o aumento de c-GMP traz uma resposta indireta sobre o grau de proteólise. Além do c-GMP, a proteólise foi determinada a partir das análises de frações de nitrogênio, o que permitiu quantificar as proteínas do soro e a caseína. Para isso, foram utilizadas duas metodologias diferentes:

3.2.4.1 Stick c-GMP

Essa análise foi realizada no laboratório de físico-química da própria usina de beneficiamento.

Trata-se de um teste imunocromatográfico para a detecção semiquantitativa do glicomacropéptido de caseína (c-GMP) no leite, produzido por degradação enzimática. Para este quesito, as análises foram realizadas no laboratório de físico-química da referida usina de beneficiamento. Esta análise é contemplada em legislação (IN 69/2006) para detecção de fraude de leite com soro.

Para esta análise, foram adicionados 6mL de leite em um tubo de ensaio, em seguida, acrescentados 4mL de ácido tricloroacético (TCA) a 20%, seguido de homogeneização e repouso por 10 minutos. Em seguida, esta mistura foi centrifugada por 10 minutos, filtrada com papel-filtro e reservada a amostra.

Foram adicionados 900 µL de diluente Buffer em 3 tubos de ensaio, numerados de 1 a 3. Na sequência foram adicionados no tubo de ensaio nº 1, 100 µL da amostra previamente preparada. Após homogeneizar, foram transferidos 100 µL do tubo de ensaio nº 1 para o tubo de ensaio nº 2, depois de homogeneizar, foram transferidos 100 µL do tubo de ensaio nº 2 para o tubo de ensaio nº 3. Por fim, transferidos 500 µL do tubo de ensaio nº 3 para um tubo de ensaio vazio número nº 4, neste foi realizada a leitura.

Para a leitura e interpretação dos resultados, a fita de leitura do teste imunocromatográfico semiquantitativa foi inserida no tubo de ensaio nº 4, depois de 5 minutos foi observado a coloração da fita e interpretação, conforme o cartão referência do teste. Os resultados possíveis de serem obtidos neste teste são de 0, 30 ou 75mg/L.

3.2.4.2 Determinação da proteólise a partir das análises de frações de nitrogênio

Essa análise foi realizada no laboratório da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas – MG.

Para este método, a avaliação da proteólise do leite foi realizada por meio da determinação do percentual de proteína total por meio da quantificação do nitrogênio

total (NT); o percentual de proteínas relacionadas ao soro de leite, através do nitrogênio não caseoso solúvel em pH 4,6 (NNC pH4,6); o percentual de peptídeos e aminoácidos contidos no leite, pela mensuração do nitrogênio não proteico solúvel em ácido tricloroacético 12% (NNP TCA12%); e o percentual de caseína nas amostras, que será obtido pela diferença entre o percentual de nitrogênio total (NT) com o do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NNC pH4,6).

Para quantificar o NT, foi utilizada a metodologia descrita pelo método primário de Kjeldahl (AOAC, 1995). Este método baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada.

Para expressar a porcentagem de nitrogênio total da amostra utilizou-se:

- $NT = (V \times N \times f \times 0,014 \times 100) / m$
- % de proteína = % nitrogênio total (NT) x F

Onde:

V = volume da solução de ácido clorídrico 0,1N, gasto na titulação após a correção do branco, em mL;

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

m = massa da amostra, em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, F = 6,38.

Para determinar o NNC (pH 4,6) e NNP (TCA 12%), foi utilizada metodologia descrita por Costa (2014), Fernandes (2007), Lynch e Barrano (1998).

Em se tratando do NNC (pH 4,6), a análise foi realizada a partir do tratamento de 100 mL da amostra de leite com 10 mL de solução de ácido clorídrico (HCl 1,41 mol. L⁻¹). A mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Posteriormente foi realizada a filtração através de algodão hidrófilo, e o filtrado foi reservado para o prosseguimento da análise.

Da mesma forma, para determinação do NNP (TCA12%), foi realizada a análise a partir do tratamento de 50 mL da amostra de leite com 50 mL de solução de TCA 24% S.R. A mistura foi mantida em repouso por 15 minutos, para posteriormente proceder a filtração através de algodão hidrófilo. O filtrado foi também reservado para o prosseguimento da análise.

A partir das soluções provenientes das suspensões, foram utilizados 5 gramas de cada filtrado reservado para determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), seguindo as mesmas etapas de digestão, destilação e titulação descritas na análise de NT. Por meio deste método, foram obtidos os percentuais de proteínas relacionadas a caseína e ao soro de leite.

Para o cálculo do índice da proteólise do leite, foi adaptado o método citado por Fernandes (2014), que descreve o índice de extensão da proteólise (IP), que representa a relação entre a porcentagem de proteína verdadeira com a porcentagem de caseína, conforme as equações abaixo:

- $PV = (NT - NNP) \times 6,38$
- $C = (NT - NNC) \times 6,38$
- $IP = C / PV$

Onde:

PV – proteína verdadeira

NT – nitrogênio total

NNP – nitrogênio não proteico

NNC – nitrogênio não caseoso

IP- índice de proteólise

C – caseína

3.3 Leite UHT

3.3.1 Amostragem

Como foram realizadas 10 coletas de leite cru refrigerado e leite pasteurizado em dias diferentes, foram coletadas também 10 caixas de leite UHT correspondente aos lotes de produção daquela coleta. As amostras de leite UHT foram armazenadas por 120 dias, período este correspondente ao seu prazo de validade. Em intervalos de 30 dias, os lotes de leite UHT foram avaliadas com relação aos seguintes parâmetros.

3.3.2 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas do leite UHT, estabilidade ao álcool, acidez, proteína, lactose, caseína, EST, matéria gorda, índice de crioscopia, densidade e viscosidade foram realizadas no laboratório de físico-química da usina de beneficiamento, utilizando a mesma metodologia citada nos itens 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

3.3.2.1 Grau de sedimentação

O grau de sedimentação também foi realizado na própria usina de beneficiamento. Foi utilizada a metodologia padronizada por Silva (2003), conforme descrição a seguir:

A embalagem cartonada UHT foi aberta completamente pela parte superior, com auxílio de tesoura, em seguida todo o leite foi escoado. Na sequência a embalagem foi novamente cortada de modo a obter uma altura final de, aproximadamente, 4 cm, a partir da base, depois foi invertida e mantida em posição vertical por 10 minutos, a fim de permitir que o leite escoasse das paredes internas e do fundo.

Após decorridos os dez minutos, a embalagem foi cortada pelas arestas e aberta completamente, de forma que permaneceu plana. Em seguida, as embalagens foram mantidas com a face interna voltada para cima, a temperatura ambiente por 48 horas.

Depois de decorridas as 48h, as embalagens foram pesadas, o peso registrado, na seqüência, removido completamente o sedimento seco com auxílio de espátula de ponta fina. Por fim, as embalagens foram novamente pesadas e o valor registrado. A massa de sedimentos foi obtida pela diferença entre as duas pesagens.

3.3.3 Avaliação da Proteólise

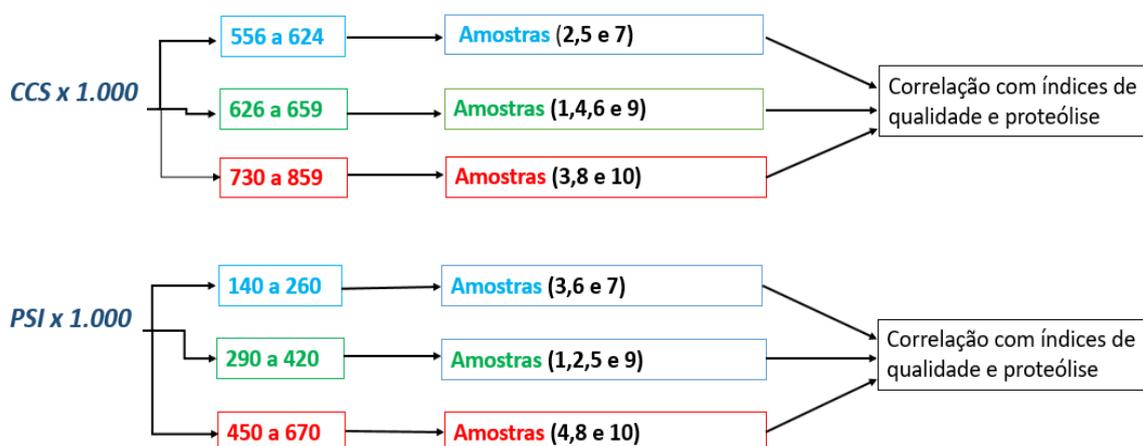
Para avaliar a proteólise no leite UHT durante sua vida de prateleira, foi utilizada as mesmas metodologias descritas no item 3.2.4

3.4 Análise dos Resultados

As amostras foram coletadas de forma aleatória, em dias distintos, totalizando dez amostras de leite cru, dez de leite pasteurizado e cento e vinte amostras de leite UHT.

Os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas, c-GMP e IP foram tabulados e avaliados. Inicialmente os resultados foram divididos em três grupos, conforme (Figura 3), tendo como referência para esta divisão os resultados da contagem de células somáticas (CCS) e da contagem de psicrotróficos (PSI). Para as análises do leite UAT, além da divisão por estes parâmetros citados, os tratamentos foram arranjados seguindo um esquema de parcela subdividida por tempo (dias de estocagem).

Figure 3 - Divisão das amostras baseado nos resultados de CCS e PSI



Fonte: Próprio autor

3.4.1 Análise Estatística dos resultados

A média dos resultados dos três grupos de CCS e de PSI foram relacionadas com as variáveis estudadas. Os resultados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk em um nível de significância de 5%, ($p \leq 0,05$) utilizando o software Statistica® 7. Na sequência os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os grupos que apresentaram diferenças significativas foram comparados pelo teste de Tukey, com significância de 5% utilizando o software Statistica® 7. Foi utilizado ainda o Microsoft Excel versão 365 para elaboração de gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Leite Cru

Em se tratando da CCS, para os 10 lotes amostrados, os resultados variaram de 556.000 a 859.000 CS/mL.

Conforme descrito anteriormente, as amostras foram divididas em três grupos, consideradas como média, intermédia e alta. Ressalta-se que o limite estabelecido na Instrução Normativa 76/2018, para o leite cru refrigerado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste é de no máximo 500.000 CS/mL em nível de produtor, com análises mensais, depois são consideradas as médias geométricas dos resultados de um trimestre (MAPA, 2018).

Os resultados apresentaram normalidade e variâncias homogêneas, de acordo com o teste de Shapiro Wilk, com nível de significância de 5%.

Para os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru dos 10 lotes avaliados individualmente estão disponíveis no (Anexo I). As médias dos resultados para cada parâmetro de qualidade, correspondentes aos três grupos de CCS (baixa, intermediária e alta), estão apresentados na Tabela 1.

Os valores preconizados pelas Instruções Normativas 76 e 77 (MAPA, 2018), para o leite cru refrigerado estão descritos nos resultados junto às Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade em relação aos três níveis de CCS.

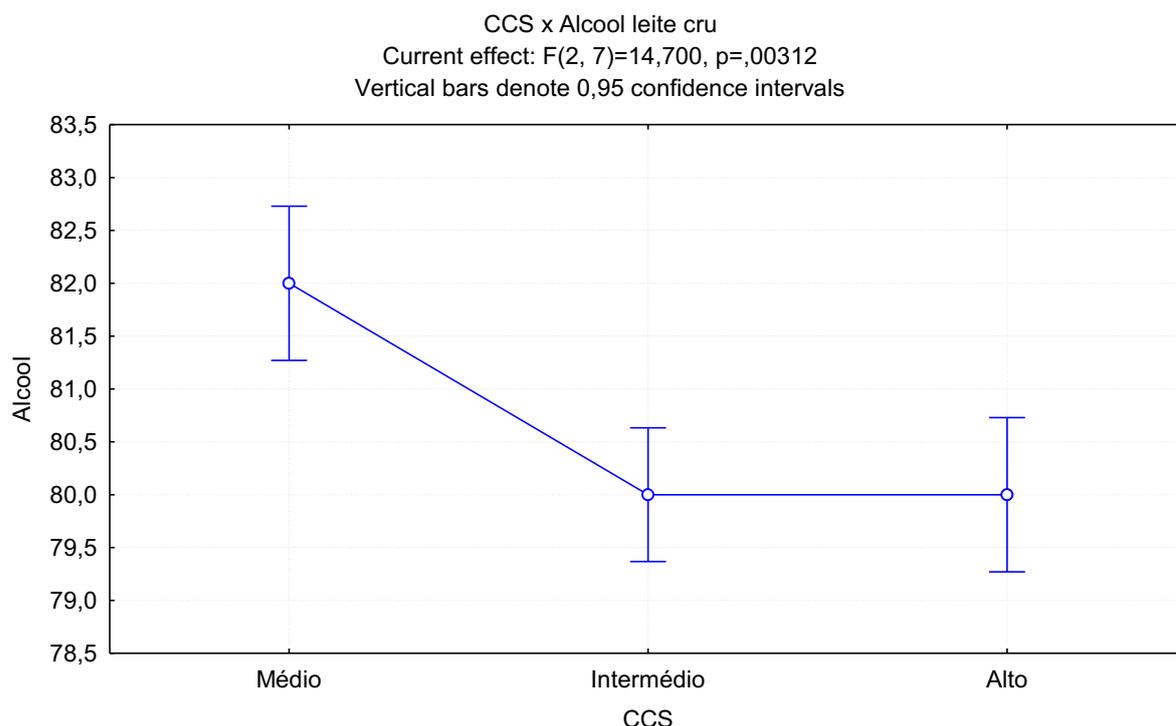
Parâmetros de Qualidade	CCS x 1.000 (C/mL)			Legislação
	556 a 624	626 a 659	730 a 859	
Alcool (°GL)	82 ^b	80 ^a	80 ^a	mínimo - 72°GL
pH	6,72 ^a	6,75 ^a	6,71 ^a	*
I.C (°H)	-0,545 ^a	-0,539 ^a	-0,541 ^a	-0,530 a -0,555°H
Acidez (%)	0,140 ^a	0,147 ^a	0,150 ^a	0,14 a 0,18 %
Densidade (g/L)	1031,6 ^a	1031,73 ^a	1031,53 ^a	1028 a 1034 gr/L
Proteína %	3,32 ^a	3,34 ^a	3,33 ^a	mínimo 2,9%
Caseína %	2,53 ^a	2,54 ^a	2,48 ^a	*
Lactose %	4,41 ^a	4,41 ^a	4,37 ^a	mínimo 4,3%
Gordura %	3,81 ^a	3,62 ^a	3,67 ^a	mínimo 3%
EST %	12,26 ^a	12,36 ^a	12,37 ^a	mínimo 11,4%
Mesófilos (UFC/mL)	336.000 ^a	260.000 ^a	253.000 ^a	máximo 900.000
PSI (UFC/mL)	323.000 ^a	477.000 ^a	503.000 ^a	*
c-GMP	0	0	0	< 30 mg/mL
Amostras	2, 5 e 7	1, 4, 6 e 9	3, 8 e 10	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância. Legislação (IN 76 e 77 de 2018).

Todas as amostras encontraram-se estáveis quanto aos testes do álcool com grau acima de 79°GL e também com acidez menor que 0,15gr láctico/100mL. Os resultados de densidade, índice crioscópico, sólidos totais e gordura estiveram de acordo com a legislação, apresentando pequenas variações dentro dos limites esperados.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), exceto a variável estabilidade ao álcool (Figura 4), o que pode sugerir um leite mais estável em resultados mais baixos de CCS.

Figura 4 - Estabilidade ao álcool em relação aos níveis de CCS estabelecidos



Os resultados foram superiores ao descrito por Chavez (2004), sugeriu que, para fins de produção do leite UAT, o leite cru deve resistir, no mínimo, ao etanol 74% (v/v).

Sobre a contagem de mesófilos, os resultados observados encontraram-se abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação para o leite cru refrigerado em nível de indústria, que é até 900.000 UFC/mL (MAPA, 2018). Os resultados obtidos das 10 amostras deste estudo apresentaram-se abaixo de 670.000 UFC/mL. Valores próximos aos das contagens de microrganismos psicotróficos (PSI), que estiveram entre 140.000 e 670.000 UFC/mL, conforme Figura 5.

Quanto aos testes rápidos semiquantitativos c-GMP para proteólise, todas as amostras apresentaram resultados dentro do esperado, 0 mg/mL, indicando a que não havia traços de proteólise ou soro no leite recebido no laticínio.

Os resultados do leite cru também foram avaliados tendo como referência os resultados de contagens de psicotróficos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade em relação aos níveis de PSI.

Parâmetros de Qualidade	PSI x 1.000 (UFC/mL)			Legislação
	140 a 260	290 a 420	450 a 670	
Álcool (°GL)	81 ^a	80,75 ^a	80 ^a	mínimo - 72°GL
pH	6,74 ^a	6,73 ^a	6,73 ^a	*
I.C (°H)	-0,541 ^a	-0,541 ^a	-0,543 ^a	-0,530 a -0,555°H
Acidez (% ácido láctico)	0,147 ^a	0,145 ^a	0,147 ^a	0,14 a 0,18 %
Densidade (gr/L)	1031,53 ^a	1031,88 ^a	1031,40 ^a	1028 a 1034
Proteína %	3,33 ^a	3,33 ^a	3,34 ^a	Mínimo 2,9
Caseína %	2,51 ^a	2,55 ^a	2,53 ^a	*
Lactose %	4,40 ^a	4,41 ^a	4,38 ^a	mínimo 4,3
Gordura %	3,71 ^a	3,69 ^a	3,68 ^a	mínimo 3%
EST %	12,19 ^a	12,38 ^a	12,4 ^a	mínimo 11,4%
Mesófilos (UFC/mL)	121.000 ^a	302.500 ^a	366.666 ^a	máximo 900.000
CCS (CS/mL)	649.000 ^a	640.750 ^a	739.000 ^a	*
c-GMP	0	0	0	< 30 mg/mL
Amostras	3, 6 e 7	1, 2, 5 e 9	4, 8 e 10	

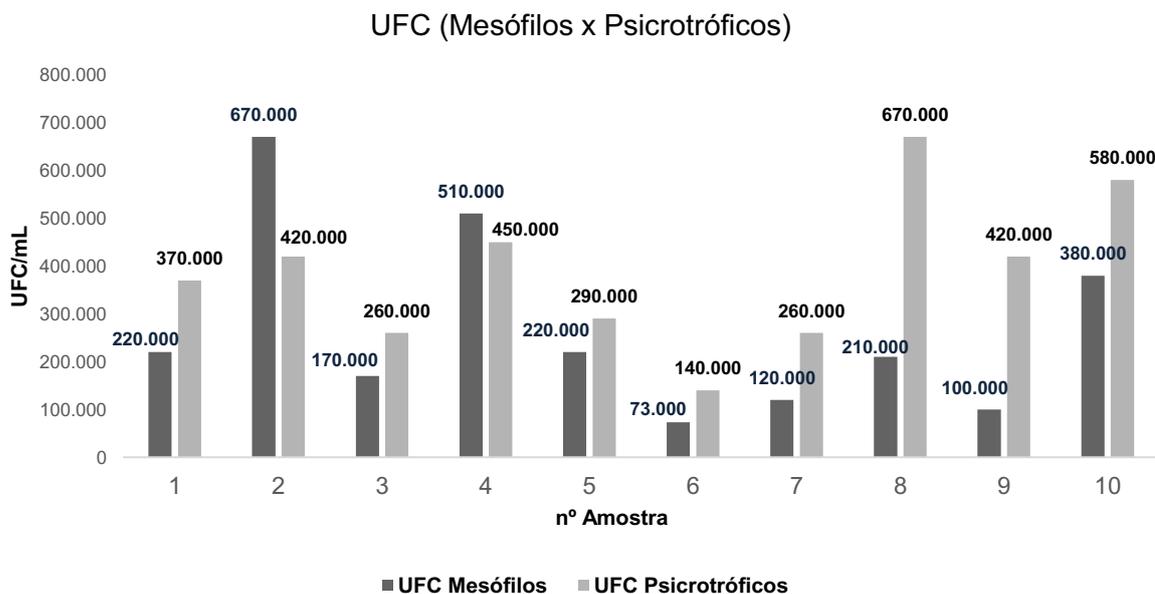
Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância. Legislação (IN 76 e 77 de 2018).

No geral, a composição físico-química encontrou-se dentro dos limites especificados pela legislação brasileira (Brasil, 2018), exceto pela CCS, cujos resultados serão discutidos adiante. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no teste de Tukey para as variáveis analisadas relacionadas aos níveis de PSI.

Observa-se nas Tabelas 1 e 2, que as maiores CCS estão relacionados aos maiores níveis de psicotróficos no leite. Embora não tenha relação, ou seja, a origem destes índices ocorre por vias distintas, mas observa-se que, em nível de campo, produtores que tem menores contagens de células somáticas são os que tem melhores resultados em bactérias totais, ou seja, está relacionado aos cuidados gerais com a qualidade do leite do leite e sanidade do rebanho.

Os resultados das contagens de psicotróficos foram comparadas as contagens de mesófilos, conforme a Figura 5.

Figura 5 - Comparativo entre os resultados de mesófilos e psicotróficos das 10 amostras do estudo.



Não foi observado um padrão das contagens de bactérias psicrotróficas com as mesófilas. Na maioria das amostras a contagem de psicrotróficos apresentou-se maior do que a de mesófilos.

Em 2002 foi implementada a IN 51, que regulamentou a refrigeração do leite em tanques de expansão na fazenda logo após a ordenha, o que trouxe avanços na melhoria da qualidade relacionado às bactérias totais, contudo, se não forem atendidos os princípios básicos de higiene na ordenha, tempos elevados de estocagem sobre refrigeração proporcionam o crescimento seletivo das bactérias psicrotróficas, conseqüentemente perda de qualidade nos produtos após o processamento.

Antes da introdução da refrigeração na cadeia do leite, a principal microbiota deterioradora do leite eram as bactérias mesófilas fermentadoras da lactose, que causavam rápida acidificação em leite não refrigerado. O uso da refrigeração associado aos longos períodos de armazenamento selecionou a microbiota psicrotrófica (SANTOS et al., 2009).

De acordo com Melo Junior (2005), altas contagens de microrganismos psicrotróficos obtidas, particularmente, para o nível alto indicam falhas no processo higiênico da cadeia, seja na obtenção, aumentando a contaminação, seja na

estocagem refrigerada, coleta e transporte a granel com temperaturas e tempos inadequados.

A contaminação do leite por bactérias psicotróficas é considerada um dos fatores mais críticos que influencia a manutenção da qualidade do leite refrigerado, sendo o gênero *Pseudomonas*, o predominante no leite armazenado a 4°C por mais de 3 dias (SANTOS; FONSECA, 2001).

Deve ser ressaltada a importância da carga bacteriana do leite pós ordenha, referente a psicotróficos, não ultrapassar 10% da microbiota total, uma vez que quanto mais longo o tempo de estocagem sob condições de refrigeração, estes microrganismos predominarão no leite cru (PINTO et al., 2016).

Silva (2001), em seu estudo encontrou uma grande variação entre os valores de mesófilos, respectivamente de $1,9 \times 10^4$ UFC/mL a $1,6 \times 10^8$ UFC/mL, em amostras de leite cru refrigerado, coletadas no silo de uma indústria e destinadas ao processamento de leite UHT, segundo este autor, as contagens altas foram influenciadas pela maior distância entre os centros de produção de leite e a fábrica de laticínios.

Pinto et al., (2006) em um estudo semelhante, observaram contagens de psicotróficos no leite cru refrigerado variando entre $5,6 \times 10^5$ UFC/mL e $6,4 \times 10^6$ UFC/mL nas amostras coletadas no silo industrial. Contagens mais elevadas de bactérias psicotróficas se comparadas aos mesófilos também foram registradas por Silva (2001), em amostras de leite cru coletadas em silos de indústrias processadoras de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás.

Assim como neste estudo, Pinto et al., (2006) observou que o percentual de amostras de leite cru refrigerado, com contagens de bactérias psicotróficas superiores a 10% da contagem de mesófilos aeróbios foram de 100% nas amostras coletadas em silo industrial (PINTO et al., 2006).

4.2 Avaliação do Leite Pasteurizado

Os resultados das variáveis físico-químicas avaliadas no leite pasteurizado com seus respectivos dados individuais dos lotes analisados encontram-se no (Anexo II).

