



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



**ADIÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO AO LEITE CRU:
EFEITO SOBRE A QUALIDADE E VIDA DE PRATELEIRA
DO LEITE UHT**

Priscila Cristina Bizam Vianna

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Mirna L. Gigante

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas/SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

V655a Vianna, Priscila Cristina Bizam
Adição de dióxido de carbono ao leite cru: efeito sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT / Priscila Cristina Bizam Vianna. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Mirna Lucia Gigante
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Bactérias psicrotóficas. 2. Dióxido de carbono. 3. Leite UAT. 4. Proteólise. 5. Gelificação. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Carbon dioxide addition to raw milk: effect on the quality and shelf-life of UHT milk

Palavras-chave em inglês (Keywords): Psychrotrophic bacteria, Carbon dioxide, UHT milk, Proteolysis, Age gelation

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis

Flávia Maria Netto

Leila Maria Spadoti

Salvador Massaguer Roig

Data de defesa: 23/04/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
(Orientadora)

Profa. Dra. Christiane M. V. Barros De Rensis
(Membro Titular)

Profa. Dra. Flávia Maria Netto
(Membro Titular)

Dra. Leila Maria Spadoti
(Membro Titular)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro Titular)

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
(Membro Suplente)

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro Suplente)

Dedico mais esta conquista

*Aos meus pais José Carlos e Doraci, e meu irmão Murilo, por toda
confiança e amor. Vocês são meus maiores exemplos de vida, de
inteligência, competência e dignidade e merecem toda minha
admiração e respeito. Meu êxito é fruto de seus esforços e incentivo
constante. Muito obrigada!!!!*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por mais esta conquista;

À minha família pelo amor e incentivo incondicionais no decorrer desta caminhada;

À minha orientadora, Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante, por acreditar em mim, pela amizade, paciência, disponibilidade, ensinamentos transmitidos e, principalmente, pelos bons momentos vividos no decorrer destes anos;

Aos membros da banca examinadora, Professores Ana Lúcia Barretto Penna, Christiane de Rensis, Flávia Maria Netto, Leila Spadoti, Marcos Veiga dos Santos, Salvador Massaguer Roig e Walkiria Hanada Viotto pelas correções e sugestões na redação final deste trabalho;

À Bete, amiga e técnica do Laboratório de Leite, pela atenção, disponibilidade e ótima companhia durante estes anos no laboratório;

À Ana Lourdes, Diana e Renata, técnicas dos Laboratórios de Microbiologia e Instrumentação, pela amizade, atenção e ajuda nos momentos de dúvida;

À Profa. Flávia Maria Netto e ao Chico, técnico do Laboratório Central Analítico do DEPAN/FEA, pela disponibilidade e ajuda nas análises de cromatografia deste trabalho;

Ao Prof. Dr. José de Assis F. Faria, pela disponibilização da Planta Piloto de Sistemas de Embalagem para realização dos processamentos UHT;

A todos os técnicos e funcionários do DTA pela ajuda e atenção;

Aos amigos do Laboratório de Leite: Atílio, Marcela, Clarice, Mônica, Lígia, Maria Cecília, Renata, Milena, Bárbara, Diogo, Luana, Priscila, Lívia, Laís e Mariane pela amizade, força e agradável convivência;

Às estagiárias Renata e Kizzy pela amizade e importante ajuda nas análises e processamentos;

Aos alunos do Laboratório de Embalagem, Eduardo, Wellington e Tatiana pela amizade e ajuda para realização dos processamentos UHT;

Às amigas Juliana, Kelly, Larissa e Christiane pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas;

A todos os colegas da Pós-Graduação;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

A todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento, respeito e gratidão.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Qualidade do leite cru.....	4
3.2. Qualidade do leite esterilizado.....	9
3.3. Utilização de dióxido de carbono (CO ₂) em leite fluido.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Matéria-prima.....	17
4.2. Efeito da concentração de CO ₂ sobre a qualidade do leite cru.....	17
4.2.1. Processamento.....	17
4.2.2. Procedimento de amostragem e análises realizadas.....	19
4.2.3. Determinações físico-químicas.....	20
4.2.4. Determinações microbiológicas.....	24
4.2.5. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	24
4.3. Efeito da adição de CO ₂ ao leite cru sobre a qualidade do leite UHT.....	25
4.3.1. Processamento.....	25
4.3.2. Procedimento de amostragem e análises realizadas.....	30
4.3.3. Determinações físico-químicas.....	31
4.3.4. Determinações microbiológicas.....	34
4.3.5. Avaliação da esterilidade comercial.....	35
4.3.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Efeito da concentração de CO ₂ e da temperatura de armazenamento sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru...	36

5.1.1. Caracterização do leite cru.....	36
5.1.2. Efeito da concentração de CO ₂ sobre o desenvolvimento microbiano.....	38
5.1.3. Efeito da adição de CO ₂ sobre a proteólise e lipólise do leite cru...	44
5.2. Efeito da adição de CO ₂ ao leite cru sobre as características físico-químicas do leite UHT.....	48
5.2.1. Efeito da concentração de CO ₂ sobre as características físico-químicas e microbiológicas da matéria-prima.....	48
5.2.2. Características físico-químicas do leite UHT.....	53
5.2.3. Avaliação do pH durante o armazenamento do leite UHT.....	54
5.2.4. Avaliação da lipólise durante o armazenamento do leite UHT.....	55
5.2.5. Avaliação da proteólise durante o armazenamento do leite UHT...	56
6. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	83
ANEXO 3.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru utilizado como matéria-prima (n = 2).....	37
Tabela 2.	Resultado da análise estatística do desenvolvimento microbiano (n = 2).....	38
Tabela 3.	Resultado da avaliação estatística do efeito da adição de CO ₂ sobre a proteólise e lipólise do leite cru refrigerado (n = 2).....	45
Tabela 4.	Características físico-químicas do leite cru no dia da recepção (Dia 0) e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado ou não de CO ₂ (n=3).....	49
Tabela 5.	Características microbiológicas do leite cru no dia da recepção e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado ou não de CO ₂ (n=3).....	50
Tabela 6.	Composição físico-química do leite UHT produzido a partir de leite cru adicionado ou não de CO ₂ (n=3).....	53
Tabela 7.	Resultado da avaliação estatística do efeito da adição de CO ₂ ao leite cru sobre as frações de NNP e NNC (como % do NT) do leite UHT durante sua vida de prateleira (n = 3).....	57
Tabela 8.	Porcentagens das áreas dos picos cromatográficos das frações protéicas do leite UHT e UHT _{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (n=2).....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma geral do experimento.....	18
Figura 2.	Cilindro de CO ₂ com tubo de PVC perfurado acoplado utilizado na carbonatação do leite.....	18
Figura 3.	Analisador de CO ₂ MOCON Pac Check 650.....	21
Figura 4.	Exemplo de curva padrão obtida para conversão dos valores de concentração de CO ₂ de porcentagem (%) para ppm.....	22
Figura 5.	Exemplo de curva padrão obtida para cálculo da massa de ácidos graxos livres no leite.....	23
Figura 6.	Tanques de expansão utilizados para o armazenamento do leite cru.....	26
Figura 7.	Linha de processamento UHT e embalagem asséptica com o tanque de produto e acessórios para o envase. 1) tanques de matéria-prima; 2) trocador de calor; 3) tanque de produto; 4) máquina de embalagem asséptica.....	28
Figura 8.	Detalhe da linha de processamento UHT mostrando: 1) tanques de matéria-prima; 2) trocador de calor; 3) homogeneizador.....	28
Figura 9.	Fluxograma geral de armazenamento do leite cru e processamento do leite UHT.....	29
Figura 10.	Concentração de CO ₂ (ppm) nas amostras de leite cru durante o armazenamento refrigerado a 4±1°C (●) e 7±1°C (■).....	37
Figura 11.	Log da contagem padrão em placas (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO ₂ ; (○) 4°C sem CO ₂ ; (■) 7°C com CO ₂ , (□) 7°C sem CO ₂ ; (---) contagem padrão máxima permitida pela legislação brasileira (7,5x10 ⁵ ufc/mL).....	39
Figura 12.	Log da contagem de psicotróficos (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO ₂ ; (○) 4°C sem CO ₂ ; (■) 7°C com CO ₂ , (□) 7°C sem CO ₂ ; (---) contagem de psicotróficos considerada crítica para o processamento do leite....	40