Assim como foi feito para o leite cru, foram utilizados como referência os parâmetros de CCS e de PSI para estabelecer relação com as demais variáveis de qualidade avaliadas.

Não foram observadas variações se comparado aos resultados do leite cru, exceto pelo teor de gordura, álcool e densidade. Nesta etapa de processamento, a gordura foi padronizada entre 3 e 3,1% e também são adicionados os estabilizantes (citrato de sódio 0,02% e fosfato de sódio 0,04%), com a adição, todos os resultados da prova do álcool apresentaram negativos a 85°GL.

Os valores médios de proteína total, proteína verdadeira, caseína, índice de proteólise dos leites pasteurizados dos três grupos encontram-se nas Tabelas 3 e 4, e os resultados individuais dos lotes no Anexo II.

Tabela 3 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade do leite pasteurizado em relação aos níveis de CCS.

Parâmetros de Qualidade	CCS x 1.000 (C/mL)		
	556 a 624	626 a 659	730 a 859
Álcool (°GL)	85 ^a	85 ^a	85 ^a
pH	6,80 ^a	6,79 ^a	6,82 ^a
I.C (°H)	-0,544 ^a	-0,547 ^a	-0,547 ^a
Acidez (% ácido láctico)	0,150 ^a	0,145 ^a	0,147 ^a
Densidade (g/L)	1031,0 ^a	1031,95 ^a	1031,5 ^a
Proteína % (infravermelho)	3,31 ^a	3,35 ^a	3,34 ^a
Caseína % (infravermelho)	2,48 ^a	2,53 ^a	2,52 ^a
Lactose %	4,38 ^a	4,4 ^a	4,39 ^a
Gordura %	3,05 ^a	3,05 ^a	3,08 ^a
EST %	11,4 ^a	11,51 ^a	11,54 ^a
Proteína V % (Kjeldahl)	3,17 ^a	3,17 ^a	3,19 ^a
Caseína % (Kjeldahl)	2,34 ^a	2,32 ^a	2,41 ^a
Proteólise % (Kjeldahl)	0,74 ^a	0,74 ^a	0,76 ^a
c-GMP	0	0	0
<i>Média das Amostras</i>	<i>2, 5 e 7</i>	<i>1, 4, 6 e 9</i>	<i>3, 8 e 10</i>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as variáveis analisadas. Observou-se que a matéria prima testada neste estudo estava dentro da faixa considerada ideal para o processamento UHT.

No que se refere aos sólidos totais e proteínas, Fernandes (2007) afirmou não haver correlação com a CCS, assim como foi observado neste estudo. Porém, deve-

se ressaltar que o nível máximo de CS neste estudo foi de 859.000 CS/mL e há relatos de correlação entre CCS e sólidos totais com níveis acima de 1.000.000 CS/mL.

Nesta etapa foram consideradas as análises das frações de proteína pelo método de Kjeldahl, assim como observado nos demais parâmetros de qualidade, para as variáveis proteína total, proteína verdadeira, caseína e índice de proteólise não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos estabelecidos, conforme as Tabelas 3 e 4.

Tabela 4 - Média dos resultados dos parâmetros de qualidade do leite pasteurizado em relação aos níveis de PSI.

Parâmetros de Qualidade	PSI x 1.000 (UFC/mL)		
	140 a 260	290 a 420	450 a 670
Álcool (°GL)	85 ^a	85 ^a	85 ^a
pH	6,81 ^a	6,78 ^a	6,83 ^a
I.C (°H)	-0,547 ^a	-0,545 ^a	-0,546 ^a
Acidez (% ácido láctico)	0,147 ^a	0,150 ^a	0,143 ^a
Densidade (g/L)	1031,47 ^a	1031,68 ^a	1031,4 ^a
Proteína % (infravermelho)	3,32 ^a	3,34 ^a	3,34 ^a
Caseína % (infravermelho)	2,50 ^a	2,52 ^a	2,52 ^a
Lactose %	4,39 ^a	4,39 ^a	4,39 ^a
Gordura %	3,07 ^a	3,05 ^a	3,05 ^a
EST %	11,48 ^a	11,51 ^a	11,5 ^a
Proteína V % (Kjeldahl)	3,13 ^a	3,24 ^a	3,18 ^a
Caseína % (Kjeldahl)	2,31 ^a	2,39 ^a	2,37 ^a
Proteólise % (Kjeldahl)	0,74 ^a	0,75 ^a	0,74 ^a
c-GMP	0	0	0
<i>Média das Amostras</i>	<i>3, 6 e 7</i>	<i>5, 1, 9 e 2</i>	<i>4, 8 e 10</i>

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Assim como observado no leite cru, os resultados de c-GMP no leite pasteurizado apresentaram-se dentro do esperado, sem indícios de proteólise, mesmo após a pasteurização.

Santos e Fonseca (2001), relataram alterações físico-químicas e atividade proteolítica em amostras de leite pasteurizado nos quais as contagens médias de psicotróficos no leite cru foram entre 10.000.000 e 31.600.000 (UFC/ml), os valores médios de atividade proteolítica variaram entre 3 e 12 U/mL. Neste presente estudo, as maiores contagens foram 670.000 UFC/mL e não houve alterações significativas.

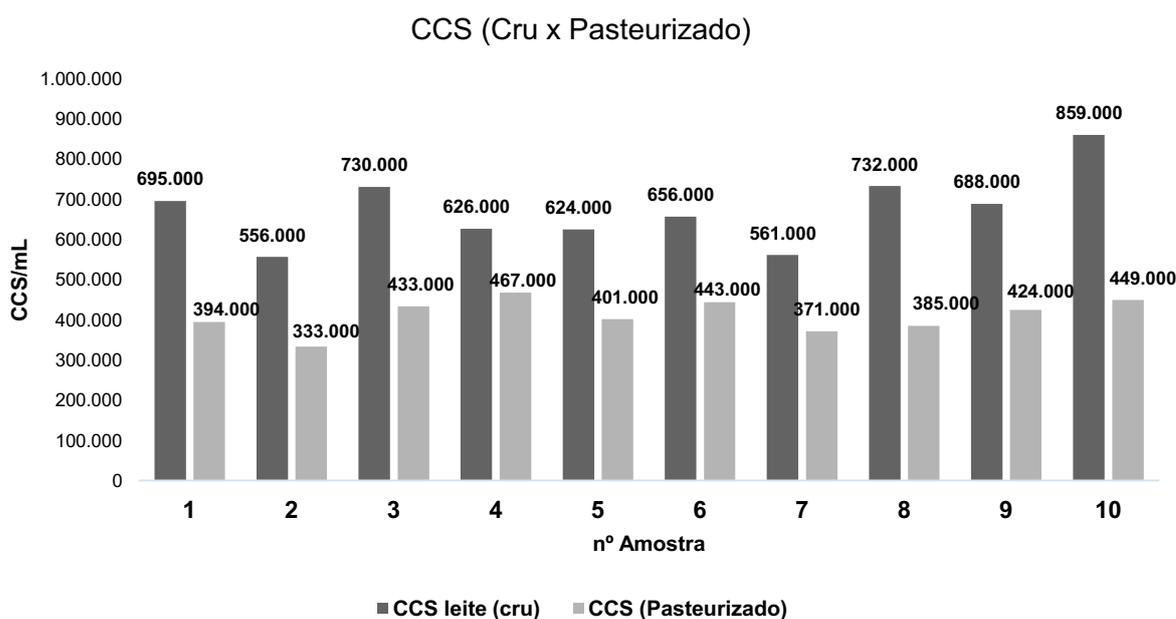
4.2.1 CCS leite cru x CCS leite pasteurizado

A CCS foi testada também no leite pasteurizado, foi feito um comparativo dos resultados com o leite cru, visando identificar o quanto o processo de clarificação é capaz de reduzir estes índices.

Conforme decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, atualizado pelo decreto nº 10.468 de 25 de agosto de 2020, Art. 253, entende-se por clarificação a retirada das impurezas do leite por processo mecânico, mediante centrifugação ou outro processo tecnológico equivalente. Todo leite destinado ao consumo humano direto deve ser submetido à clarificação.

Observou-se redução significativa nos resultados de CCS após a clarificação, conforme a Figura 6

Figura 6 - Comparativo entre os resultados de CCS, cru x pasteurizado, das 10 amostras do estudo.



O processo de clarificação por centrifugação mostrou-se efetivo para remoção de parte da carga de células somáticas, conforme evidenciado na Figura 6, houve redução das contagens em todas as amostras.

O processo de clarificação do laticínio em questão, consiste na centrifugação a 4.800 rpm do leite pré-aquecido a 50°C em um fluxo constante de 20.000 a 25.000 L/h. A cada 30 minutos de centrifugação é realizada uma descarga automática da centrífuga, onde são descartadas as impurezas separadas do leite em um volume líquido de 80 a 100L por descarga.

Não foram encontrados relatos em literatura que tornasse possível comparar aos resultados de redução da CCS no processo de clarificação, o que torna isso um interessante ponto a ser pesquisado futuramente.

4.3 Avaliação do Leite UHT

4.3.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade físico-químicos e índices de proteólise, relacionados aos resultados de CCS e PSI do leite cru.

Os resultados dos parâmetros físico-químicos de qualidade dos dez lotes do leite UHT avaliados nos dias (0, 30, 60, 90 e 120), estão apresentados individualmente no Anexo III. As médias destes parâmetros de qualidade, correspondentes aos três grupos de CCS (média, intermediária e alta) e aos três grupos de PSI (baixo médio e alto), encontram-se nas Tabelas 5 a 32 e ilustrados nas Figuras 7 a 45. Os resultados individuais foram testados estatisticamente a um nível de significância de 5%, tendo como referência os grupos estabelecidos de CCS, de PSI e também quanto ao período de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias).

4.3.1.1 pH e Acidez

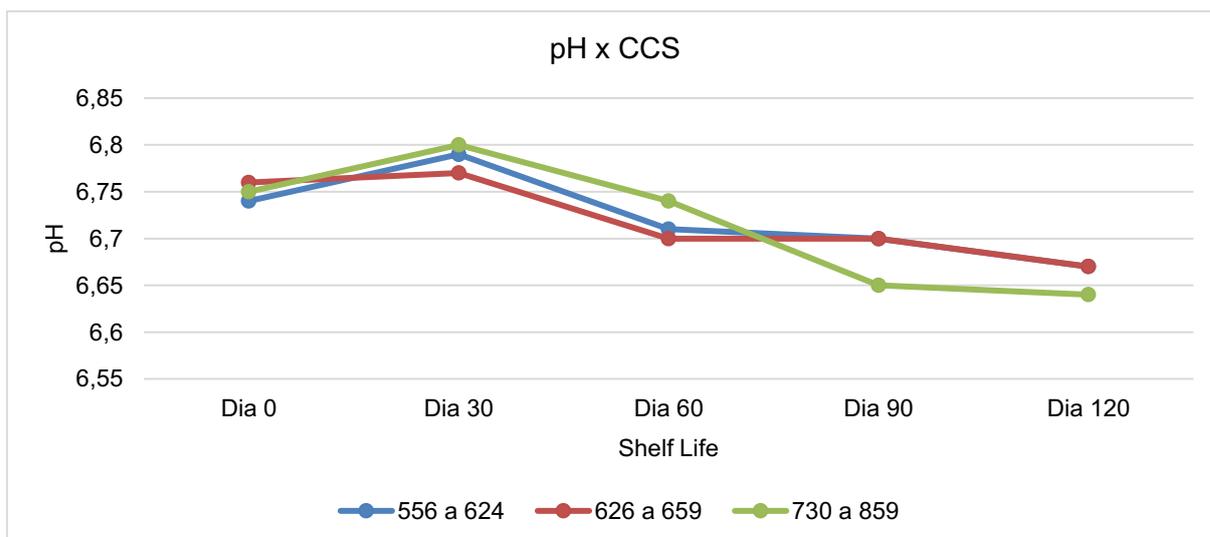
Os resultados das análises de pH e acidez titulável do leite UHT relacionados aos resultados de CCS do leite cru estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e nas Figuras 7, 8 e 9. Os resultados obtidos nos 10 lotes avaliados variaram de 6,79 a 6,62 e de 0,14 a 0,16% de ácido láctico, respectivamente. Todos os resultados se enquadram nos parâmetros preconizados na legislação.

Tabela 5 – Resultados do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	pH					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		6,74 ^{a a}	6,79 ^{a b}	6,71 ^{a b}	6,70 ^{a b}	6,67 ^{a b}
626 a 659		6,76 ^{a a}	6,77 ^{a a}	6,70 ^{a b}	6,70 ^{a b}	6,67 ^{a b}
730 a 859		6,75 ^{a a}	6,80 ^{a b}	6,74 ^{a a}	6,65 ^{a c}	6,64 ^{a c}

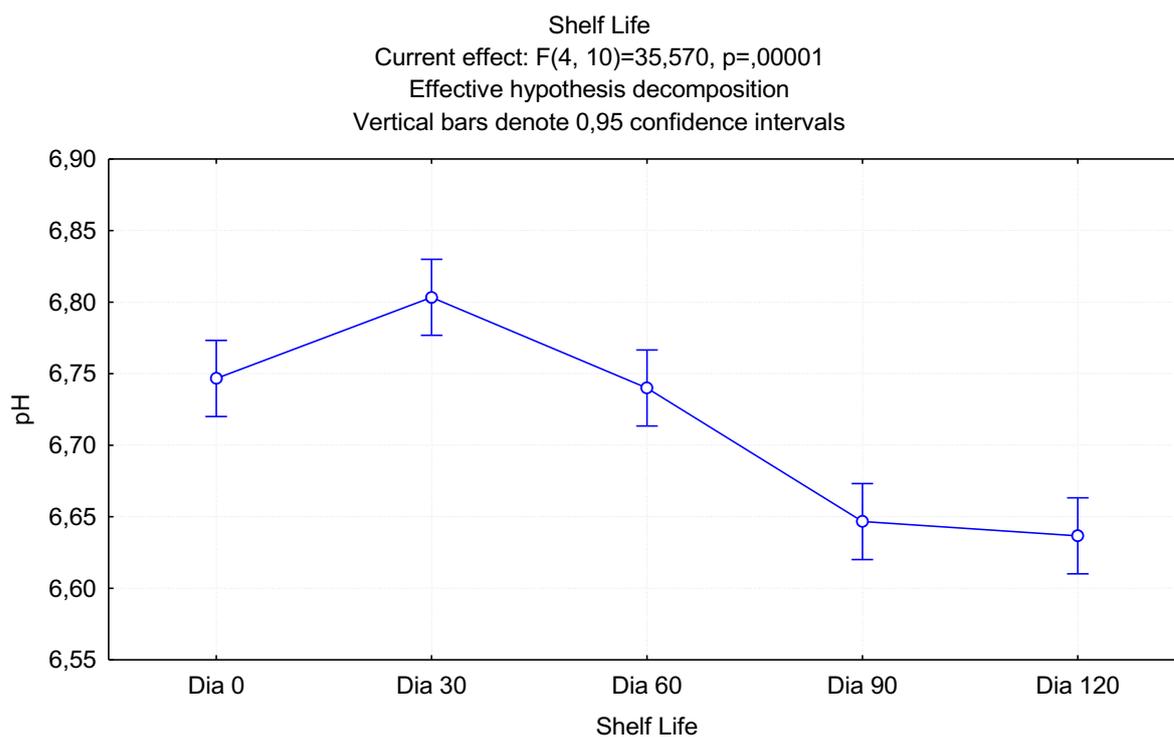
Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 7 - Evolução do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS



Para a variável pH, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de CCS quando avaliados individualmente no mesmo dia de armazenamento. Contudo, ao comparar os resultados no decorrer da vida de prateleira, foi observada diferença significativa entre os grupos referentes aos dias de armazenamento. Na Figura 7 é possível observar que houve elevação do pH no dia 30 de armazenamento para os três grupos, cujas causas da elevação não foram evidenciadas, bem como não foram encontrados relatos na literatura para comparação. Na sequência, foi observada redução gradativa do pH, semelhante para os três grupos.

Figura 8 - Evolução do pH no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS



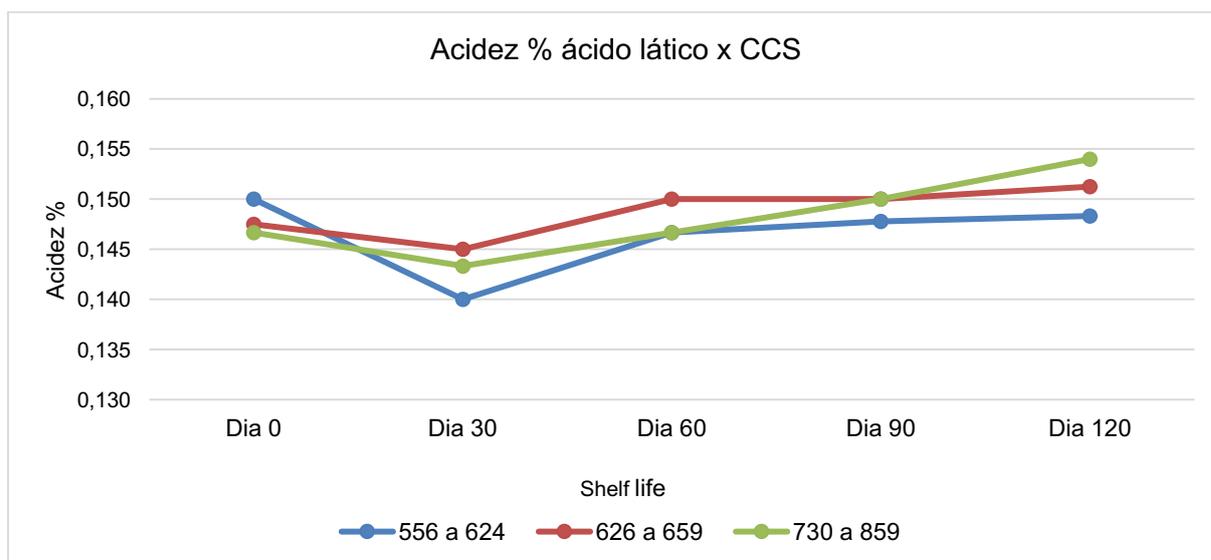
Fernandes (2007), observou efeito linear do tempo de armazenamento ($p < 0,05$) sobre o pH e a acidez em amostras de UHT cuja CCS do leite cru apresentou-se acima das 800.000 células/mL, observou ainda valores de acidez superiores a 0,18% a partir de 60 dias de armazenamento.

Tabela 6 - Resultados de acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Acidez (%)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		0,15 ^{a a}	0,14 ^{a a}	0,15 ^{a a}	0,15 ^{a a}	0,15 ^{a a}
626 a 659		0,15 ^{a a}				
730 a 859		0,15 ^{a a}	0,14 ^{a a}	0,14 ^{a a}	0,15 ^{a a}	0,15 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 9 - Evolução da acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento (CCS)



Para a variável acidez, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de CCS quando avaliados individualmente no mesmo dia de armazenamento. Embora seja possível observar leve elevação no decorrer da vida de prateleira, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos dias de armazenamento avaliados.

Agora referente a relação do pH e acidez com os grupos de PSI estabelecidos, os resultados estão apresentados nas Tabelas 07 e 08 e nas Figuras 10, 11 e 12 respectivamente. Os resultados obtidos nos 10 lotes testados variaram de 6,81 a 6,62 e de 0,14 a 0,16% de ácido láctico, respectivamente. Todos os resultados se enquadram nos parâmetros preconizados na legislação.

Para a variável pH, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando avaliados os resultados individualmente no mesmo dia de armazenamento. Ao comparar os resultados no decorrer da vida de prateleira, assim como para CCS, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) referente aos dias de armazenamento avaliados. Conforme a Figura 10, é possível observar que também houve redução gradativa do pH, queda semelhante nos três grupos, um pouco mais acentuada no grupo de PSI alta, representado na Figura 11.

Tabela 7 - Resultados do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	pH					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		6,76 ^{a a}	6,79 ^{a a}	6,72 ^{a ab}	6,66 ^{a b}	6,66 ^{a b}
290 a 420		6,74 ^{a ab}	6,78 ^{a a}	6,71 ^{a ab}	6,71 ^{a ab}	6,67 ^{a b}
450 a 670		6,76 ^{a a}	6,80 ^{a a}	6,72 ^{a a}	6,65 ^{a b}	6,64 ^{a b}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 10 – Evolução do pH do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

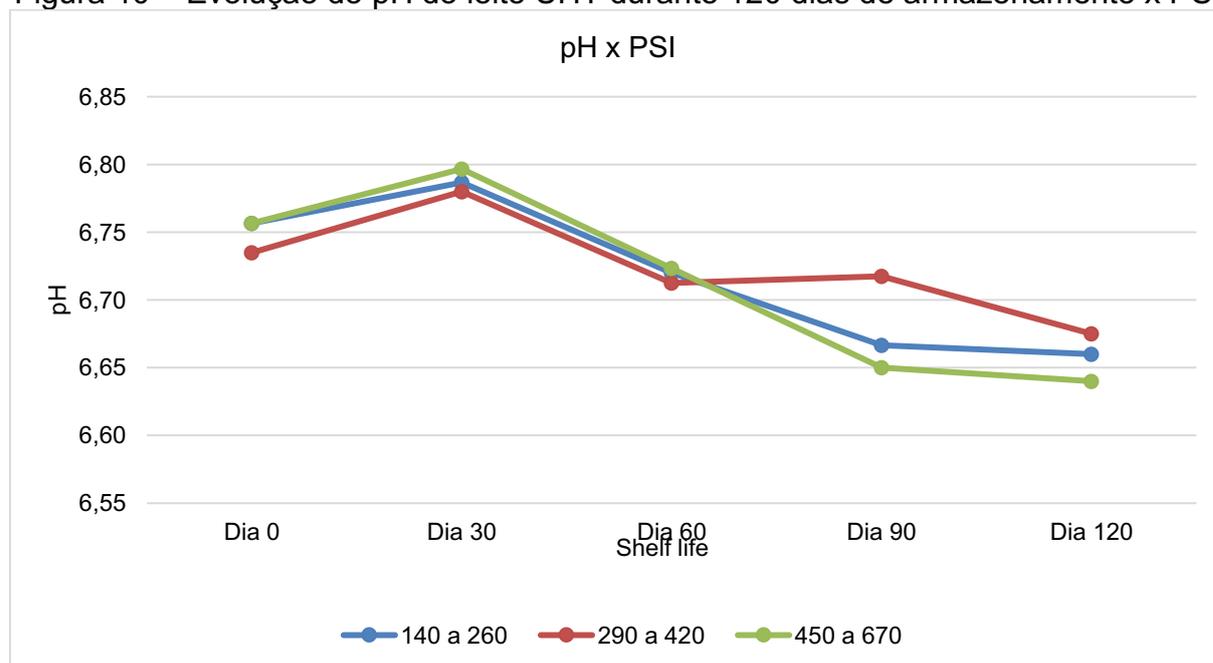
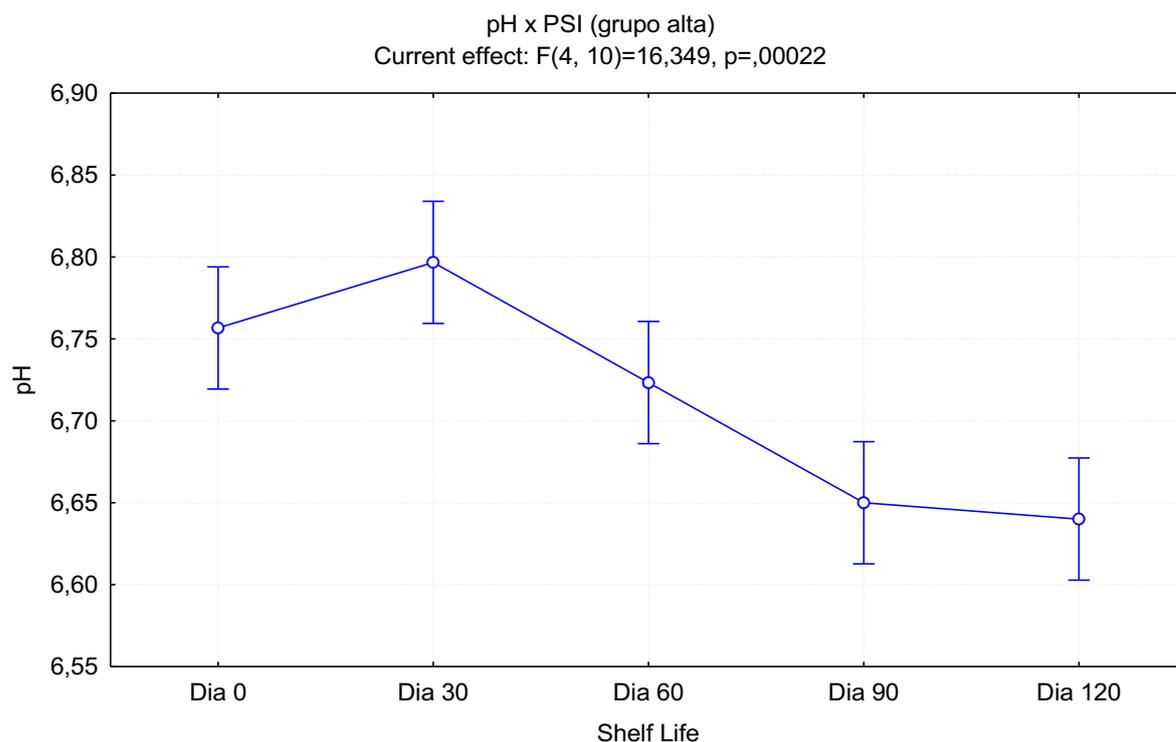


Figura 11 - Evolução do pH no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI



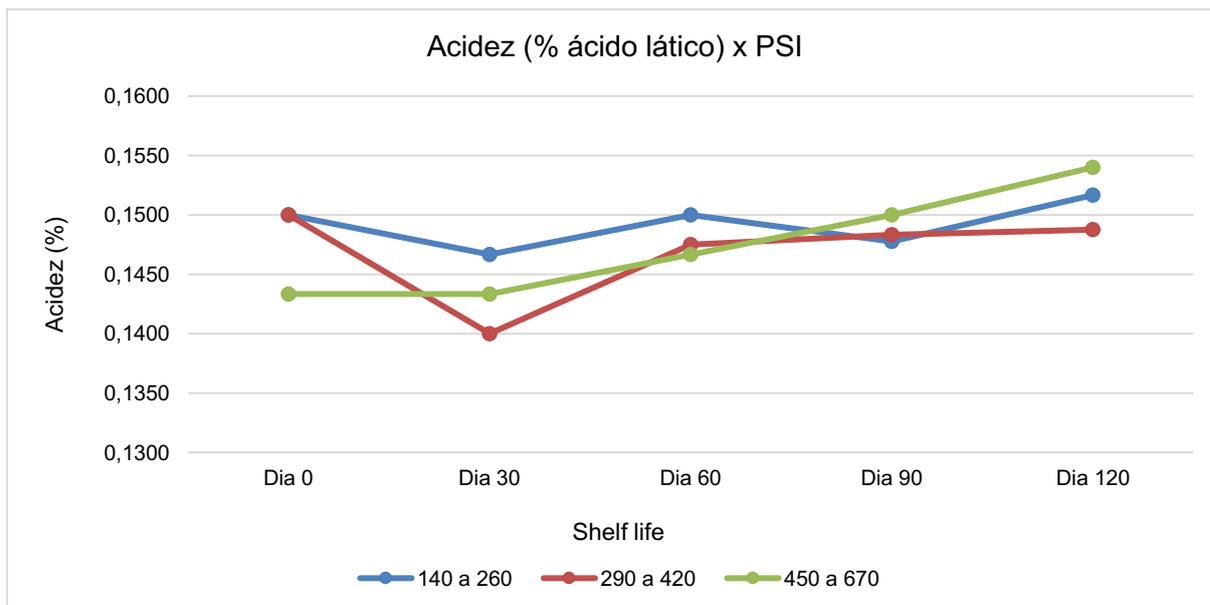
Sobre a variável acidez, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e nem referente ao dia de armazenamento.

Tabela 8 – Resultados de acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	Acidez (% ácido láctico)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		0,150 ^{a a}	0,147 ^{a a}	0,150 ^{a a}	0,148 ^{a a}	0,151 ^{a a}
290 a 420		0,150 ^{a a}	0,140 ^{a a}	0,147 ^{a a}	0,148 ^{a a}	0,148 ^{a a}
450 a 670		0,143 ^{a a}	0,143 ^{a a}	0,147 ^{a a}	0,150 ^{a a}	0,154 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 12 - Evolução da acidez do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI



Observa-se que, não foram obtidos resultados conclusivos para a influência dos grupos de psicrotróficos sobre o pH e a acidez. O pH oscilou entre 6,60 e 6,80 durante o estudo, sem tendência significativa quanto aos grupos. Apenas pode ser feita uma observação do quanto aos resultados de pH após o dia 90, uma vez que teve redução que em consonância com Melo Júnior (2005) em seu estudo sobre psicrotróficos, o qual observou que pH do leite UHT reduz com o armazenamento, com variação entre 6,70 e 6,59.

O decréscimo no pH reflete a progressiva liberação de prótons hidrogênio, revelando instabilidade iônica que pode comprometer as propriedades do leite UHT. São apontados como possíveis causas os deslocamentos no equilíbrio salino, como a insolubilização de fosfato de cálcio, além da Reação de Maillard e de eventual desfosforilação da caseína (DOMARESKI et al., 2010).

4.3.1.2 Densidade, gordura, extrato seco total, lactose e viscosidade

Em se tratando dos resultados do leite UHT para as variáveis densidade, gordura, extrato seco total, lactose, e viscosidade comparados aos grupos de CCS e PSI, os valores médios estão dispostos nas Tabelas 9 a 18 e ilustrados nas Figuras 13 a 22. Todos os resultados apresentaram-se dentro dos padrões exigidos em legislação para leite UHT, (MAPA 2006).

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as variáveis citadas, relacionadas aos grupos estabelecidos de CCS e de PSI, nem com relação

ao período de armazenamento. Nos dias 30, 90 e 120 de armazenamento, foi observado elevação gradativa da viscosidade nos três grupos de CCS e de PSI, sendo que o grupo de média PSI apresentou a maior viscosidade no dia 90, conforme Figura 22.

Tabela 9 – Resultados de densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Densidade (gr/L)				
VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624	1031,7 ^{a a}	1032,2 ^{a a}	1032,3 ^{a a}	1032,4 ^{a a}	1032,4 ^{a a}
626 a 659	1032,2 ^{a a}	1032,6 ^{a a}	1032,6 ^{a a}	1032,6 ^{a a}	1032,7 ^{a a}
730 a 859	1031,9 ^{a a}	1032,3 ^{a a}	1032,4 ^{a a}	1032,7 ^{a a}	1032,9 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Figura 13 - Evolução da densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

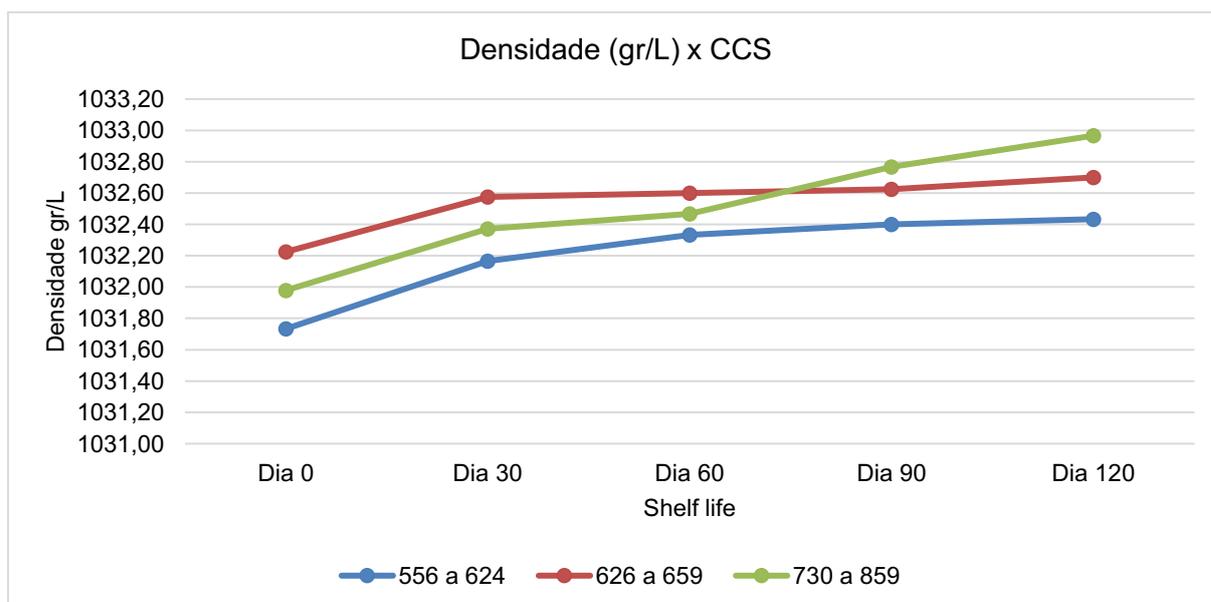


Tabela 10 - Resultados de densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	Densidade (gr/L)				
VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260	1032,5 ^{a a}	1032,4 ^{a a}	1032,3 ^{a a}	1032,1 ^{a a}	1032,4 ^{a a}
290 a 420	1031,7 ^{a a}	1032,3 ^{a a}	1032,5 ^{a a}	1032,6 ^{a a}	1032,6 ^{a a}
450 a 670	1033,1 ^{a a}	1032,8 ^{a a}	1032,8 ^{a a}	1032,8 ^{a a}	1033,1 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 14 – Evolução da densidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

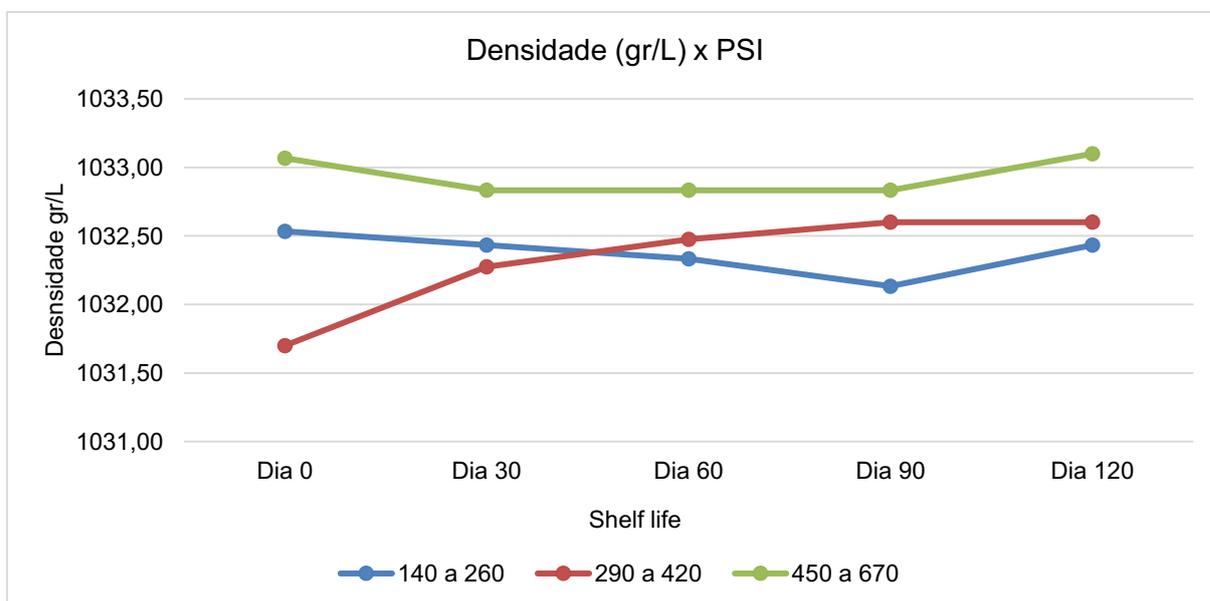


Tabela 11 - Resultados de EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	EST %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		11,54 ^{a a}	11,60 ^{a a}	11,61 ^{a a}	11,64 ^{a a}	11,62 ^{a a}
626 a 659		11,56 ^{a a}	11,64 ^{a a}	11,65 ^{a a}	11,66 ^{a a}	11,62 ^{a a}
730 a 859		11,65 ^{a a}	11,70 ^{a a}	11,73 ^{a a}	11,77 ^{a a}	11,73 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Figura 15– Evolução do EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

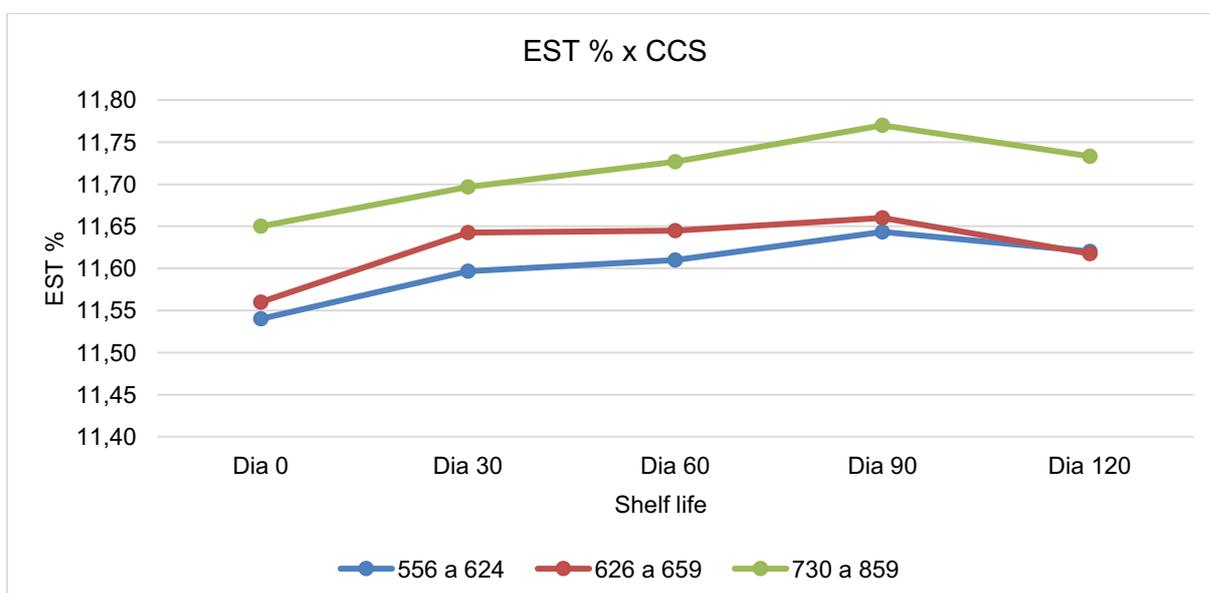


Tabela 12 - Resultados de EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	EST %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		11,59 ^{a a}	11,66 ^{a a}	11,68 ^{a a}	11,67 ^{a a}	11,68 ^{a a}
290 a 420		11,53 ^{a a}	11,60 ^{a a}	11,62 ^{a a}	11,65 ^{a a}	11,59 ^{a a}
450 a 670		11,64 ^{a a}	11,70 ^{a a}	11,69 ^{a a}	11,74 ^{a a}	11,71 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 16 - Evolução do EST do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

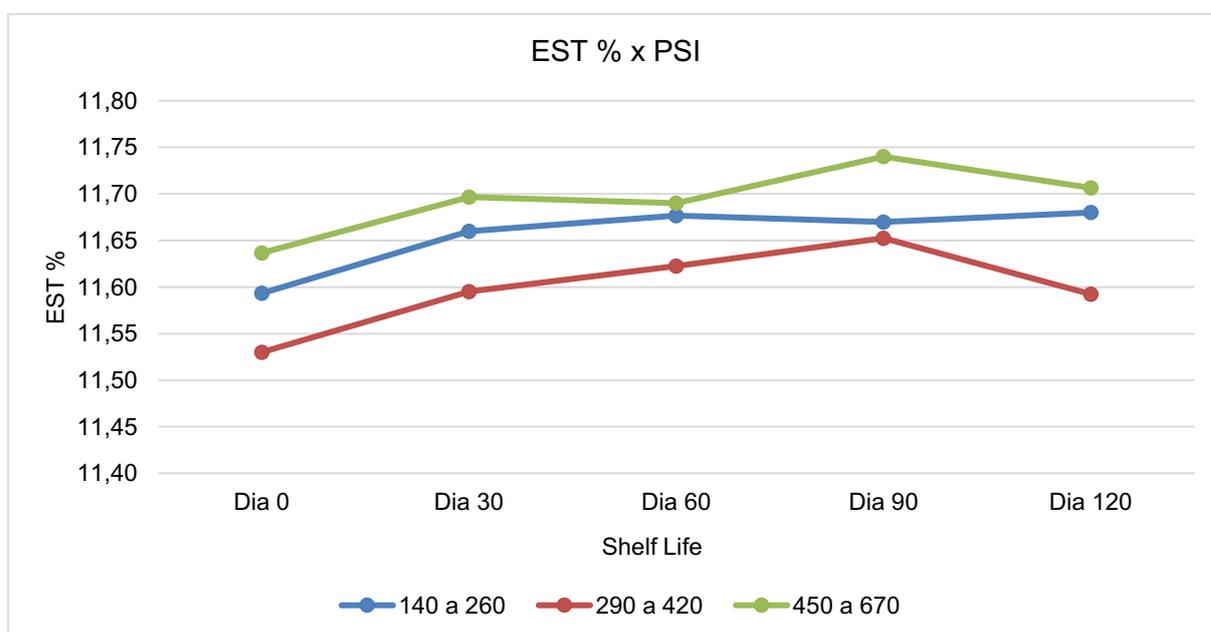


Tabela 13 – Resultados de lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Lactose %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		4,39 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,40 ^{a a}
626 a 659		4,40 ^{a a}	4,39 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,39 ^{a a}
730 a 859		4,41 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,39 ^{a a}	4,44 ^{a a}	4,43 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 17 - Evolução da lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

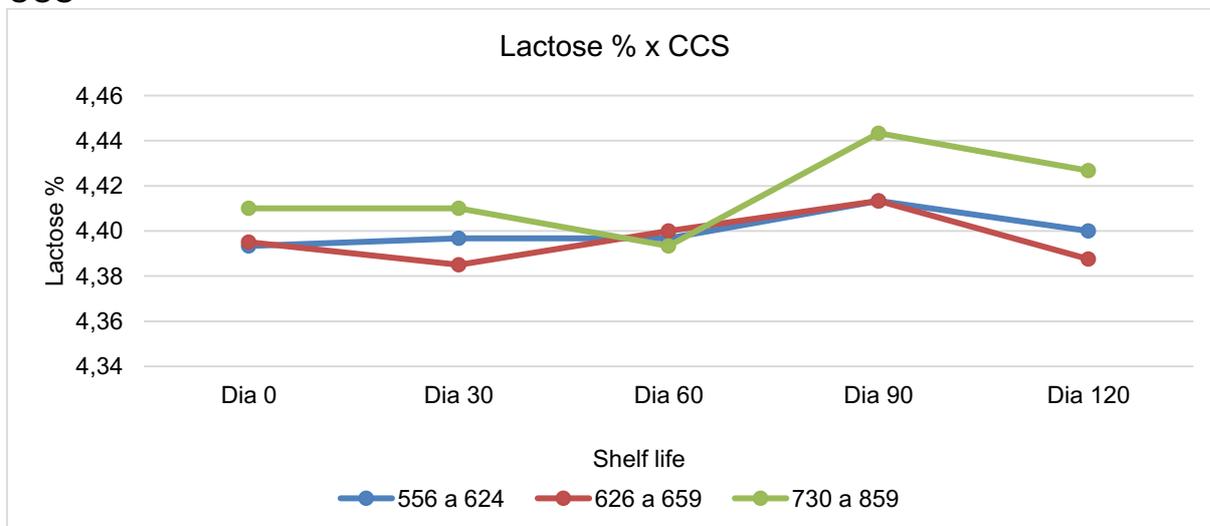


Tabela 14 – Resultados de lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	Lactose %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		4,41 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,40 ^{a a}
290 a 420		4,39 ^{a a}	4,39 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,41 ^{a a}	4,39 ^{a a}
450 a 670		4,41 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,40 ^{a a}	4,44 ^{a a}	4,41 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 18 - Evolução da lactose do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

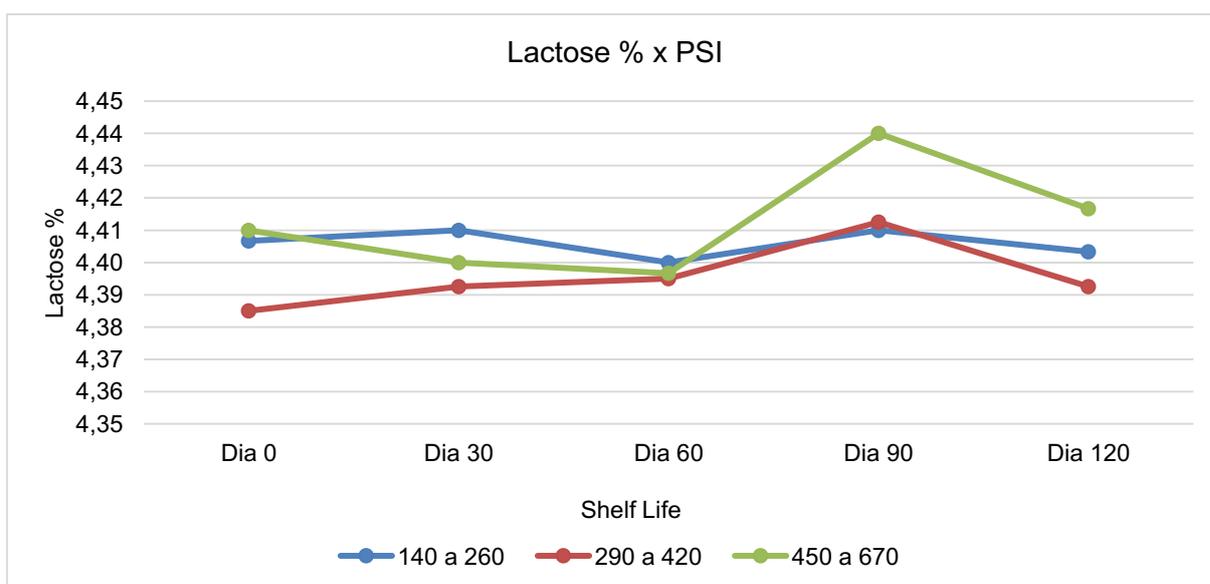


Tabela 15 – Resultados de gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	Gordura %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		3,09 ^{a a}	3,07 ^{a a}	3,09 ^{a a}	3,07 ^{a a}	3,09 ^{a a}
626 a 659		3,07 ^{a a}	3,09 ^{a a}	3,08 ^{a a}	3,07 ^{a a}	3,07 ^{a a}
730 a 859		3,09 ^{a a}	3,15 ^{a a}	3,13 ^{a a}	3,13 ^{a a}	3,14 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Figura 19 - Evolução da gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