Figura 13.	Log da contagem de <i>Pseudomonas</i> spp. (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO ₂ ; (○) 4°C sem CO ₂ ; (■) 7°C com CO ₂ , (□) 7°C sem CO ₂ ; (---) contagem de psicrotróficos considerada crítica para o processamento do leite.....	41
Figura 14.	(a) Fase lag, (b) tempo de geração e (c) taxa de crescimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru adicionado ou não de CO ₂ , armazenados a 4±1°C e 7±1°C.....	42
Figura 15.	(a) Fase lag, (b) tempo de geração e (c) taxa de crescimento de <i>Pseudomonas</i> spp. em leite cru com e sem adição de CO ₂ , armazenados a 4±1°C e 7±1°C.....	44
Figura 16.	(a) Correlação entre CN/P (%) do leite com e sem adição de CO ₂ (Intervalo de confiança [-0,206; -0,099] com nível de significância de 95%) e (b) Correlação entre AGL (meq. ác. palmítico/kg leite) do leite com e sem adição de CO ₂ (Intervalo de confiança [-0,004; +0,011] com nível de significância de 95%).....	46
Figura 17.	(a) Correlação entre a CN/P (%) e a contagem de psicrotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [-0,857; -0,399] com nível de significância de 95%) e (b) Correlação entre a concentração de AGL (meq. ác. palmítico/kg de leite) e a contagem de psicrotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [0,035; 0,113] com nível de significância de 95%).....	47
Figura 18.	Comportamento do pH e da concentração de CO ₂ durante os 6 dias de armazenamento refrigerado do leite cru tratado. (●) pH; (■) CO ₂	52
Figura 19.	Comportamento do pH do leite UHT e UHT _{CO2} durante 120 dias de armazenamento. (●) UHT; (■) UHT _{CO2}	55
Figura 20.	Efeito do tempo de armazenamento na concentração de ácidos graxos livres (AGL).....	56

Figura 21.	Efeito do tempo de armazenamento sobre o comportamento do NNC/NT do leite UHT (●) e UHT _{CO2} (■).....	58
Figura 22.	Correlação entre NNC/NT (%) do leite UHT e UHT _{CO2} (Intervalo de confiança [0,695;2,096] com nível de significância de 95%)....	58
Figura 23.	Frações de caseína do leite UHT e UHT _{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).....	60
Figura 24.	Padrão de peptídeos dos filtrados do leite UHT e UHT _{CO2} em pH 4,6 após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).....	62
Figura 25.	Sedimentação observada no leite UHT e UHT _{CO2}	63
Figura 26.	Efeito do tempo de armazenamento sobre o nitrogênio não protéico como porcentagem do nitrogênio total (NNP/NT).....	64
Figura 27.	Padrão de peptídeos dos filtrados de TCA do leite UHT e UHT _{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).....	65