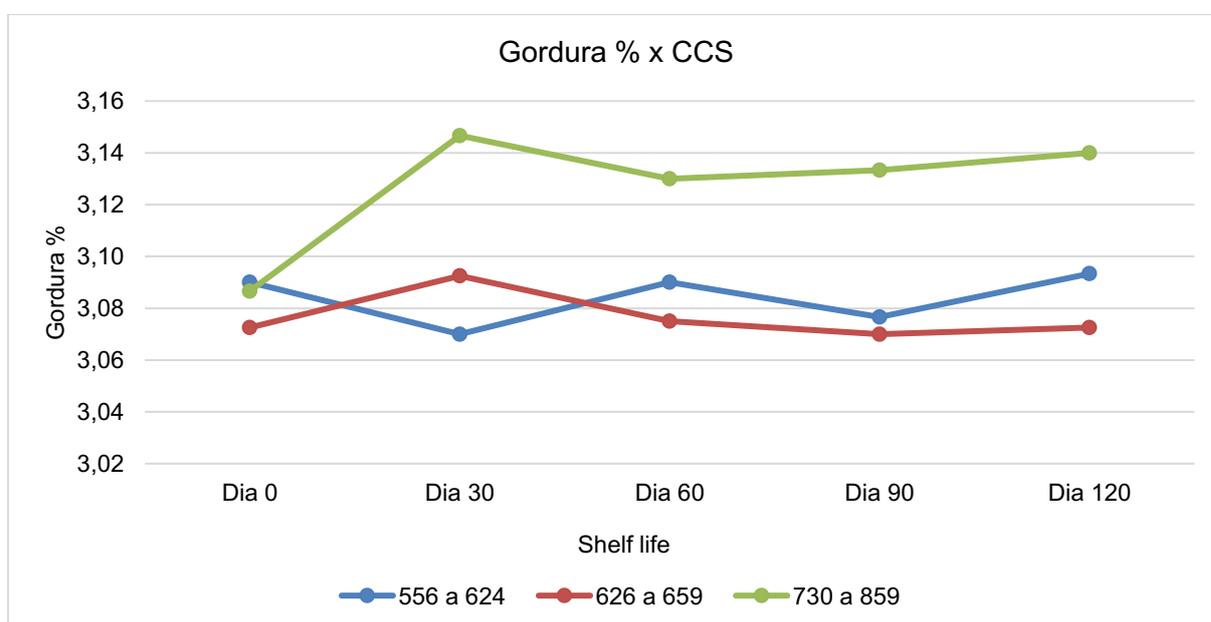


Tabela 16 – Resultados de gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Gordura %					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		3,13 ^{a a}	3,23 ^{a a}	3,12 ^{a a}	3,10 ^{a a}	3,11 ^{a a}
290 a 420		3,08 ^{a a}	3,08 ^{a a}	3,07 ^{a a}	3,07 ^{a a}	3,07 ^{a a}
450 a 670		3,07 ^{a a}	3,11 ^{a a}	3,12 ^{a a}	3,08 ^{a a}	3,12 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 20 – Evolução da gordura do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

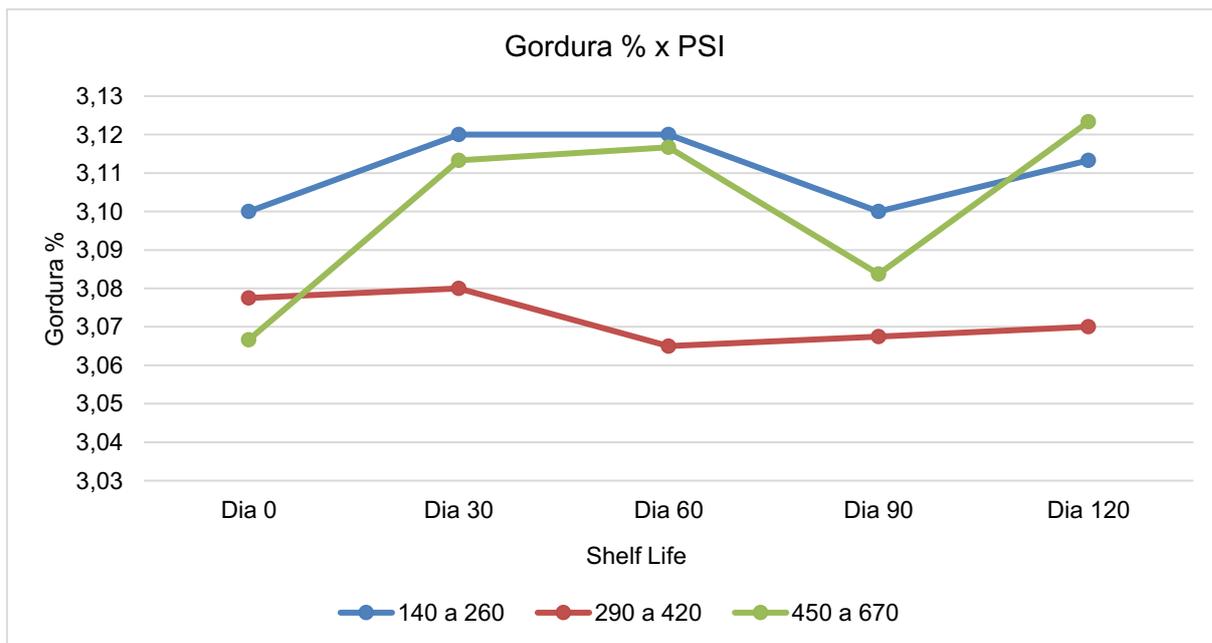


Tabela 17 – Resultados de viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	Viscosidade (cP)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		1,48 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,52 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,52 ^{a a}
626 a 659		1,48 ^{a a}	1,49 ^{a a}	1,50 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,51 ^{a a}
730 a 859		1,48 ^{a a}	1,50 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,52 ^{a a}	1,52 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 21 - Evolução da viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

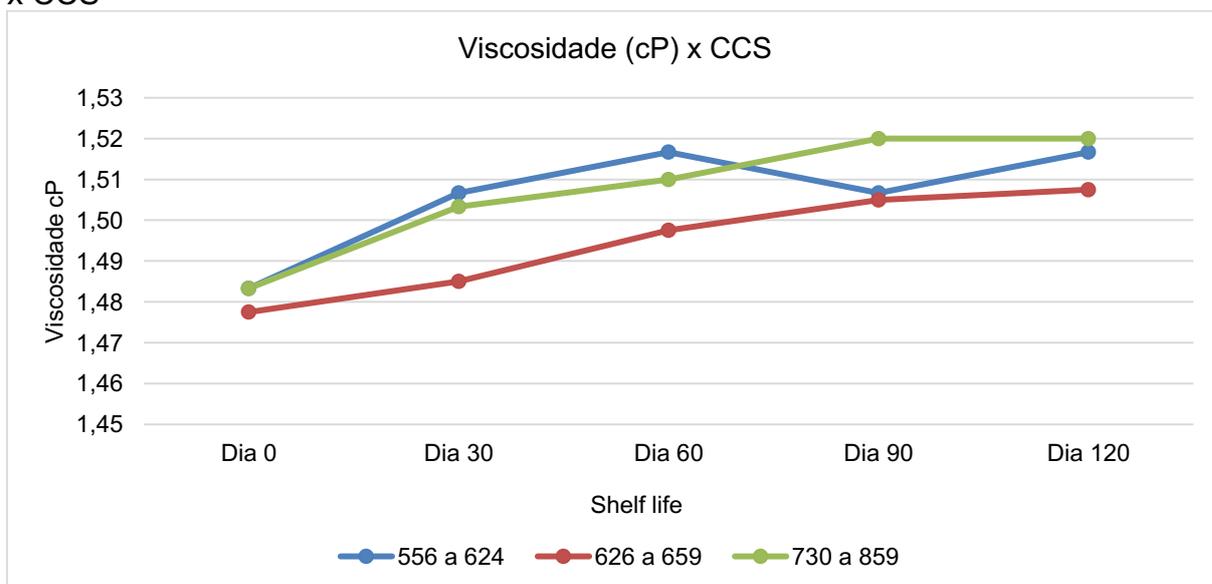
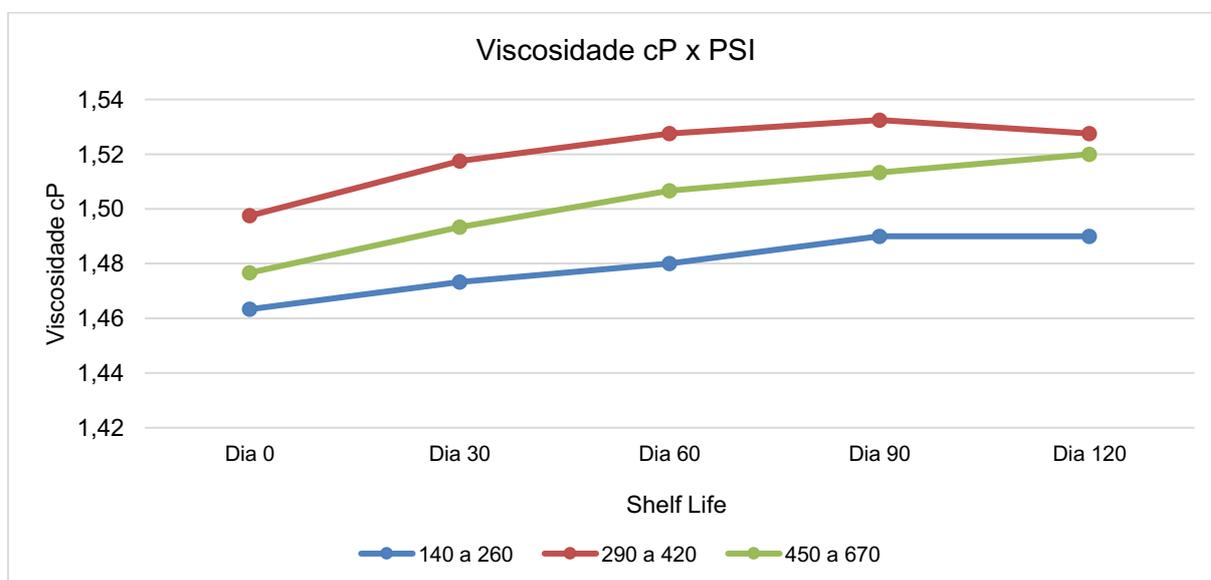


Tabela 18 – Resultados de viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Viscosidade (cP)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		1,46 ^{a a}	1,47 ^{a a}	1,48 ^{a a}	1,49 ^{a a}	1,49 ^{a a}
290 a 420		1,50 ^{a a}	1,52 ^{a a}	1,53 ^{a a}	1,53 ^{a a}	1,53 ^{a a}
450 a 670		1,48 ^{a a}	1,49 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,51 ^{a a}	1,52 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 22 - Evolução da viscosidade do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI



A partir dos resultados observados neste estudo apresentados acima, pode-se afirmar que os grupos de CCS e também o tempo de armazenamento não influenciaram significativamente os resultados de densidade, extrato seco total, lactose, gordura e viscosidade, da mesma forma, não foi apontada nenhum indício de influência dos grupos de psicrotróficos quanto aos parâmetros de qualidade acima retratados.

Melo Junior, (2005) em seu estudo sobre influência da CCS na viscosidade do leite UHT, observou aumento na viscosidade ao longo da validade do leite UHT, revelando a ocorrência do processo de geleificação e refletindo o fato de que a proteólise não é um processo imediato, pois a desestabilização proteica é um processo que exige, dentre outros fatores, um período de tempo relativamente longo para que ocorra.

Datta e Deeth (2003), observaram em seus estudos que as viscosidades dos leites gelificados foram altas, mas não houve correlação entre viscosidade e proteólise nestes leites. De acordo com os autores, a viscosidade é alta quando o leite está se aproximando do ponto de gelificação, mas decresce posteriormente, quando o gel é quebrado pela ação proteolítica. Em seguida, a proteólise aumenta progressivamente e atinge níveis mais altos, enquanto a viscosidade do leite retorna a baixos níveis.

Segundo Sanvido (2007), em geral, as populações de bactérias psicrófilas devem ser superiores a 10^6 UFC/mL⁻¹ para causar hidrólise na caseína, impactar negativamente quanto ao extrato seco e densidade, conseqüentemente o rendimento em produtos lácteos.

4.3.1.3 Proteína, método Infravermelho e Kjeldahl

Os resultados obtidos para proteína total (analisados por infravermelho) e proteína verdadeira (analisados utilizando o método Kjeldahl), encontram-se nas Tabelas 19 a 22 e nas Figuras 23 a 26.

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos de CCS e de PSI estabelecidos sobre os resultados de proteína total nem de proteína verdadeira, também não houve interação referente ao período de armazenamento.

Tabela 19 - Resultados de proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Proteína % – Milkoskan					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		3,35 ^{a a}	3,36 ^{a a}	3,35 ^{a a}	3,35 ^{a a}	3,34 ^{a a}
626 a 659		3,37 ^{a a}	3,37 ^{a a}	3,36 ^{a a}	3,37 ^{a a}	3,37 ^{a a}
730 a 859		3,34 ^{a a}	3,37 ^{a a}	3,36 ^{a a}	3,36 ^{a a}	3,36 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 23 – Evolução da proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

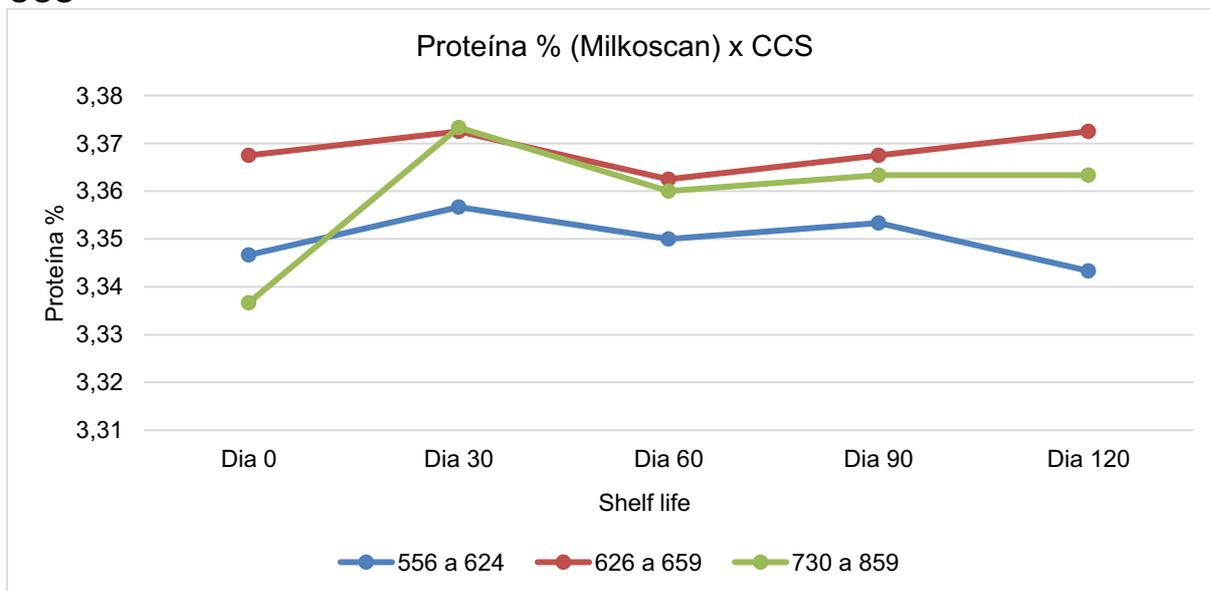


Tabela 20 – Resultados de proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	Proteína % – Milkoscan					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		3,35 ^{aa}	3,37 ^{aa}	3,36 ^{aa}	3,35 ^{aa}	3,36 ^{aa}
290 a 420		3,35 ^{aa}	3,36 ^{aa}	3,36 ^{aa}	3,36 ^{aa}	3,36 ^{aa}
450 a 670		3,36 ^{aa}	3,38 ^{aa}	3,36 ^{aa}	3,37 ^{aa}	3,36 ^{aa}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 24 - Evolução da proteína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

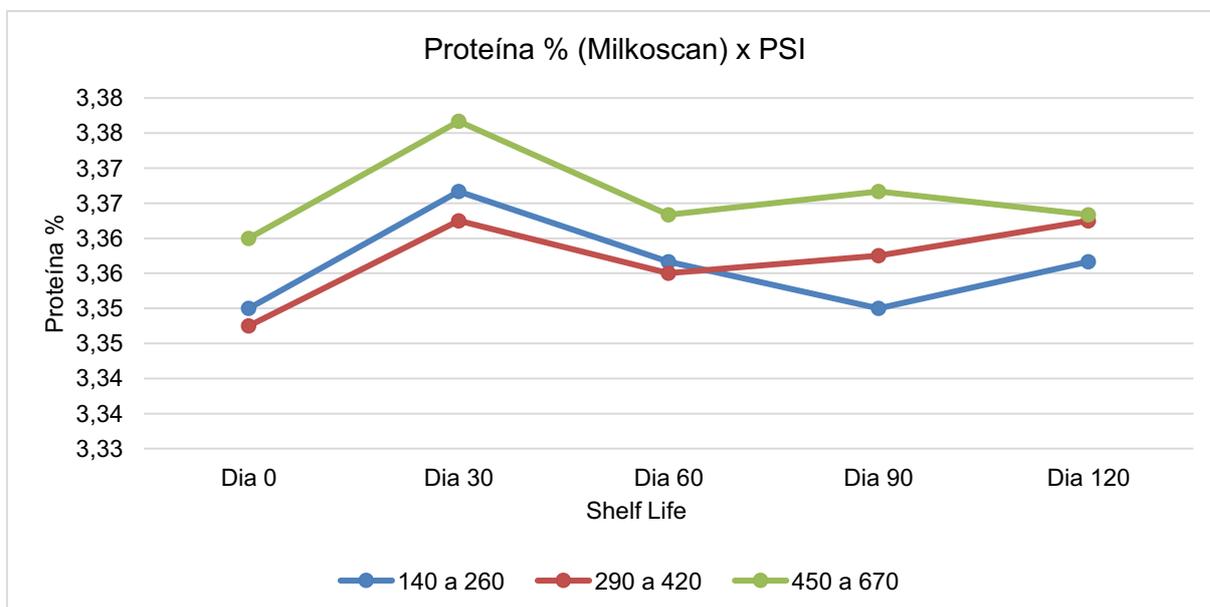


Tabela 21 - Resultados de proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	Proteína Verdadeira % – Kjeldahl				
VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624	3,17 ^{a a}	3,23 ^{a a}	3,39 ^{a a}	3,32 ^{a a}	3,29 ^{a a}
626 a 659	3,17 ^{a a}	3,23 ^{a a}	3,34 ^{a a}	3,30 ^{a a}	3,24 ^{a a}
730 a 859	3,19 ^{a a}	3,21 ^{a a}	3,24 ^{a a}	3,21 ^{a a}	3,22 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 25 - Evolução da proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

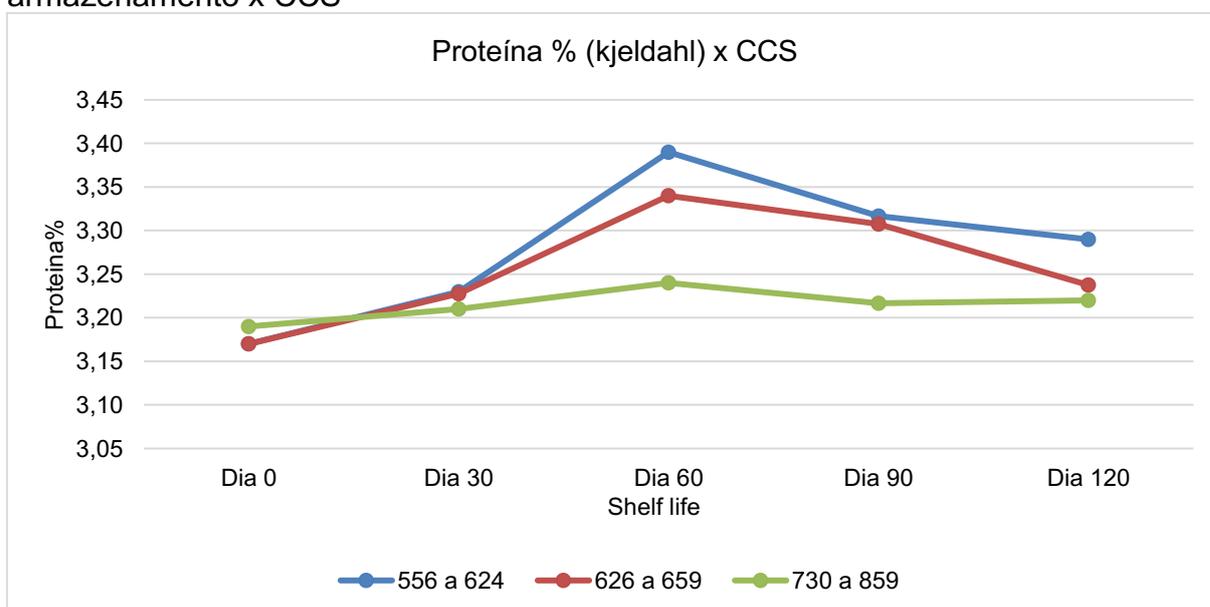
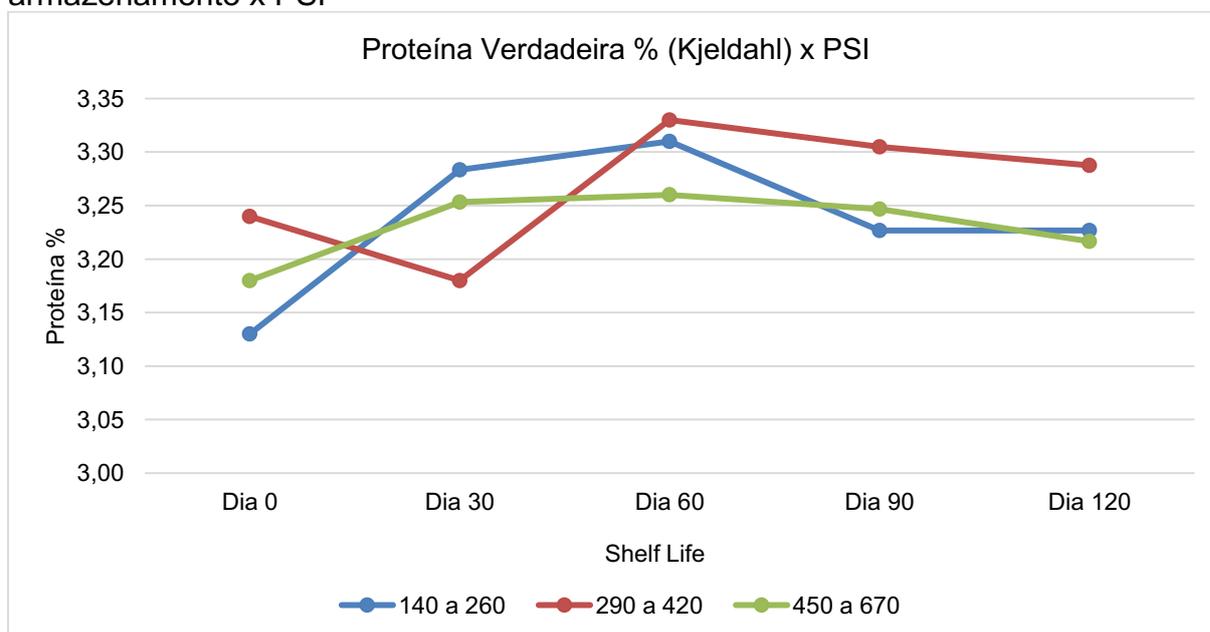


Tabela 22 - Resultados de proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Proteína Verdadeira % – Kjeldahl				
VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260	3,13 ^{a a}	3,28 ^{a a}	3,31 ^{a a}	3,23 ^{a a}	3,23 ^{a a}
290 a 420	3,24 ^{a a}	3,16 ^{a a}	3,13 ^{a a}	3,31 ^{a a}	3,29 ^{a a}
450 a 670	3,18 ^{a a}	3,25 ^{a a}	3,26 ^{a a}	3,25 ^{a a}	3,22 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 26 - Evolução da proteína verdadeira do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI



Observou-se resultados de proteína relativamente maiores para as análises realizadas pelo método infravermelho se comparado ao método Kjeldahl. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de no método Kjeldahl ter sido considerado a proteína verdadeira, ou seja, do resultado de proteína total é desconsiderada a fração de nitrogênio não proteico NNP.

Melo Junior (2005), diferentemente deste presente estudo, observou redução do teor de proteínas totais para relacionadas a uma média de contagem de células somáticas de 720.000 CS/mL foi mais severa em relação à redução do teor de proteína de leite com média de 320.000 CS/mL, possivelmente por uma proteólise mais intensa, devido à maior contagem de células, que liberaram proteases das próprias células somáticas, bem como ativadores de plasminogênio.

4.3.1.4 Caseína, método Infravermelho e Kjeldahl

Quanto aos resultados das análises de caseína, os resultados das médias dos grupos no decorrer do armazenamento encontram-se nas Tabelas 23 a 26 e ilustrados nas Figuras 29 a 33. Nos dois métodos utilizados não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos de CCS ou de PSI, exceto no dia 120 relacionado a CCS, no método Kjeldahl, o grupo de alta CCS apresentou diferença significativa em comparação ao grupo de média CCS.

Já para a interação dos grupos de CCS e de PSI com o período de armazenamento, foi detectada diferença significativa no (método infravermelho) no grupo alto de PSI, referente aos dias 0 e 120, já em relação a caseína analisada pelo (método Kjeldahl), apresentou diferença significativa no dia 30 para os três grupos e no dia 120 para o grupo alta de PSI e nos dias 90 e no dia 120, para os grupos intermediária a alta CCS.

Tabela 23 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Caseína % – Milkoscan					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		2,59 ^{a a}	2,57 ^{a a}	2,56 ^{a a}	2,55 ^{a a}	2,55 ^{a a}
626 a 659		2,59 ^{a a}	2,58 ^{a a}	2,56 ^{a a}	2,55 ^{a a}	2,55 ^{a a}
730 a 859		2,61 ^{a a}	2,59 ^{a a}	2,58 ^{a a}	2,57 ^{a a}	2,57 ^{a a}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 27 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

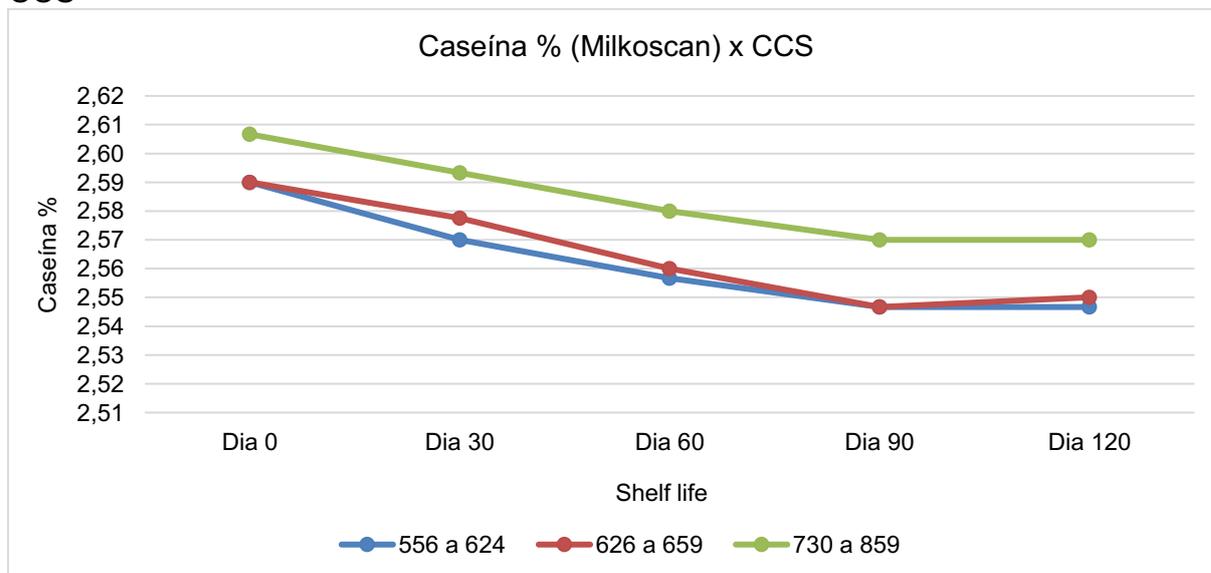


Tabela 24 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

PSI (x1.000 C/mL)	Caseína % – Milkoscan					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		2,59 ^{a a}	2,58 ^{a a}	2,56 ^{a a}	2,55 ^{a a}	2,55 ^{a a}
290 a 420		2,58 ^{a a}	2,57 ^{a a}	2,55 ^{a a}	2,54 ^{a a}	2,54 ^{a a}
450 a 670		2,62 ^{a a}	2,60 ^{a b}	2,58 ^{a b}	2,58 ^{a b}	2,53 ^{a c}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 28 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

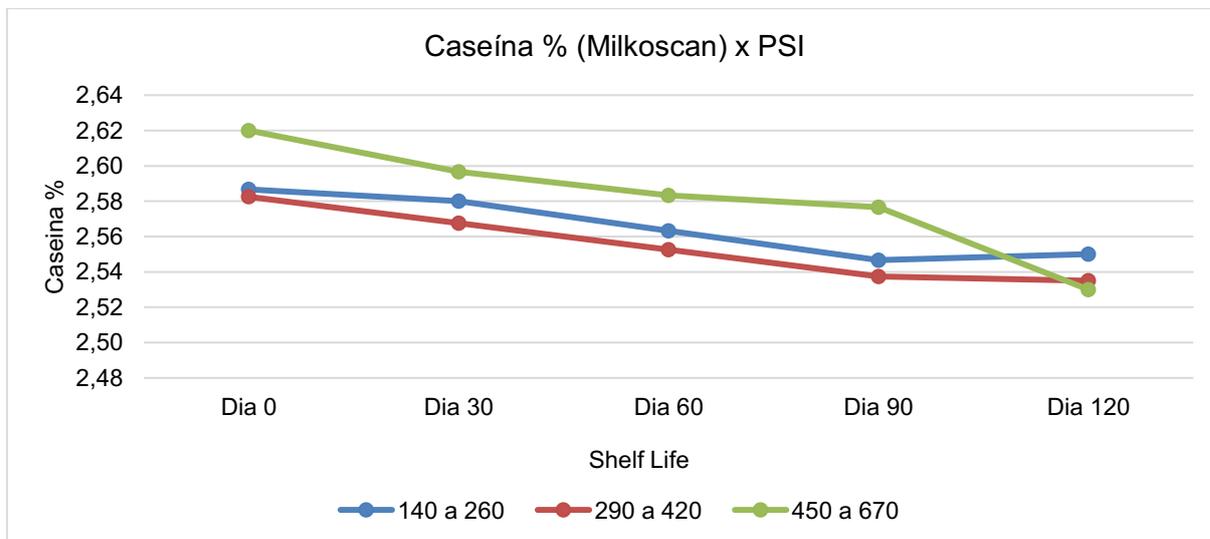


Tabela 25 – Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	Caseína % – Kjeldahl				
VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624	2,34 ^{a a}	2,53 ^{a a}	2,37 ^{a a}	2,35 ^{a a}	2,33 ^{a a}
626 a 659	2,32 ^{a a}	2,51 ^{a a}	2,38 ^{a a}	2,36 ^{a a}	2,23 ^{a b}
730 a 859	2,41 ^{a a}	2,40 ^{b a}	2,36 ^{a a}	2,27 ^{a b}	2,19 ^{a b}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 29 - Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

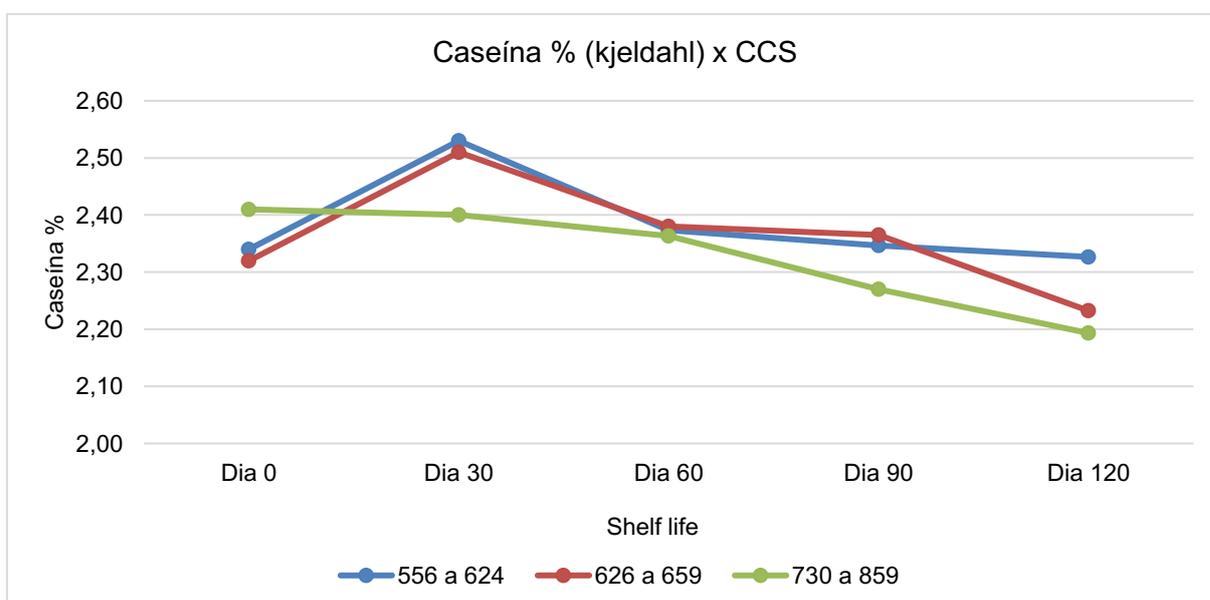


Figura 30 - Diferença significativa entre os grupos de CCS relacionada a variável caseína (Kjeldalh), representação do dia de estocagem 120.

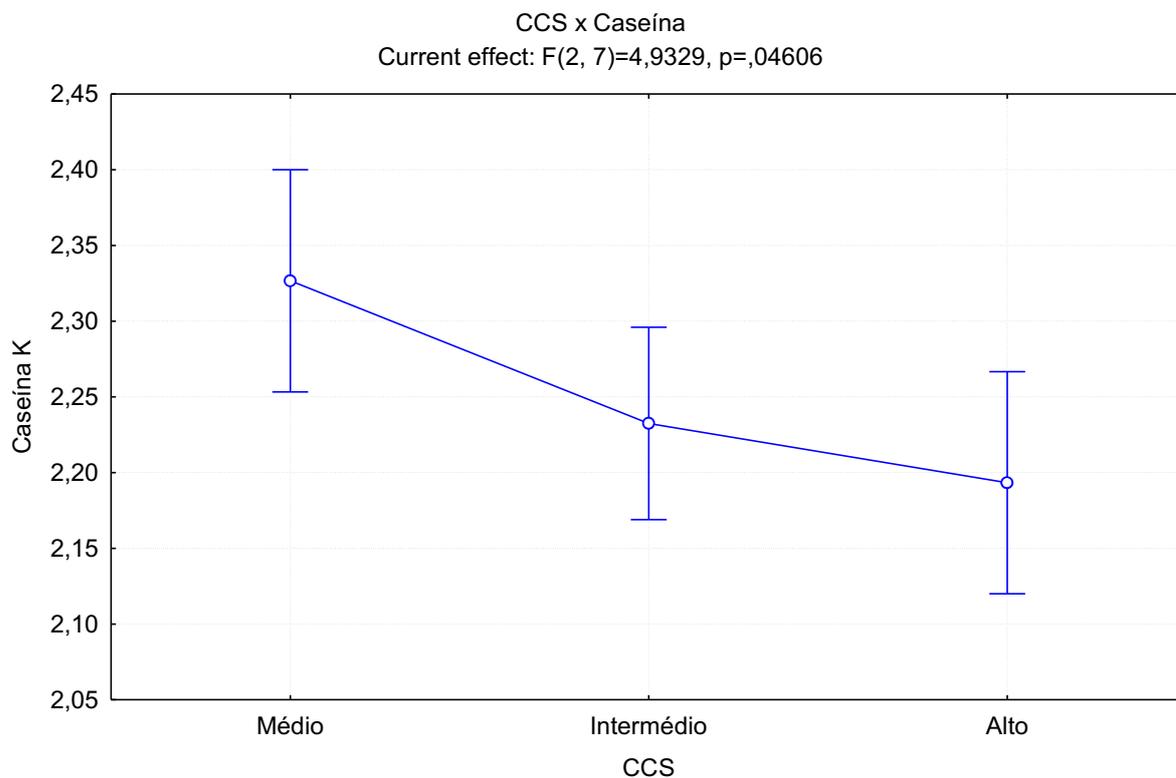
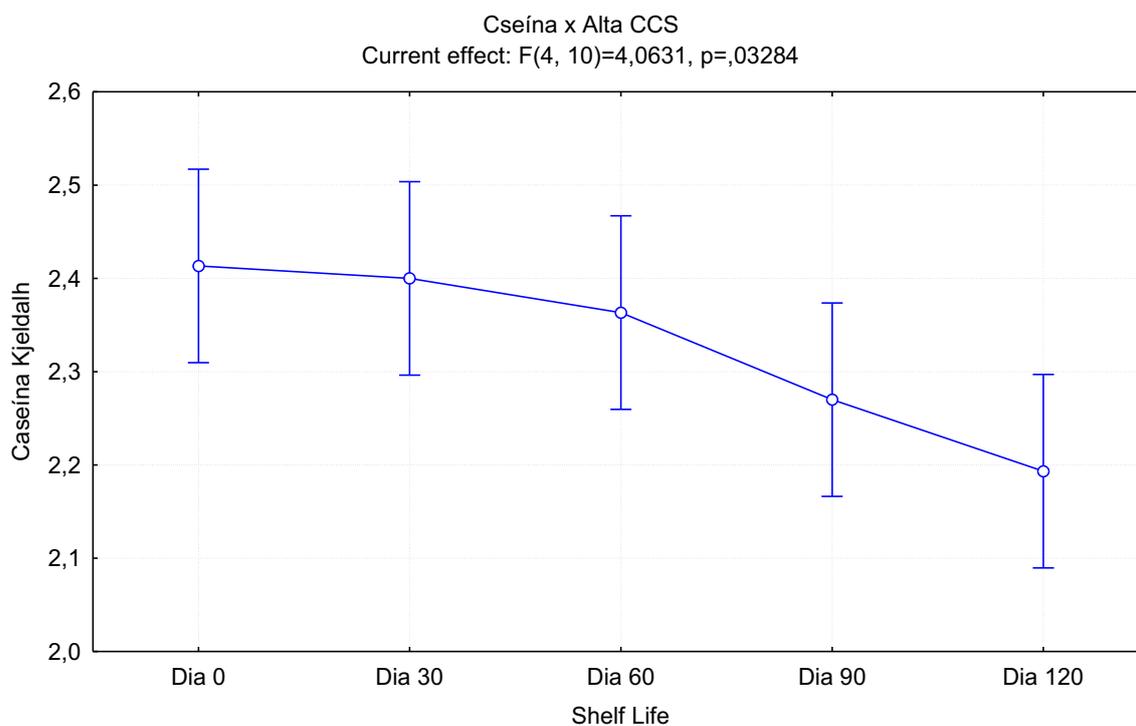


Figura 31 - Evolução da caseína no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS



Através da Figura 29, observa-se que no grupo de CCS alta, a queda na concentração de caseína no leite foi mais acentuada se comparado aos demais grupos, evidenciando influência da alta CCS na proteólise da caseína.

Talukder e Ahmed (2017) relatam que, o nível de plasmina no leite, que é uma das principais enzimas envolvidas na proteólise, é influenciado pelo equilíbrio ativador-inibidor e o leite de úberes com contagens de células somáticas elevada, potencializa a ativação da plasmina e a proteólise.

Em vacas com mastite, há um aumento da permeabilidade vascular nos alvéolos do úbere, aumentando o influxo de componentes de origem do sangue para o leite (p. ex., imunoglobulinas e soroalbumina bovina, neutrófilos e linfócitos) e concomitante proteases como a plasmina (AULDIST et al., 1996).

Tabela 26 - Resultados de caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Caseína % – Kjeldahl					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		2,31 ^{a a}	2,49 ^{a b}	2,39 ^{a a}	2,28 ^{a a}	2,28 ^{a a}
290 a 420		2,39 ^{a a}	2,49 ^{a b}	2,37 ^{a a}	2,35 ^{a a}	2,26 ^{a a}
450 a 670		2,37 ^{a a}	2,47 ^{a b}	2,37 ^{a a}	2,31 ^{a a}	2,19 ^{a c}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 32 – Evolução da caseína do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI

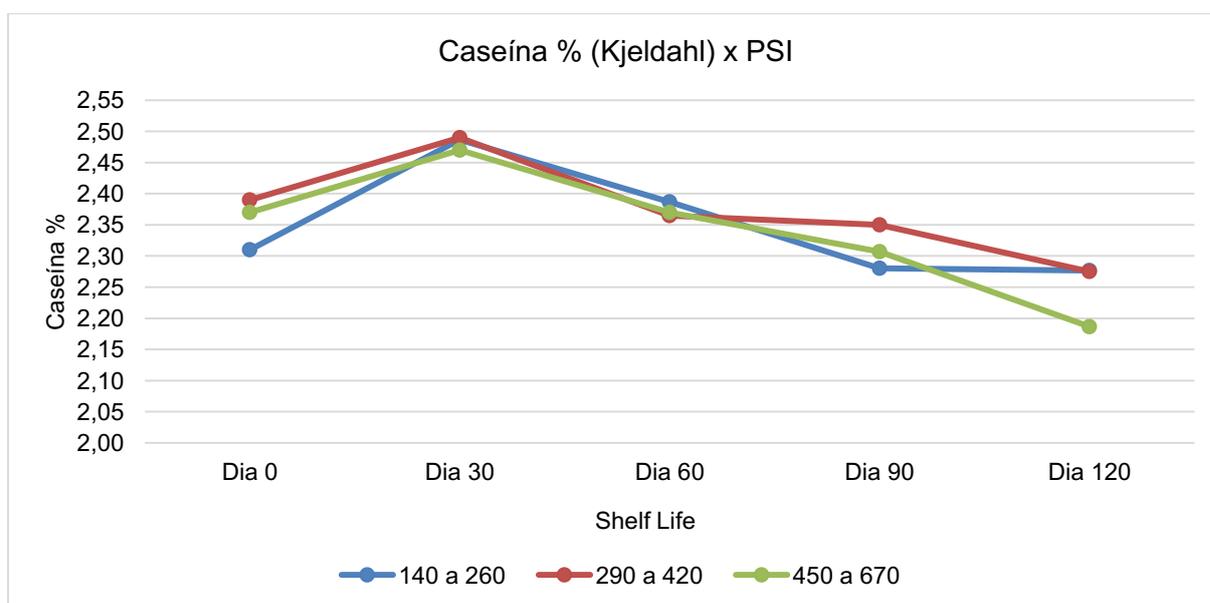
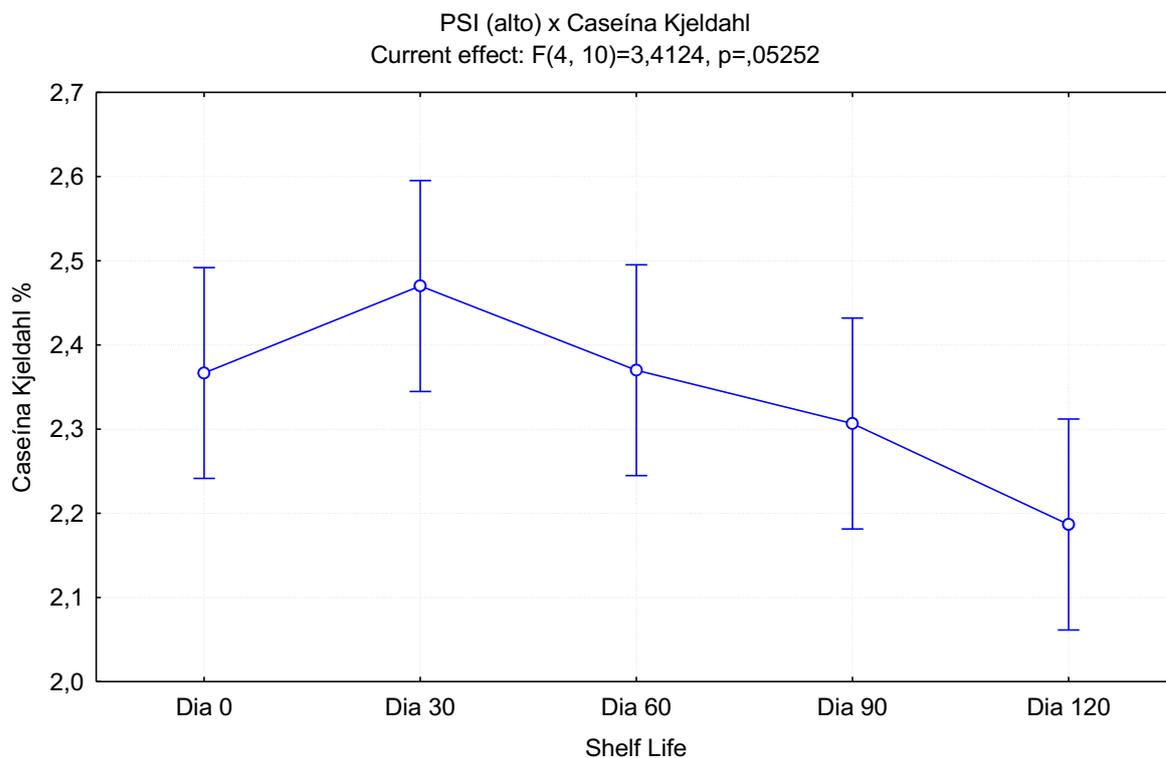


Figura 33 – Evolução da Caseína no decorrer do período de armazenamento, representação do grupo alta PSI.



Ainda avaliando a caseína do leite UHT frente aos resultados de PSI do leite cru, observa-se efeito linear de redução em função do tempo de armazenamento a partir do dia 30 de armazenamento.

As bactérias psicotróficas produzem proteases que, mesmo parcialmente desnaturadas, no processo UAT podem, através das remanescentes ou pela regeneração, atuar sobre as proteínas, gerando peptídeos de tamanhos variáveis, os quais podem se associar com minerais do leite (MELO JUNIOR, 2005).

Recio et al., (2000), citam em seus estudos que a gelificação causada pelas enzimas exógenas é geralmente atribuída à hidrólise de κ -caseína, produzindo "para- κ -caseína" e um subproduto semelhante a um "glicomacropéptido" de fase sérica.

Esta hidrólise de κ -caseína é acompanhada encontrado por alguma hidrólise das outras caseínas, em particular β -caseína, mas geralmente menos extenso do que a κ -caseína. A hidrólise da κ -caseína que se manifesta rapidamente em micelas de caseína muito instáveis (MACHADO et al., 2017b).

4.3.1.5 Índices de proteólise, métodos Kjeldahl e Stick c-GMP

Em se tratando da proteólise, avaliados pelo método de Kjeldahl e pelo teste Stick c-GMP, os resultados das médias dos grupos no decorrer do armazenamento encontram-se nas Tabelas 27 a 30 e ilustrados nas Figuras 34 a 41.

Em se tratando da CCS relacionada ao índice de proteólise (Kjeldahl), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, a CCS alta foi diferente nos dias 30, 90 e 120. Ao avaliar os resultados entre o mesmo grupo no decorrer dos dias de armazenamento, foi observada diferença significativa entre as análises nas diferentes datas nos três grupos avaliados, ou seja, houve crescente proteólise da caseína no decorrer da validade de todos os lotes avaliados, independente da classificação do nível de CCS.

Já em relação ao teste c-GMP, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos a CCS alta foi diferente no dia 90. Ao avaliar os resultados entre o mesmo grupo no decorrer dos dias de armazenamento, também foi observada diferença significativa entre as análises nas diferentes datas nos três grupos avaliados, ou seja, da mesma forma que no método Kjeldahl, observou-se crescente proteólise da caseína no decorrer da validade de todos os lotes avaliados, independente da classificação do nível de CCS.

Tabela 27 – Resultados de índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	Índice de Proteólise - Kjeldahl					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		0,74 ^{a a}	0,78 ^{a a}	0,72 ^{a b}	0,72 ^{a c}	0,70 ^{a d}
626 a 659		0,74 ^{a a}	0,78 ^{a b}	0,73 ^{a a}	0,72 ^{a a}	0,69 ^{a d}
730 a 859		0,76 ^{a a}	0,75 ^{b b}	0,72 ^{a a}	0,70 ^{b a}	0,67 ^{b d}

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna (grupo de CCS) e na linha, em vermelho (dias de armazenagem), não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância

Figura 34 – Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

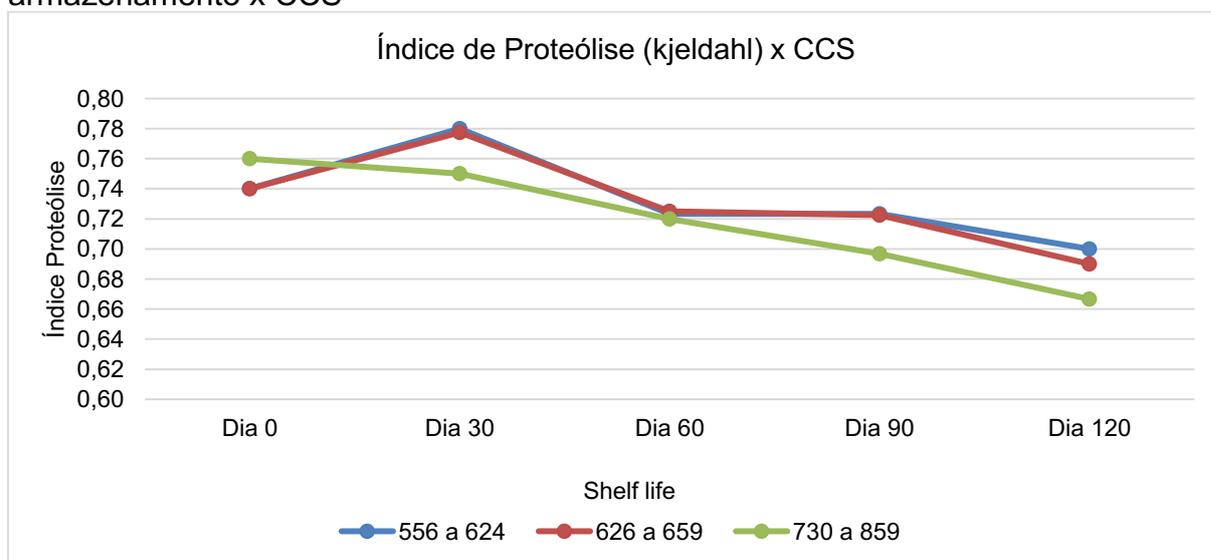


Figura 35 - Diferença significativa entre os grupos de CCS relacionada a variável índice de proteólise (Kjeldahl), representação do dia de estocagem 120

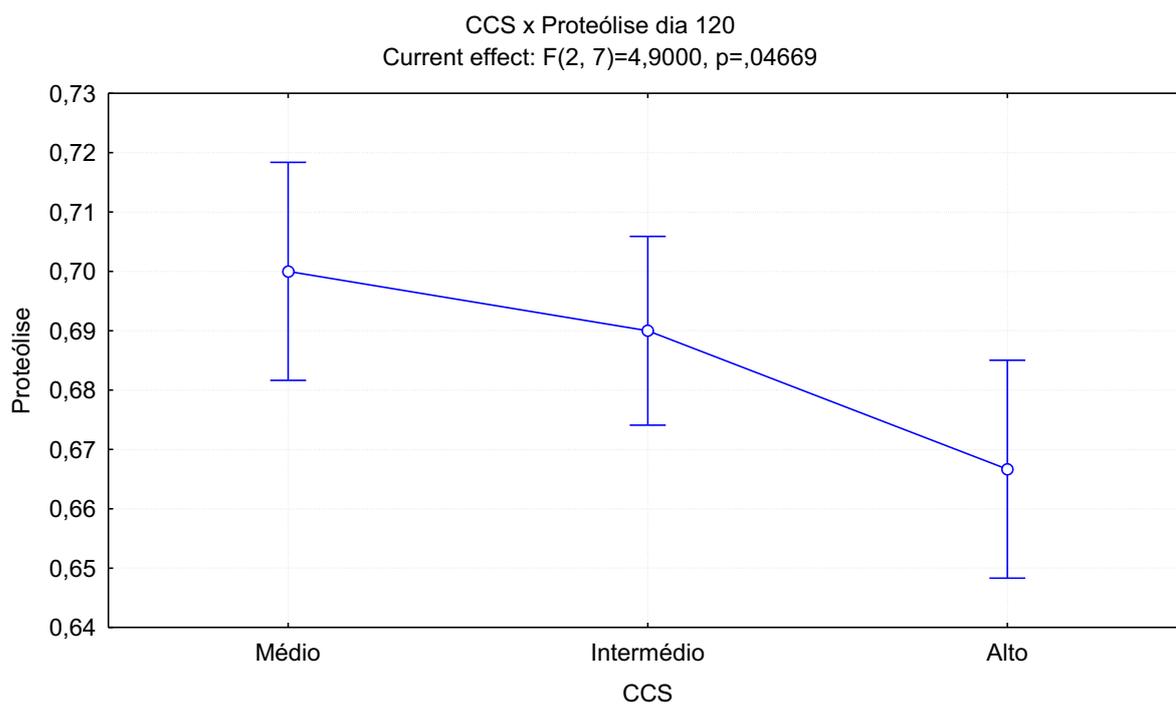


Figura 36 - Evolução da proteólise no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS

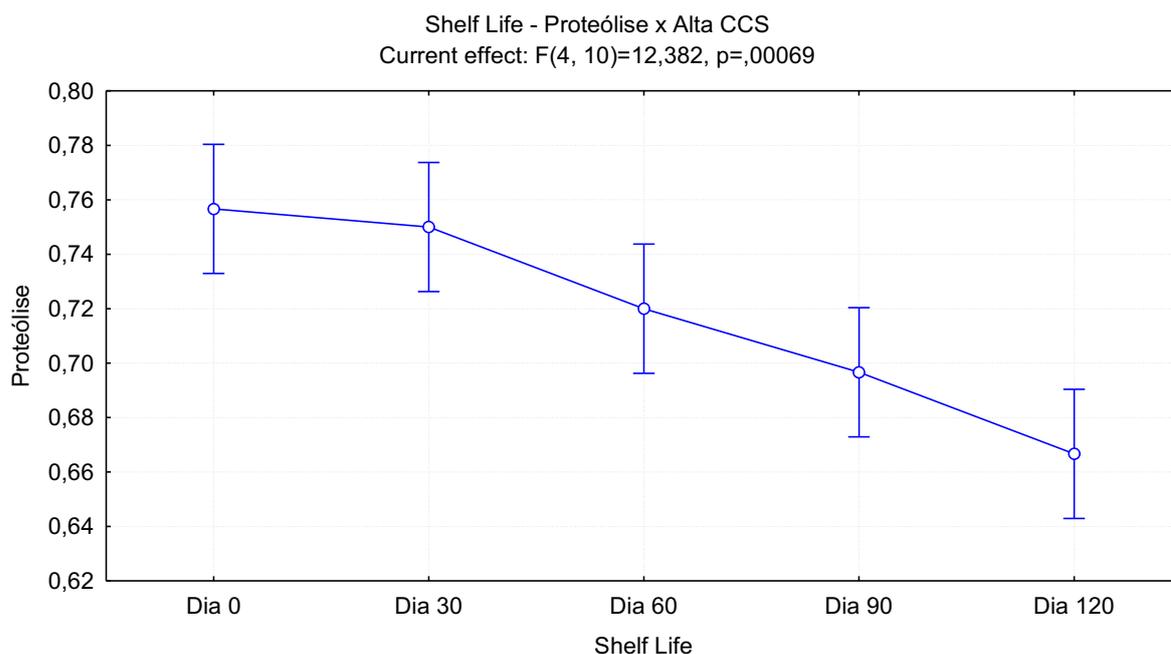
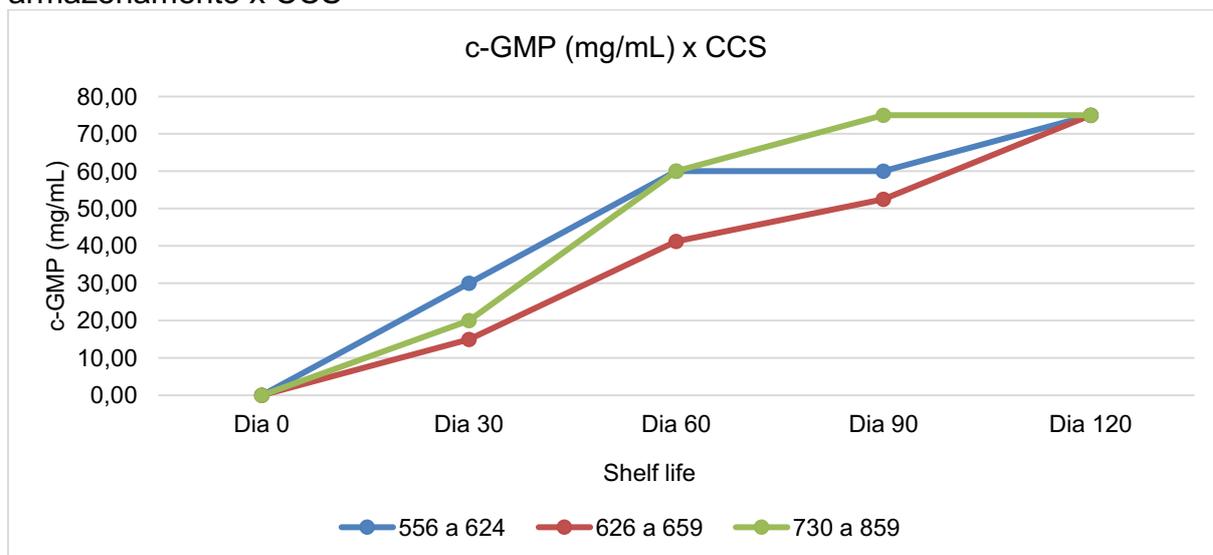


Tabela 28 - Resultados de índice de proteólise c-GMP do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS.

CCS (x1.000 C/mL)	c-GMP (mg/mL)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		0,00 ^{a a}	30 ^{a b}	60 ^{a c}	60 ^{a c}	75 ^{a d}
626 a 659		0,00 ^{a a}	15 ^{a b}	41 ^{a c}	53 ^{b d}	75 ^{a e}
730 a 859		0,00 ^{a a}	20 ^{a b}	60 ^{a c}	75 ^{b d}	75 ^{a d}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 37 – Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS



Os resultados referente a influência da CCS na proteólise no leite UHT deste estudo concordam com os dados reportados por Verdi et al., (1991), os quais sugerem atividade proteolítica associada à alta CCS, afirmaram que a proteólise do leite aumenta com o incremento da CCS, prejudicando a qualidade do produto ao longo da vida de prateleira. Fernandes (2007), constatou que este fato é também verdadeiro para o leite UHT, sobretudo no final de sua vida de prateleira.

Melo Junior (2005), relata a possibilidade de que o aumento da proteólise e da sedimentação ao longo do tempo de estocagem em leites com alta CCS, ser causada pelo rompimento das células somáticas durante o processamento UHT (no estágio de homogeneização do leite), liberando proteases das próprias células somáticas, bem como ativadores de plasminogênio.

Kelly e Folley (1997), investigaram a proteólise no produto preparado com leite cru integral com baixa e alta contagem de células somáticas e encontraram que altos níveis de proteólise em leites UHT com alta contagem de células somáticas estão associados à gelificação precoce, possivelmente por meio da atividade da plasmina associada à célula somática.

Hurley et al., (2000) afirma que, além da ativação do plasminogênio, os lisossomos das células somáticas contêm enzimas proteolíticas, dentre as quais a catepsina D, que pode produzir para- κ -caseína e caseínomacropeptídeo a partir da κ -caseína e, em altas concentrações, pode causar a coagulação do leite (Hurley et al., 2000).

Ao relacionar a proteólise do leite UHT com as faixas de PSI, no índice de proteólise (kjeldahl) não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. Já na avaliação dos resultados entre os mesmos grupos no decorrer dos dias de armazenamento, foi observada diferença significativa entre as análises nas diferentes datas nos grupos de PSI média e alta. Notou-se ainda crescente proteólise da caseína no decorrer da validade de todos os lotes avaliados, significativamente nos grupos médio e alto, embora mais acentuada no grupo de alta PSI.

Tabela 29 - Resultados de índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Índice de Proteólise - Kjeldahl				
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90

140 a 260	0,74 ^{a a}	0,75 ^{a a}	0,72 ^{a a}	0,72 ^{a a}	0,696 ^{a a}
290 a 420	0,75 ^{a a}	0,79 ^{a b}	0,73 ^{a ac}	0,72 ^{a ac}	0,692 ^{a c}
450 a 670	0,74 ^{a ab}	0,76 ^{a c}	0,72 ^{a ab}	0,70 ^{a ac}	0,666 ^{a c}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 38 - Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenagem x PSI

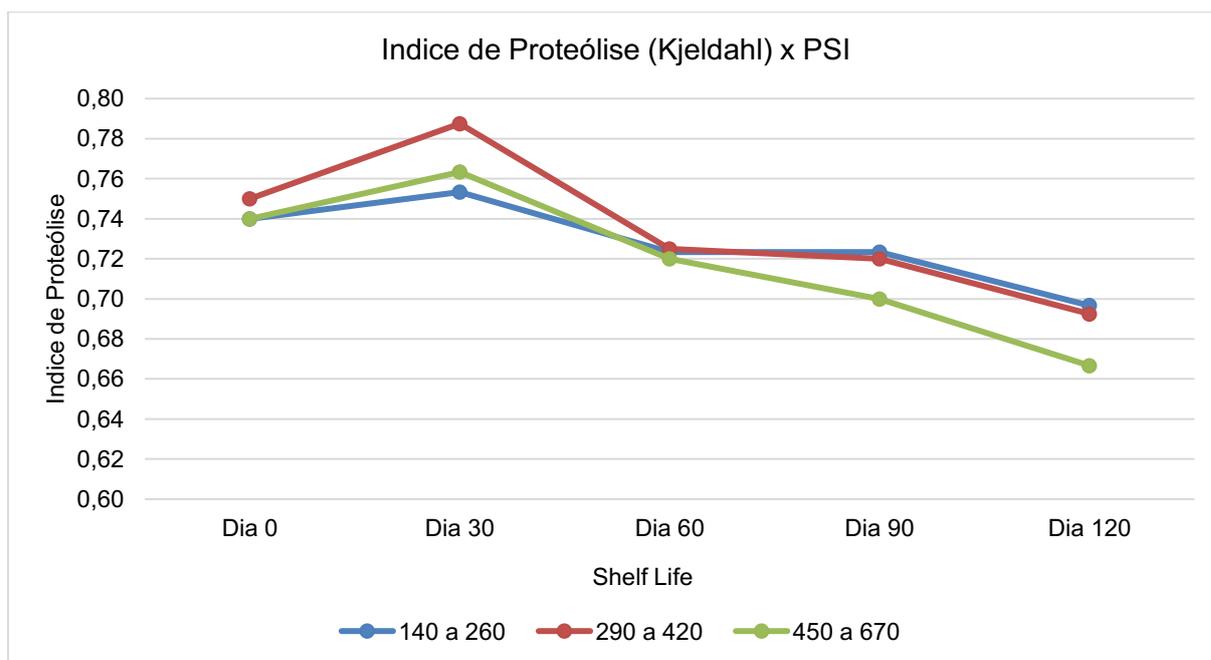
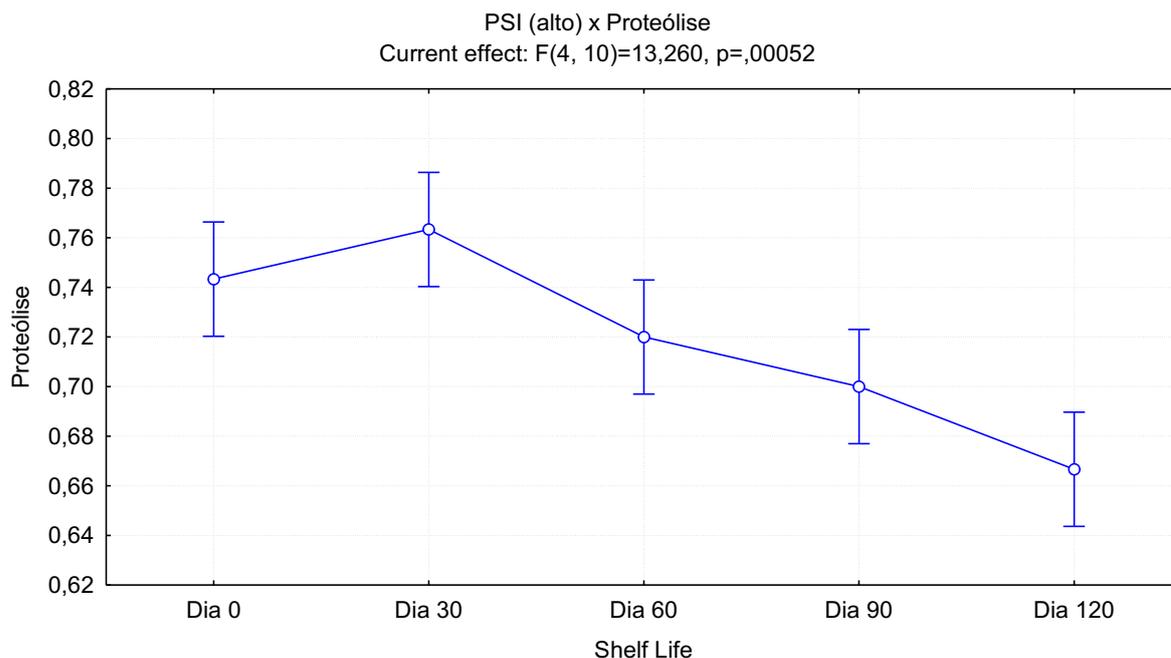


Figura 39 - Evolução da proteólise no decorrer do armazenagem para o grupo alta PSI



Já em relação a influência dos psicrotróficos do leite cru sobre a proteólise testada pelo c-GMP, foi observada diferença significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, relacionado a alta PSI, foi diferente nos dias 60 e 90. Ao avaliar os resultados entre o mesmo grupo no decorrer dos dias de armazenamento, também foi observada diferença significativa entre as análises nas diferentes datas nos três grupos avaliados, ou seja, da mesma forma que no método Kjeldalh, observou-se crescente proteólise da caseína no decorrer da validade de todos os lotes avaliados, independente da classificação do nível de PSI, contudo não foi significativo ($p < 0,05$) entre os dias 60 e 90 para o grupo baixo PSI e dias 90 e 120 dias para o grupo alta PSI. O grupo alta PSI atingiu o limite máximo de detecção do teste (75mg/mL) no dia 90 de armazenamento.

Tabela 30 - Resultados de índice de proteólise c-GMP do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	c-GMP (mg/mL)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		0,00 ^{a a}	10,00 ^{a a}	30,00 ^{a b}	45,0 ^{a c}	75 ^{a c}
290 a 420		0,00 ^{a a}	30,00 ^{a b}	63,75 ^{b c}	63,7 ^{b c}	75 ^{a d}
450 a 670		0,00 ^{a a}	20,00 ^{a a}	60,00 ^{b b}	75,0 ^{b b}	75 ^{a b}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 40 - Evolução do índice de proteólise do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

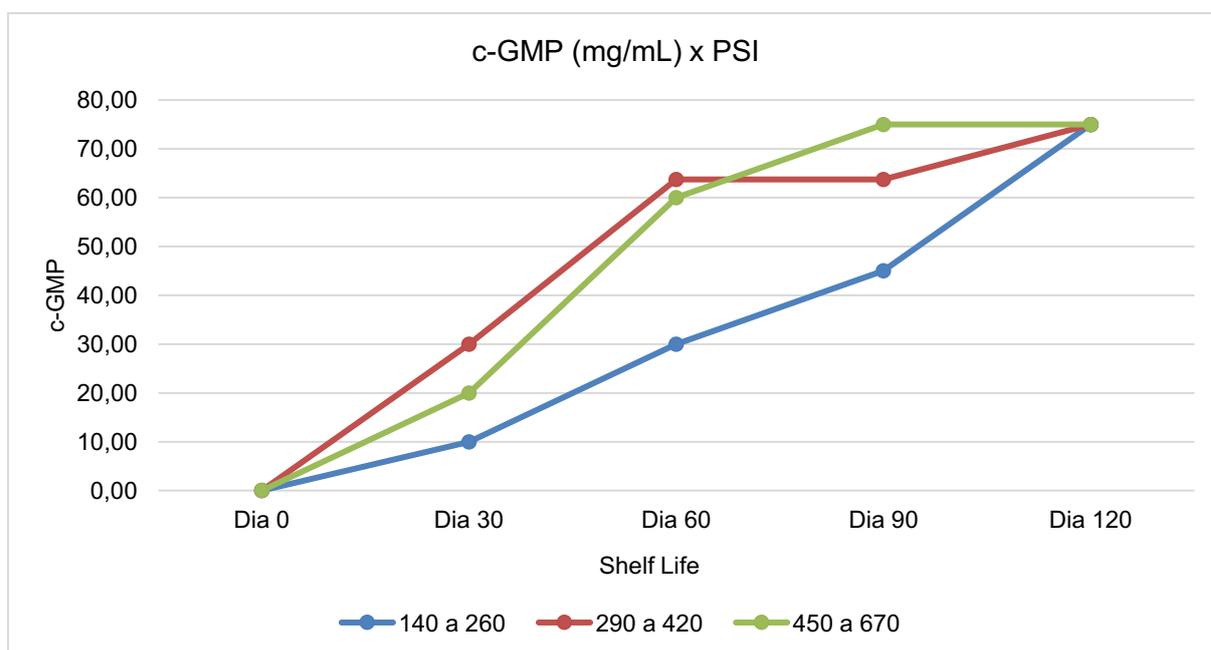
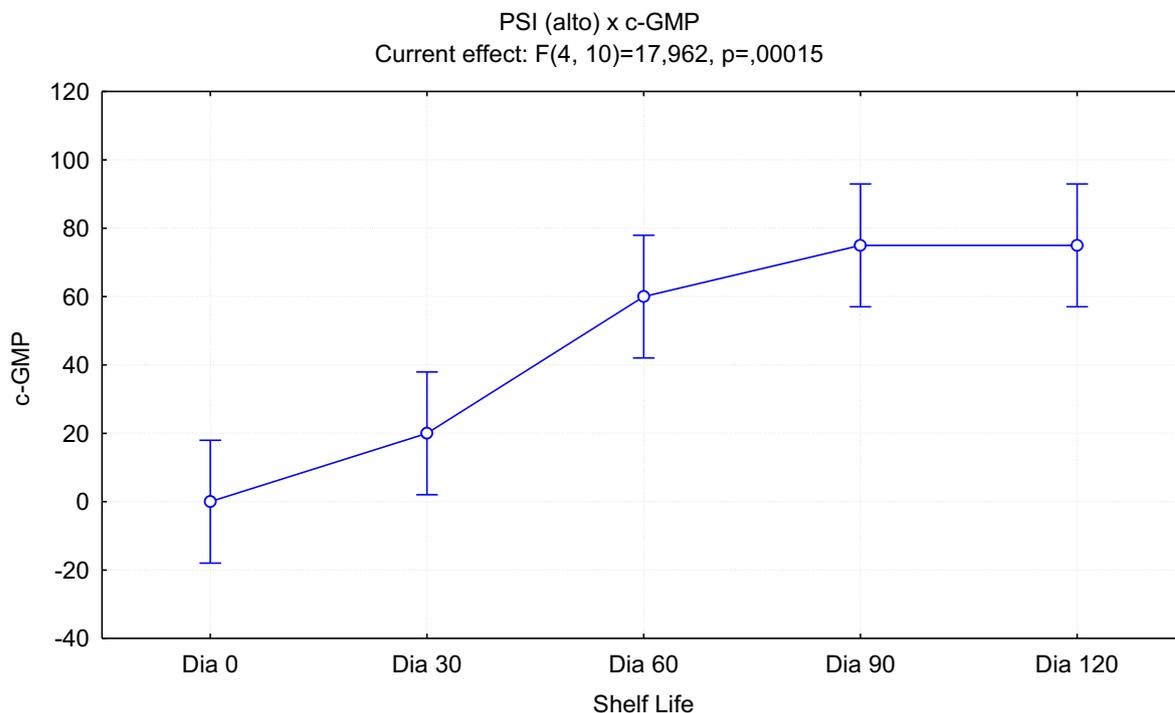


Figura 41 - Evolução da proteólise (c-GMP) no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI



As proteases bacterianas causa proteólise predominantemente a κ -caseína, levando à formação de material semelhante à para- κ -caseína, e, em um menor grau, α -caseína, proteínas de soro de leite e também a β -caseína (MALMGREN et al., 2017).

As outras partes da caseína, em particular a β -caseína, também foi relatado como sendo hidrolisada, mas não sempre na mesma taxa que a κ -caseína. Em um armazenamento mais longo, ocorre mais hidrólise formando peptídeos menores derivados de todas as partes das caseínas do leite (ZHANG et al., 2020).

Embora neste estudo tenhamos constatado proteólise, não observamos indícios de formação de gelificação, além de as alterações quanto a viscosidade terem sido discretas para os três grupos de psicrotróficos.

Nem todas as amostras de leite com altos níveis de bactérias psicrotróficas produzem proteinases suficientes para causar gelificação. Datta e Deeth (2003), em seus estudos, observaram que algumas amostras de leites cru com alta contagem de psicrotróficos, não apresentaram evidências de enzimas proteolíticas no leite UHT, enquanto outras amostras de leite armazenados em condições e contagens de psicrotrofos semelhantes, apresentavam altos níveis de enzimas proteolíticas.

Nem todas as enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicotróficas são suficientemente estáveis ao calor para sobreviver ao processamento UHT. A estabilidade ao calor depende da espécie, e alguns dos tratamentos térmicos de baixa temperatura e longo tempo são suficientes para desativar estas enzimas (ANEMA, 2019).

Como as bactérias psicotróficas produzem enzimas extracelulares no final da fase de crescimento exponencial, um leite de boa qualidade, que é pasteurizado logo após a coleta na fazenda, pasteurizado e /ou processado por UHT rapidamente, não terá problemas com gelificação por enzimas exógenas (STOECKEL et al., 2016a).

Além das alternativas de controle e mitigação da atividade enzimática por temperatura de processamento, a principal forma de controle são os investimentos na qualidade do leite em nível de fazenda, transporte e estocagem, referente a higiene de ordenha e equipamentos, refrigeração eficiente e menores tempos de estocagem até o processamento.

4.3.1.6 Sedimentação

Sobre as análises de sedimentação, avaliados pelo método de Silva (2003), os resultados das médias dos grupos de CCS e de PSI no decorrer do armazenamento encontram-se nas Tabela 31 e 32 e ilustrados nas Figuras 42, 43, 44 e 45.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos de CCS. O grupo alto apresentou-se diferente nos dias 30 e 60. Ao avaliar os resultados entre o mesmo grupo no decorrer dos dias de armazenamento, foram observadas diferenças significativas no grupo de CCS alta dias 0 e 30 e no grupo de média CCS nos dias 90 e 120. Não foi possível observar nenhuma tendência de sedimentação mais acentuada relacionada a algum grupo, ou seja, por base nos resultados deste estudo pode-se afirmar que os resultados de CCS não influenciaram na sedimentação.

Tabela 31 - Resultados de sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

CCS (x1.000 C/mL)	Sedimentação (gr)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
556 a 624		0,00 ^{a a}	0,00 ^{a a}	0,090 ^{a b}	0,365 ^{a c}	0,411 ^{a c}

626 a 659	0,00 ^{a a}	0,20 ^{b b}	0,210 ^{b b}	0,274 ^{a c}	0,321 ^{a c}
730 a 859	0,00 ^{a a}	0,00 ^{a a}	0,240 ^{b b}	0,330 ^{a c}	0,380 ^{a d}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de CCS) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenamento) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 42 - Evolução da sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x CCS

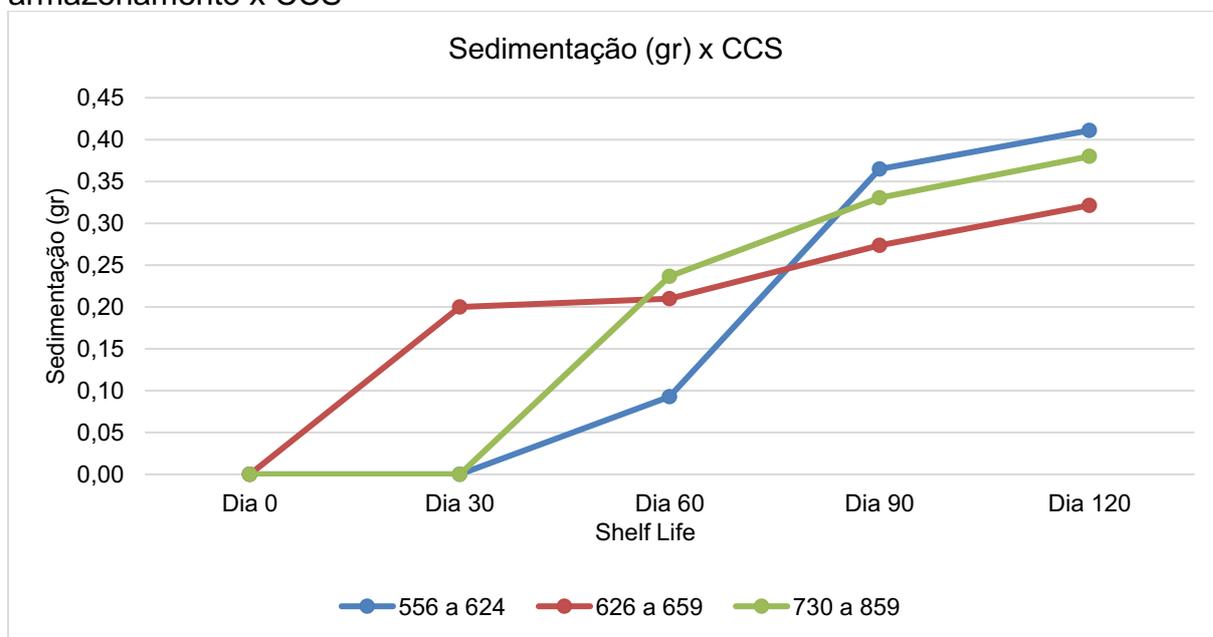
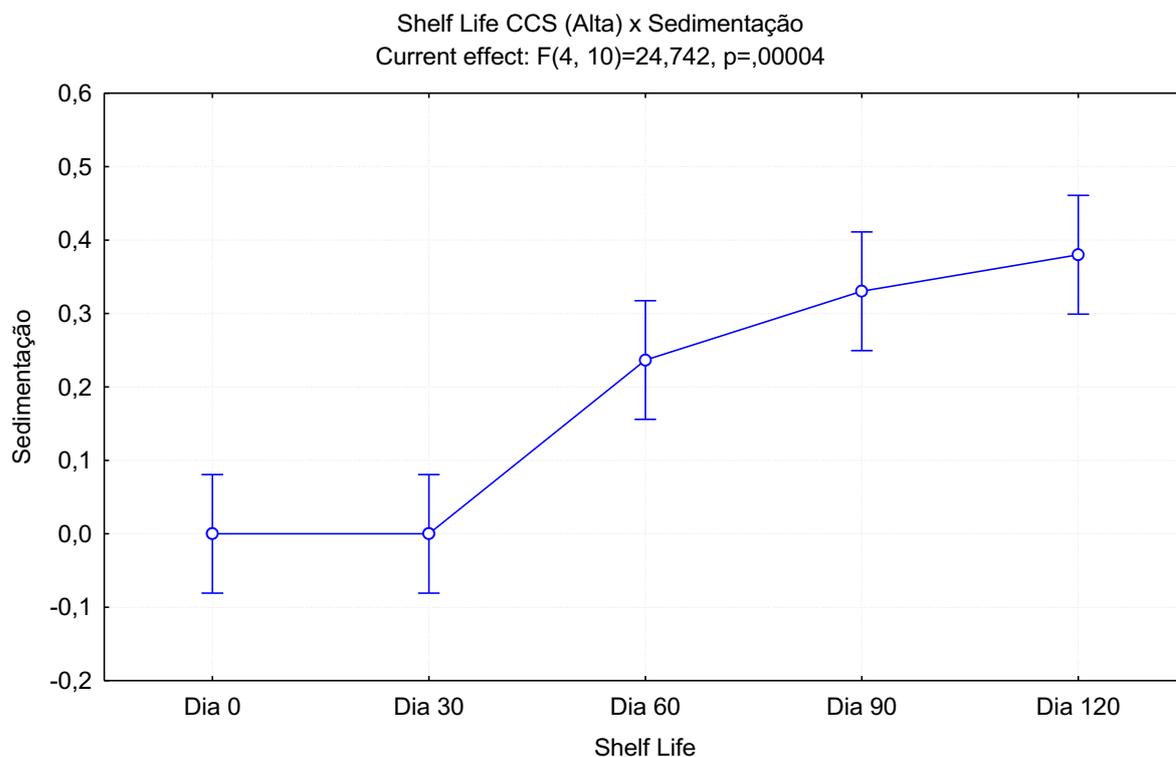


Figura 43 - Evolução da sedimentação no decorrer do armazenamento para o grupo alta CCS



Melo Júnior (2005), em um estudo semelhante, observou que não houve diferenças estatísticas para os níveis de contagens de células somáticas e a formação de sedimentos.

Da mesma forma, ao relacionar a sedimentação com os grupos de PSI, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos de baixa, média e alta PSI relacionado a sedimentação. Contudo, ao avaliar os resultados entre o mesmo grupo no decorrer dos dias de armazenamento, foi observada diferença significativa no grupo de PSI baixa, média e alta dias 90 e 120. Assim como observado para CCS, não foi possível observar nenhuma tendência de sedimentação mais acentuada relacionada a algum grupo, ou seja, por base nos resultados deste estudo pode-se afirmar que os índices de psicrotóxicos também não influenciaram na sedimentação.

Tabela 32 - Resultados de sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

PSI (x1.000 C/mL)	Sedimentação (gr)					
	VP	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
140 a 260		0,00 ^{a a}	0,00 ^{a a}	0,15 ^{a b}	0,412 ^{a c}	0,401 ^{a c}
290 a 420		0,00 ^{a a}	0,02 ^{a a}	0,05 ^{a a}	0,259 ^{a b}	0,332 ^{a c}
450 a 670		0,00 ^{a a}	0,00 ^{a a}	0,17 ^{a b}	0,314 ^{a c}	0,376 ^{a d}

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna (grupo de PSI) e na mesma linha, em vermelho (dias de armazenagem) não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Figura 44 - Evolução da sedimentação do leite UHT durante 120 dias de armazenamento x PSI.

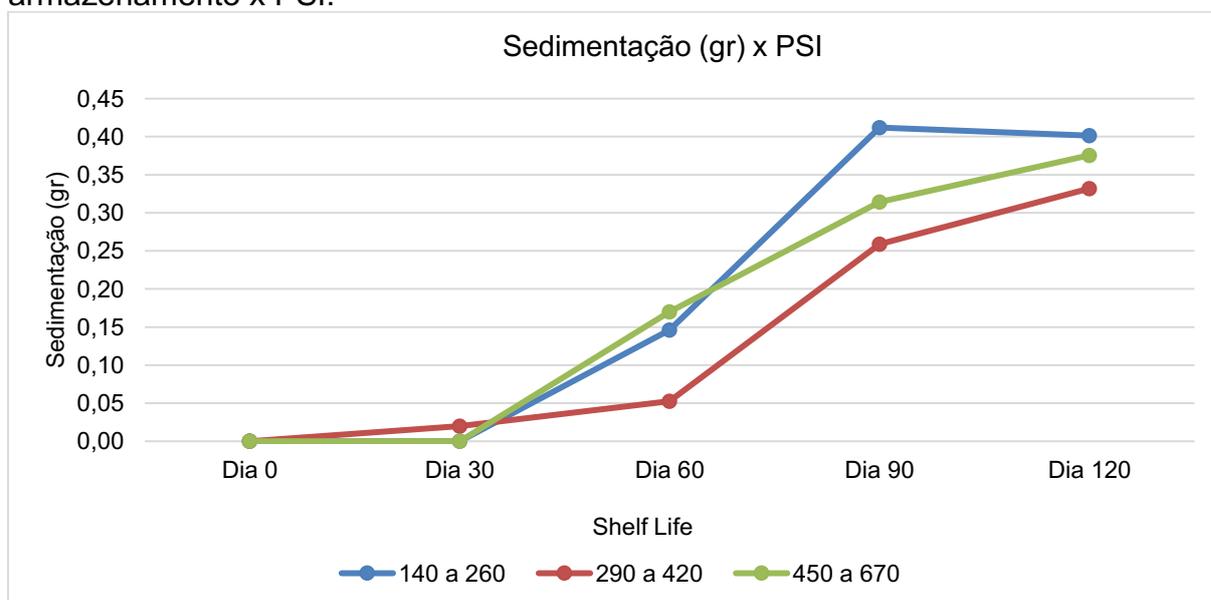
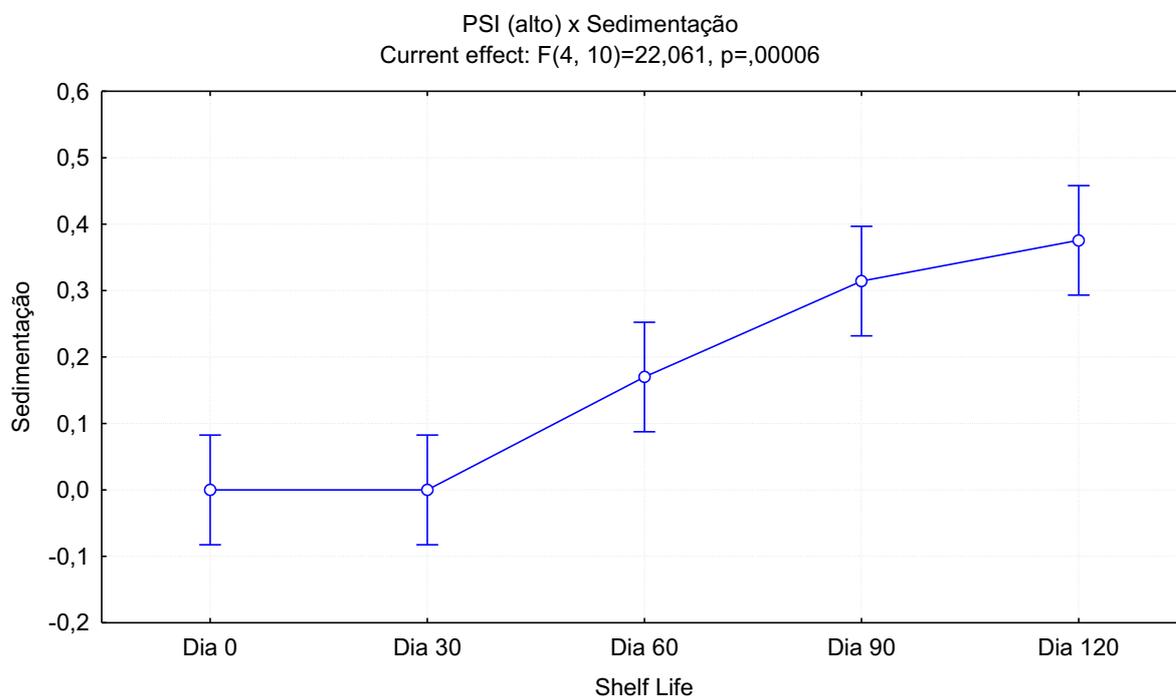


Figura 45 - Evolução da sedimentação no decorrer do armazenamento para o grupo alta PSI



A sedimentação é geralmente explicada como um fenômeno inevitável, que aumenta rapidamente depois do processamento térmico, pelo aumento do peso das micelas de caseína aquecidas e desnaturação das soro proteínas, que se depositam no fundo da embalagem de leite quando este é estocado (COSTA, 2014).

Os níveis de sedimentação aumentam com o tempo de armazenamento para ambos as formas de tratamento UHT, indireto e direto. De forma similar, o armazenamento de leite em temperaturas mais altas podem aumentar os níveis de sedimento (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

Melo Junior (2005) em seu estudo de correlação de psicrotróficos com sedimentação, citou que a qualidade microbiológica do leite cru influencia no aumento da sedimentação durante a estocagem, possivelmente devido à proteólise anterior ao tratamento térmico, embora tenha observado diferença estatística entre níveis de contagens de microrganismos psicrotróficos e a formação de sedimentos durante o tempo de estocagem.

Quando a sedimentação ocorre lentamente ao longo do tempo, o fenômeno geralmente pode ser considerado como o assentamento natural de partículas

coloidais do leite. Esse tipo de assentamento é natural, embora possa se manifestar como gelificação de idade quando as partículas sedimentadas se fundem para formar uma rede. Boa parte dos estudos sobre sedimentação são observacionais e não determinam a causa raiz da sedimentação acelerada (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

Os níveis de sedimentação aumentam com o tempo de armazenamento para ambos as formas de tratamento UHT, indireto e direto. De forma similar, o armazenamento de leite em temperaturas mais altas podem aumentar os níveis de sedimento (VESCONSI; VALDUGA; CICHOSKI, 2012).

Dagleish (2011) afirmou em seu estudo que micelas de caseínas no leite fluido irá sedimentar naturalmente com o tempo, concentrando-se na base da embalagem. No entanto, este processo é lento e improvável que seja um problema para amostras de leite UHT.

Em suma, observou-se neste estudo que no decorrer da vida de prateleira do leite UHT houve aumento da proteólise da caseína. Constatou-se ainda que a CCS influenciou nos índices de proteólise, ou seja, quanto maior a CCS, maior foi a proteólise no período final do tempo de armazenamento de 120 dias.

Desta forma, recomenda-se a produção de leite UHT a partir de leite cru com menores índices possíveis de CCS. Não menos importante, deve-se garantir as condições higiênico-sanitárias de obtenção, transporte, refrigeração e processamento, visando uma matéria-prima com baixa contagem de psicrotóxicos, visando evitar os possíveis efeitos da proteólise, garantindo um produto mais estável ao longo da vida de prateleira.

5 CONCLUSÕES

De acordo com as observações e os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- ✓ Não houve diferença nas características físico-químicas no leite cru e do leite pasteurizado relacionados aos três níveis de células somáticas ou de

microrganismos psicotróficos, exceto para estabilidade à prova do álcool, onde o grupo de CCS mais baixa apresentou maior estabilidade.

- ✓ Houve um decréscimo do pH ao longo da vida de prateleira do leite UHT, com maior intensidade nos grupos de alta CCS e de psicotróficos;
- ✓ Independentemente dos grupos de CCS ou dos psicotróficos, a viscosidade aparente no leite UHT aumentou durante o período de armazenamento, contudo, sem tendências quanto aos grupos de psicotróficos ou CCS.
- ✓ A CCS está relacionada à diminuição da caseína em relação à proteína verdadeira no leite UHT no decorrer do período de armazenamento.
- ✓ A proteólise aumentou consideravelmente no decorrer do período de armazenamento para todos os grupos de CCS e de psicotróficos, contudo mais pronunciado nos grupos altos.
- ✓ Houve gradual elevação nos valores de sedimentação das amostras de leite UHT integral ao longo da vida de prateleira, contudo não foi apontada influência da CCS ou dos psicotróficos;
- ✓ As contagens de células somáticas nas amostras de leite cru, bem como parte dos resultados de psicotróficos, apresentaram valores elevados, indicando que os aspectos higiênico-sanitário ainda deixam a desejar, programas de melhoria da qualidade devem ser efetivos nos trabalhos junto aos produtores de leite, com foco na importância da higiene de ordenha e da sanidade animal sobre a qualidade do leite e derivados, bem como as bonificar aos que alcançam os resultados esperados pela indústria.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Thamara Venâncio De. **Parâmetros De Qualidade Do Leite Cru Bovino : Contagem Bacteriana Total E Contagem De Células Somáticas**. 2013. Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, [S. l.], 2013. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/2013_Thamara_Venancio_Seminario1corrig.pdf.
- ANEMA, Skelte G. Age Gelation, Sedimentation, and Creaming in UHT Milk: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 140–166, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12407>
- AUGUSTO, Fernando; REZENDE, Marcela De. Soro de Leite e Suas Proteínas : Composição e Atividade Funcional Whey and its Proteins : Composition and Functional Activity. [S. l.], v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010. Disponível em: <https://revista.pgsskroton.com>.
- AULDIST, Martin J.; COATS, Stephen J.; SUTHERLAND, Brian J.; HARDHAM, John F.; MCDOWELL, Graham H.; ROGERS, Graeme L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 377–386, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022029900031903>
- BOCKELMANN, B.; BOCKELMANN, I. **Long Life Products: Heat-Treated, Aseptically Packed: A Guide to Quality**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/long-life-products-heat-treated-aseptically-packed-a-guide-to-quality/oclc/186275481?referer=di&ht=edition>.
- BRASIL. **Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A**. Brasília, 2018.
- BRASIL, Rafaella Belchior; NICOLAU, Edmar Soares; CABRAL, Jakeline Fernandes; SILVA, Marco Antônio Pereira Da. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo06_2015_2.pdf.
- BREMER, Maria G. E. G.; KEMMERS-VONCKEN, Anna E. M.; BOERS, Eduard A. M.; FRANKHUIZEN, Rob; HAASNOOT, Willem. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 294–302, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.008>
- BRITO, M. A. et Al. Estabilidade ao Alizarol. **EMBRAPA gado de leite**, [S. l.], v. 1, p. 1–8, 2009.

CHAVEZ, M. S.; NEGRI, L. M. TAVERNA M. A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, [S. l.], v. 71, p. 201–206, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000172>

COSTA, J. .. **ATRIBUTOS DE QUALIDADE ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE PROTEÓLISE EM LEITE CRU GRANELIZADO**. 2014. Universidade Federal de Juiz de Fora, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1863>.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 19–24, 2008. a. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000100003>.

DALGLEISH, Douglas G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>

DATTA, Nivedita; DEETH, Hilton C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 173–182, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00214-1)

DECRETO 10.468. **RIISPOA 2020**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/decreto-n-10.468-de-18-de-agosto-de-2020-272981604>.

DIAS, R. V. .. Principais métodos de controle e diagnósticos de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 23–27, 2007. DOI: 10.21708/avb.2007.1.1.255. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br>.

DOMARESKI, Luiz Jackson; SIMÕES, Bandiera Nataly; TAMOSTU, Sato Rafael; CASALE, Aragon-Alegro Lina; WALTER DE, Santana Elsa Helena. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 261–269, 2010. Disponível em: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222010000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=pt.

DRAHLER, Dominik F.; MEDCALF, Robert L. The Fibrinolytic System—More Than Fibrinolysis? **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 102–109, 2015. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.09.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.09.006>.

ELLIOTT, Anthony J.; DATTA, Nivedita; AMENU, Boka; DEETH, Hilton C. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. **Journal of Dairy Research**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 442–446, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1017/S002202990500138X>.

FERNANDES, Andreza Maria. **Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto**. 2007. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, [S. l.], 2007. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/USP_c6353117c86a996776b6dd18b2b49a73.

FILHO, João R. De Freitas; FREITAS, Wandemberg Rocha; LIMA, Silva; SILVAN, Mábio. AVALIAÇÃO DO TEOR DE CASEÍNA E ALBUMINA NO LEITE DE VACAS DA RAÇA GIROLANDA EVALUATION OF CASEIN AND ALBUMIN LEVELS IN THE MILK OF GIROLANDA COW. [S. l.], p. 42–48, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3895/S1981-36862009000100004>

FONSECA, L. F. L; SANTOS, M. Qualidade do leite e controle de mastite. **EMBRAPA Gado de Leite. Documentos, 92**, São Paulo, p. 175, 2001.

FONSECA, LUIS FERNANDO L ; SANTOS, Marcos Veiga Dos. Estratégias para melhoria da qualidade microbiológica do leite e redução da contagem de células somáticas. **EMBRAPA Gado de Leite. Documentos, 92**, [S. l.], v. 1, p. 17–33, 2003.

FORTUNA, L. A. .. **Estudo da Estabilidade da Micela de Caseína Em Leite Estável e Instável não Ácido**. 2015. Universidade de Caxias do Sul, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/handle/11338/969>.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects. Part 1. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 500–516, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.013>

FUKUDA, SANDRA PEREIRA. ROIG, SALVADOR MASSAGUER. PRATA, Luiz Francisco. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties. **Journal of food protection**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 2162–2169, 2009. DOI: 10.1051/lait. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/34986?locale-attribute=en>.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite**. 2003. Universidade Estadual de Campinas, [S. l.], 2003.

FURTADO, Marco Antônio Moreira. Fraudes em leite de consumo. **I Simpósio de Qualidade do Leite e Derivados**, [S. l.], v. 1, p. 7, 2010. Disponível em: <http://r1.ufrrj.br/simleite/Marco Furtado.pdf>.

GAUCHER, Isabelle; MOLLÉ, Daniel; GAGNAIRE, Valérie; GAUCHERON, Frédéric. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 130–143, 2008.. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.04.007>.

GAUR, Vikas; SCHALK, Jos; ANEMA, Skelte G. Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 78, p. 92–102, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.003>.

HADRICH, J. C.; WOLF, C. A.; LOMBARD, J.; DOLAK, T. M. Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. 3588–3596, 2018.. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13840>.

HARYANI, Sri; DATTA, Nivedita; ELLIOTT, Anthony J.; DEETH, Hilton C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 15–20, 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/43444880%0AProduction>.

HERNANDEZ, Carmen; MUÑOZ, Marta; DAURY, Cedric; WEYMUTH, Hans; KEMMERS-VONCKENONCKEN, Anna E. M.; CORBATÓN, Vicente; TORIBIO, Tomás; BREMER, Maria G. E. G. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 205–208, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.016>.

HURLEY, M; LARSEN, L.; KELLY, A; MCSWEENEY, P. L. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 673–681, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00100-X).

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 707–715, 2006. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.018>

KELLY, Alan L.; FOLEY, John. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 7, n. 6–7, p. 411–420, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00038-1).

LANGONI, Helio. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 620–626, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000500012>

LASMAR, M. M.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M.; COUTO, C. N. B.; FERREIRA, J. M. Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol® through high performance liquid chromatography. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.],

v. 63, n. 6, p. 1553–1558, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600037>

LIMA, Renan Silva. Proteólise. **MilkPoint**, [S. l.], v. 1, p. 2–5, 2012. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/proteolise-parte-1-204786n.aspx>.

LOBATO, P. R. et al. Índice de CMP em leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais, Brasil, durante os anos de 2011 a 2017. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 641–646, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10735>.

MACHADO, Sandro Charopen; FISCHER, Vivian; STUMPF, Marcelo Tempel; STIVANIN, Sheila Cristina Bosco. Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 340–347, 2017. a. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000400010>.

MACHADO, Solimar G.; BAGLINIÈRE, François; MARCHAND, Sophie; VAN COILLIE, Els; VANETTI, Maria C. D.; DE BLOCK, Jan; HEYNDRIKX, Marc. The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. MAR, p. 1–22, 2017. b. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>.

MAGALHÃES, Mirella Araújo. **Determinação De Fraude De Leite Com Soro De Leite Pela Análise De Cmp E Pseudo-Cmp Por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Em Fase Reversa Com Detecção Por Espectrometria De Massa**. 2008. Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 2008. Disponível em: <https://locus.ufv.br//handle/123456789/2852>.

MALMGREN, Bozena; ARDÖ, Ylva; LANGTON, Maud; ALTSKÄR, Annika; BREMER, Maria G. E. G.; DEJMEK, Petr; PAULSSON, Marie. Changes in proteins, physical stability and structure in directly heated UHT milk during storage at different temperatures. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 71, p. 60–75, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.03.002>.

MAPA. **Instrução Normativa (IN) nº 68 de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, 2006.

MARÉCHAL, Caroline Le; THIÉRY, Richard; VAUTOR, Eric; LOIR, Yves Le. **Mastitis Impact on Technological Properties of Milk and Quality of Milk Products — A Review** Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products — a review. [S. l.], n. May, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0009-6>

MARQUES, Lúcia Treptow; FISCHER, Vivian; ZANELA, Maira Balbinotti; RIBEIRO, Maria Edi Rocha; STUMPF JUNIOR, Waldyr; RODRIGUES, Caroline Moreira. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000500021>.

MATTIELLO, C. A.; SILVEIRA, S. M.; CARLI, F.; CUNHA JÚNIOR, A.; ALESSIO, D. R. M.; PELIZZA, A.; CARDOZO, L. ...; THALER NETO, A. Rendimento industrial, eficiência de fabricação e características físico-químicas de queijo colonial produzido de leite com dois níveis de células somáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 1916–1924, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9908>.

MELO JUNIOR, Airton Soares. **INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS NA GELIFICAÇÃO E SEDIMENTAÇÃO DO LEITE UAT**. 2005. Universidade Federal de Lavras, [S. l.], 2005.

MONTANHINI, Maziero Tais Maíke. Bactérias psicrotróficas e defeitos tecnológicos em produtos lácteos. **MilkPoint**, [S. l.], v. 1, p. 1–4, 2016. Disponível em: www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/defeitos-tecnologicos-em-produtos-lacteos-causados-por-bacterias-psicrotroficas-1016.

MOTTA, T.M.C.; HOFF, R.B.; BARRETO, F. et Al. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, [S. l.], v. 120, p. 498–505, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.093>.

MULLER, Ernst Ekehardt. QUALIDADE DO LEITE, CÉLULAS SOMÁTICAS E PREVENÇÃO DA MASTITE. **Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, [S. l.], v. 2, p. 206–220, 2002. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>.

MURPHY, Steven C.; MARTIN, Nicole H.; BARBANO, David M.; WIEDMANN, Martin. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>.

NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, [S. l.], v. 16, p. 1679–7353, 2011.

NEVES, L. N. ... **DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE TRATAMENTO TÉRMICO EM LEITE UHT**. 2015. a Universidade Federal de Juiz de Fora, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/1445>.

NÖRNBERG, MARIA F. B. L.; FRIEDRICH, ROSANE S. C.; WEISS, RITA D. N.; TONDO, EDUARDO C.; BRANDELLI, ADRIANO. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 41–46, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00542.x>.

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; MACHADO, Solimar Gonçalves; CARDOSO, Rodrigo Rezende; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Sedimentação, atividade proteolítica e proteólise de leite UHT integral durante o armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 197–205, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v71i4.484>.

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; MARTINS, Maurílio Lopes; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 645–651, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300025>.

RECIO, Isidra; GARCÍA-RISCO, Mónica R.; LÓPEZ-FANDIÑO, Rosina; OLANO, Agustín; RAMOS, Mercedes. Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 10, n. 5–6, p. 333–338, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00076-5).

RIISPOA. DECRETO-Nº-9.013-DE-29-DE-MARÇO-DE-2017 - RIISPOA. *In*: 2. ed. Brasília. p. 108.

ROCHA, GIULIANA LARA. **Influência Do Tratamento Térmico No Valor Nutricional Do Leite Fluido**. 2004. Universidade Católica de Goiás, [S. l.], 2004. Disponível em: <http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/8930/material/TCC-Giulianna - INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NO VALOR NUTRICIONAL DO LEITE FLUIDO.pdf>.

SANTOS, MARCOS VEIGA DOS; FONSECA, Luís Fernando Laranja Da. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1. ed. Barueri. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001596491>.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos em leite cru coletado na macroregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 10, 2009.

SANTOS, M. C. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R. Desenvolvimento de um modelo preditivo para identificação de perda de estabilidade e ocorrência de proteólise em leite UAT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 247–253, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9256>.

SANTOS, M.; FONSECA, Luis Fernando Laranja Da. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Hig. aliment**, [S. l.], n. November, p. 13–9, 2001.

SANVIDO, G. V. Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira. **Ciência dos Alimentos**, [S. l.], v. 1, p. 78, 2007. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/255183/1/Sanvido_GustavoBraga_M.pdf.

SILVA, P. H. F. DA ; ABREU, LUIZ RONALDO DE ; BRITO, JOSÉ RENALDI FEITOSA ; FURTADO, Marco; SILVA, P. H. F. DA ; ABREU, LUIZ RONALDO DE ; BRITO, JOSÉ RENALDI FEITOSA ; FURTADO, Antônio Moreira. Influência da Qualidade do Leite no Processamento UHT. **Revista do e sazonais na composição salina do leite. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S. l.], v. 59, p. 24–31, 2007. Disponível em: <https://r1.ufrj.br/simleite/PauloHenrique.pdf>.

SILVA, H. P. F. **Leite Uht: Fatores Determinantes Para Sedimentação e gelificação**. 2003. Universidade Federal de Lavras - MG; Brasil, [S. l.], 2003. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/36225>.

SILVA JÚNIOR, J. G. Eletroforese de proteínas: aspectos de composição e propriedades. *In*: ESCOLA, Química Nova na (org.). **Interciência**. 6. ed. Rio de Janeiro. p. 125.

SILVA, Livia Cavalete Corrêa. **Defeitos no leite UHT e suas causas**. 2014. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/defeitos-no-leite-ugt-e-suas-causas-91757n.aspx>.

SILVA, Livia Cavaletti Corrêa; BELOTI, Vanerli; TAMANINI, Ronaldo; YAMADA, Alberto Koji; GIOMBELLI, Cristiane Jaci; SILVA, Márcia Rocha. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78% em leite bovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S. l.], v. 67, n. 384, p. 55–60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120008>.

SILVA, Renato Roberto. **Perfil produtivo e qualidade e qualidade do leite em níveis de CBT e CCS em Dores do Indaiá - MG**. 2017. Centro Universitário de Patos de Minas, [S. l.], 2017.

SOUZA, Cleusely Matias. **Validação e comparação de metodologias analíticas empregadas na determinação de cmp em leite**. 2007. Universidade Federal de Goiás, [S. l.], 2007. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Tese2007_Cleuzely_Matias.pdf.

STOECKEL, Marina et al. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual

heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 59, p. 20–28, 2016. a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.045>.

STOECKEL, Marina; LIDOLT, Melanie; STRESSLER, Timo; FISCHER, Lutz; WENNING, Mareike; HINRICHS, Jörg. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 61, p. 250–261, 2016. b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.009>.

TALUKDER, Mukta; AHMED, HM Manir. Effect of somatic cell count on dairy products: a review. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3329/ajmbr.v3i1.32030>.

TETRA PACK. **Tratamento UHT para alimentos e laticínios**. 2020. Disponível em: <https://www.tetrapak.com/pt-br/solutions/processing/main-technology-area/uht-treatment>.

VALSECHI, Octávio Antônio. **O leite e seus produtos**. 2001. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, [S. l.], 2001. Disponível em: [http://www.cca.ufscar.br/~vico/O LEITE E SEUS DERIVADOS.pdf](http://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf).

VERDI, Robert J.; BARBANO, David M. Properties of Proteases from Milk Somatic Cells and Blood Leukocytes. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 74, n. 7, p. 2077–2081, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78379-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78379-3).

VESCONSI, Cintia Neuwald; VALDUGA, Alice Teresa; CICHOSKI, Alexandre José. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 730–736, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000400026>.

VIDAL-MARTINS, Ana Maria C.; SALOTTI, Bruna M.; ROSSI JUNIOR, Oswaldo D.; PENNA, Ana Lúcia B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 698–704, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400012>.

VIDAL, Ana Maria Centola; SARAN NETTO, Arlindo. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/9788566404173>.

ZHANG, Chunyue; BIJL, Etske; HETTINGA, Kasper. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 263, p. 127–134, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.128>.

ZHANG, Chunyue; BIJL, Etske; MUIS, Karinska Eunike; HETTINGA, Kasper. Stability of fat globules in UHT milk during proteolysis by the AprX protease from *Pseudomonas fluorescens* and by plasmin. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 103, n. 1, p. 179–190, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17150>.

Anexo I – Resultados Individualizados das amostras de leite cru

Análises Físico-químicas, CCS e UFC do leite cru (total 10 amostras)

N° Amostra	Data coleta	Silo	Lote	CCS leite cru	CCS Past.	UFC Me-sófilos	UFC PSI	Álcool °GL	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade g/L	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	cGM P (mg / mL)
1	02/04/21	8	3557	695.000	394.000	220.000	370.000	80	6,74	-0,536	0,15	1032,2	3,4	2,58	4,42	3,70	12,64	0
2	03/05/21	3	3615	556.000	333.000	670.000	420.000	82	6,73	-0,541	0,14	1031,7	3,3	2,54	4,38	3,70	11,88	0
3	10/05/21	8	3689	730.000	433.000	170.000	260.000	80	6,69	-0,540	0,15	1031	3,3	2,48	4,38	3,56	12,29	0
4	11/05/21	3	3702	626.000	467.000	510.000	450.000	80	6,75	-0,545	0,14	1030,6	3,30	2,52	4,38	3,59	12,40	0
5	12/05/21	6	3714	624.000	401.000	220.000	290.000	82	6,71	-0,547	0,14	1031,6	3,32	2,54	4,43	3,81	12,50	0
6	13/05/21	8	3723	656.000	443.000	73.000	140.000	81	6,80	-0,536	0,15	1032,1	3,35	2,53	4,41	3,65	11,90	0
7	16/05/21	5	3749	561.000	371.000	120.000	260.000	82	6,72	-0,546	0,14	1031,5	3,33	2,52	4,41	3,92	12,39	0
8	17/05/21	4	3761	732.000	385.000	210.000	670.000	80	6,75	-0,548	0,15	1031,4	3,34	2,54	4,38	3,90	12,36	0
9	18/05/21	6	3774	688.000	424.000	100.000	420.000	79	6,72	-0,539	0,15	1032,0	3,31	2,52	4,39	3,55	12,50	0
10	19/05/21	8	3375	859.000	449.000	380.000	580.000	80	6,68	-0,536	0,15	1032,2	3,35	2,54	4,39	3,55	12,45	0

Anexo II – Resultados Individualizados das amostras de Leite Pasteurizado

Análises do Leite Pasteurizado / Padronizado para UHT (total 10 amostras)

N° Amostra	Data coleta	Silo	Lote	Álcool °GL	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade g/L	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	PV %	CAS %	Indice Prot	cGMP (mg / mL)
1	02/04/21	8	3557	85	6,71	- 0,548	0,15	1032,4	3,41	2,58	4,42	3,08	11,64	perda	perda	perda	0
2	03/05/21	3	3615	85	6,81	- 0,540	0,15	1031,0	3,29	2,48	4,37	3,01	11,36	3,15	2,36	0,75	0
3	10/05/21	8	3689	85	6,82	- 0,544	0,15	1030,9	3,29	2,48	4,38	3,10	11,52	3,09	2,43	0,79	0
4	11/05/21	3	3702	85	6,83	- 0,542	0,14	1030,6	3,30	2,49	4,37	3,02	11,40	3,04	2,29	0,75	0
5	12/05/21	6	3714	85	6,79	- 0,547	0,16	1031,3	3,32	2,48	4,39	3,08	11,55	3,29	2,40	0,73	0
6	13/05/21	8	3723	85	6,81	- 0,551	0,15	1032,8	3,34	2,53	4,41	3,05	11,50	3,21	2,26	0,70	0
7	16/05/21	5	3749	85	6,80	- 0,546	0,14	1030,7	3,32	2,49	4,38	3,06	11,41	3,08	2,25	0,73	0
8	17/05/21	4	3761	85	6,85	- 0,552	0,14	1031,4	3,38	2,54	4,39	3,06	11,56	3,15	2,27	0,72	0
9	18/05/21	6	3774	85	6,81	- 0,546	0,14	1032,0	3,34	2,52	4,38	3,04	11,50	3,27	2,41	0,76	0
10	19/05/21	8	3375	85	6,80	- 0,544	0,15	1032,2	3,35	2,54	4,4	3,07	11,55	3,34	2,54	0,76	0

Anexo III – Resultados Individualizados das amostras de leite UHT

Análises de acompanhamento do produto durante processamento e envase asséptico (Dia – 0, total 10 amostras)

Amostra	Data envase	Lote	Álcool °GL	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade g/L	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	Viscosidade cP	cGMP
1	02/05/21	3557	85	6,70	-0,541	0,15	1032,0	3,40	2,57	4,40	3,10	11,62	1,45	0
2	03/05/21	3615	85	6,69	-0,536	0,15	1033,0	3,31	2,58	4,37	3,07	11,45	1,51	0
3	10/05/21	3689	85	6,78	-0,540	0,15	1033,6	3,30	2,55	4,38	3,13	11,59	1,48	0
4	11/05/21	3702	85	6,81	0,539	0,14	1033,3	3,37	2,59	4,38	3,07	11,55	1,46	0
5	12/05/21	3714	85	6,80	-0,549	0,15	1030,6	3,36	2,60	4,41	3,10	11,59	1,52	0
6	13/05/21	3723	85	6,76	-0,544	0,15	1032,4	3,38	2,62	4,44	3,08	11,61	1,49	0
7	17/05/21	3749	85	6,73	-0,540	0,15	1031,6	3,37	2,59	4,40	3,10	11,58	1,42	0
8	17/05/21	3761	85	6,74	-0,548	0,15	1032,4	3,38	2,64	4,43	3,06	11,65	1,44	0
9	18/05/21	3774	85	6,75	-0,540	0,15	1031,2	3,32	2,58	4,36	3,04	11,46	1,51	0
10	19/05/21	3775	85	6,72	-0,538	0,14	1033,5	3,33	2,63	4,42	3,07	11,71	1,53	0

Análises de acompanhamento do produto durante processamento e envase asséptico (Dia – 30, total 10 amostras)

Amostra	Álcool °GL	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade gr/L	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	Viscosidade cP	Sediment. (gr)	PV %	CAS %	Proteólise %	cGMP (mg / mL)
1	85	6,78	-0,549	0,14	1033,0	3,42	2,58	4,43	3,07	11,7	1,46	0	3,25	2,63	0,81	30
2	85	6,75	-0,542	0,14	1032,4	3,34	2,55	4,37	3,05	11,53	1,56	0	3,15	2,56	0,81	30
3	85	6,78	-0,541	0,15	1032,2	3,33	2,56	4,38	3,23	11,69	1,49	0	3,17	2,38	0,75	0
4	85	6,76	-0,542	0,15	1032,6	3,34	2,57	4,35	3,13	11,69	1,46	0	3,3	2,59	0,79	0
5	85	6,79	-0,544	0,14	1032,5	3,36	2,59	4,42	3,15	11,69	1,53	0	3,15	2,40	0,76	30
6	85	6,76	-0,549	0,15	1033,5	3,4	2,61	4,41	3,12	11,72	1,50	0	3,29	2,45	0,74	0
7	85	6,82	-0,546	0,14	1031,6	3,37	2,57	4,4	3,01	11,57	1,43	0	3,39	2,63	0,77	30
8	85	6,81	-0,55	0,14	1032,4	3,4	2,61	4,44	3,04	11,67	1,48	0	3,15	2,35	0,75	30
9	85	6,8	-0,543	0,14	1031,2	3,33	2,55	4,35	3,05	11,46	1,52	0,8	3,07	2,37	0,77	30
10	85	6,82	-0,54	0,14	1033,5	3,39	2,61	4,41	3,17	11,73	1,54	0	3,31	2,47	0,75	30

Análises de acompanhamento do produto durante processamento e envase asséptico (Dia – 60, total 10 amostras)

Amostra	Álcool °GL	pH	I.C°H	Acidez %	Densidade (gr/L)	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST%	Viscosidade (cP)	Sediment. (gr)	PV %	CAS %	Índice Proteólise	cGMP (mg / mL)
1	85	6,70	-0,542	0,15	1033,00	3,41	2,55	4,45	3,08	11,73	1,48	0,04	3,47	2,36	0,74	30
2	85	6,70	-0,540	0,15	1033,00	3,34	2,54	4,37	3,05	11,54	1,57	0,05	3,39	2,47	0,72	75
3	85	6,76	-0,540	0,15	1032,10	3,32	2,54	4,37	3,12	11,70	1,49	0,30	3,22	2,36	0,73	30
4	85	6,71	-0,540	0,15	1032,60	3,33	2,55	4,38	3,08	11,59	1,48	0,10	3,28	2,38	0,73	30
5	85	6,70	-0,542	0,14	1032,50	3,36	2,58	4,42	3,09	11,70	1,54	0,15	2,48	2,39	0,74	30
6	85	6,68	-0,55	0,15	1033,40	3,40	2,60	4,43	3,10	11,74	1,51	0,06	3,42	2,54	0,73	30
7	85	6,72	-0,54	0,15	1031,50	3,35	2,55	4,40	3,13	11,59	1,44	0,08	3,29	2,26	0,71	30
8	85	6,74	-0,54	0,15	1032,30	3,39	2,60	4,37	3,11	11,69	1,50	0,30	3,17	2,33	0,71	75
9	85	6,75	-0,54	0,15	1031,40	3,31	2,54	4,34	3,04	11,52	1,52	0,01	3,19	2,24	0,70	75
10	85	6,72	-0,54	0,14	1033,60	3,37	2,60	4,44	3,16	11,79	1,54	0,11	3,33	2,40	0,72	75

Análises de acompanhamento do produto durante processamento e envase asséptico (Dia – 90, total 10 amostras)

Amostra	Álcool	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade (gr/L)	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	Viscosidade cP	Sedimentação (gr)	PV %	CAS %	Índice Proteólise	C-GMP (mg / mL)
1	85	6,78	-0,542	0,15	1033,0	3,41	2,53	4,45	3,08	11,75	1,51	0,340	3,22	2,34	0,73	30
2	85	6,75	-0,542	0,15	1033,0	3,33	2,53	4,40	3,06	11,62	1,55	0,210	3,42	2,44	0,71	30
3	85	6,66	-0,545	0,15	1032,2	3,32	2,53	4,39	3,13	11,7	1,5	0,351	3,15	2,24	0,71	75
4	85	6,67	-0,539	0,15	1032,4	3,33	2,55	4,38	3,09	11,61	1,48	0,303	3,24	2,35	0,72	75
5	85	6,68	-0,545	0,14	1032,7	3,36	2,56	4,43	3,1	11,71	1,55	0,363	3,25	2,37	0,73	30
6	85	6,68	-0,547	0,15	1033,4	3,40	2,59	4,42	3,08	11,75	1,51	0,329	3,44	2,52	0,73	30
7	85	6,66	-0,543	0,15	1031,5	3,37	2,55	4,41	3,07	11,6	1,42	0,522	3,28	2,23	0,73	30
8	85	6,63	-0,540	0,15	1032,7	3,40	2,59	4,46	3,1	11,81	1,51	0,260	3,17	2,22	0,7	75
9	85	6,66	-0,535	0,15	1031,7	3,33	2,53	4,37	3,03	11,53	1,52	0,123	3,33	2,25	0,71	75
10	85	6,65	-0,547	0,15	1033,4	3,37	2,59	4,48	3,17	11,8	1,55	0,380	3,33	2,35	0,68	75

Análises de acompanhamento do produto durante processamento e envase asséptico (Dia – 120, total 10 amostras)

Amos- tra	Álcool °GL	pH	I.C °H	Acidez %	Densidade (gr/L)	Proteína %	Caseína %	Lactose %	Gordura %	EST %	Viscosi- dade cP	Sedimenta- ção (gr)	PV %	CAS %	Índice Pro- teólise	C-GMP (mg / mL)
1	85	6,7	-0,550	0,15	1032,9	3,4	2,53	4,41	3,08	11,69	1,51	0,401	3,31	2,28	0,69	75
2	85	6,68	-0,538	0,15	1033	3,32	2,52	4,39	3,06	11,54	1,56	0,325	3,39	2,3	0,68	75
3	85	6,65	-0,545	0,16	1032,3	3,33	2,52	4,39	3,13	11,67	1,51	0,355	3,23	2,23	0,68	75
4	85	6,66	-0,537	0,16	1032,7	3,33	2,55	4,36	3,08	11,59	1,51	0,342	3,22	2,21	0,68	75
5	85	6,68	-0,545	0,15	1032,7	3,36	2,56	4,41	3,1	11,66	1,54	0,361	3,25	2,28	0,70	75
6	85	6,69	-0,55	0,15	1033,4	3,39	2,58	4,42	3,09	11,71	1,51	0,302	3,22	2,2	0,69	75
7	85	6,64	-0,545	0,15	1031,6	3,35	2,55	4,40	3,12	11,66	1,45	0,547	3,23	2,4	0,72	75
8	85	6,63	-0,552	0,15	1032,9	3,39	2,28	4,45	3,11	11,77	1,50	0,335	3,23	2,23	0,66	75
9	85	6,64	0,54	0,15	1031,8	3,37	2,53	4,36	3,04	11,48	1,50	0,241	3,20	2,24	0,70	75
10	85	6,63	-0,546	0,16	1033,7	3,37	2,57	4,44	3,18	11,76	1,55	0,450	3,20	2,12	0,66	75