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de dióxido de carbono (CO₂) sobre a qualidade dos leites cru e UHT. Inicialmente, o leite cru adicionado ou não de CO₂ foi armazenado em garrafas de vidro a 4 e 7°C e amostras foram avaliadas diariamente quanto à contagem padrão em placas, psicotróficos e *Pseudomonas* spp. e a cada dois dias quanto à concentração de CO₂, proteólise e lipólise, até que a contagem padrão em placas atingisse 7,5x10⁵ ufc/mL. O delineamento experimental utilizado foi o de sub-sub-parcelas divididas e os resultados foram avaliados por análise de variância multivariada, pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$) e através do modelo matemático de Gompertz. A contagem padrão aumentou ao longo do tempo para todos os tratamentos e o tempo de conservação foi de 14 dias para o leite armazenado a 4°C adicionado de CO₂ e de 5 dias para o armazenado a 7°C não adicionado de CO₂. Independente da temperatura de armazenamento, a adição de CO₂ estendeu o tempo de fase lag e de geração dos micro-organismos psicotróficos e reduziu sua taxa de crescimento. O leite adicionado de CO₂ apresentou menor proteólise e lipólise quando comparado ao não adicionado devido ao menor desenvolvimento de psicotróficos. Com base nesses resultados, definiu-se o armazenamento do leite cru adicionado ou não de CO₂ a 4°C por 6 dias antes do processamento UHT. Nesta etapa, o leite cru adicionado ou não de CO₂ foi armazenado em tanques de expansão antes do processamento UHT (140°C/5 s). O leite cru foi avaliado no dia da recepção e após 6 dias de armazenamento quanto à composição físico-química, proteólise, lipólise e contagens microbianas. Após o processamento, as amostras foram avaliadas durante 120 dias quanto à composição físico-química, lipólise e proteólise. O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas em blocos com três repetições. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey ($p < 0,05$). Após 6 dias de armazenamento a 4 °C o leite cru adicionado de CO₂ manteve sua qualidade físico-química e microbiológica enquanto que o leite não adicionado sofreu perda significativa de qualidade. A taxa de aumento de proteólise foi 1,4 vezes maior no leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO₂ quando comparado à amostra produzida com adição de CO₂. Em ambas as amostras, a proteólise foi decorrente tanto da ação de plasmina como de proteases microbianas. Entretanto, o leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO₂ apresentou maior ação de proteases microbianas, caracterizada pelo aumento de peptídeos menos hidrofóbicos. A lipólise aumentou para as duas amostras durante os 120 dias e foi maior no leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO₂. Os resultados mostraram que a adição de CO₂ ao leite cru preservou sua qualidade físico-química e microbiológica durante o armazenamento refrigerado e afetou positivamente a manutenção da qualidade do leite UHT durante seu armazenamento.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the CO₂ addition on the raw and UHT milk quality. First, raw milk with or without CO₂ addition was stored in glass bottles at 4°C and 7°C and daily analyzed to standard plate count, psychrotrophic bacteria count and *Pseudomonas* spp. and every other day to CO₂ concentration, proteolysis and lipolysis until standard plate count reached 7,5x10⁵ ufc/mL. Split-split-plot design was used and the results were evaluated by multivariate variance analysis, Tukey's test ($p < 0,05$) and by Gompertz model. The standard plate count increased throughout the time for all treatments and the preservation time was 14 days for CO₂ added raw milk stored at 4°C and 5 days for raw milk without CO₂ addition stored at 7°C. Independent of the storage temperature, CO₂ extended the lag phase, increased the generation time and decreased the growth rate of psychrotrophic bacteria. Milk with CO₂ addition presented lower proteolysis and lipolysis, related to the slower psychrotrophic bacteria development. Based on these results, it was defined a storage of raw milk with and without CO₂ addition in bulk tanks at 4°C during 6 days before UHT treatment (140°C/5 s). Raw milk was evaluated to physical-chemical composition, proteolysis, lipolysis and microbial counts in the day of reception and after 6 days of storage. After processing, samples were evaluated to physical-chemical composition, lipolysis and proteolysis. Split-plot design was used with three replications. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0,05$). After 6 days of storage at 4°C, CO₂ added raw milk kept its physical-chemical and microbiological quality, while raw milk without CO₂ addition had significant losses. Proteolysis increased ratio was 1,4 higher in UHT milk produced with raw milk without CO₂ addition when compared to UHT milk produced with CO₂. In both samples proteolysis was a consequence of plasmin and microbial proteases action, but the sample produced with raw milk without CO₂ addition presented higher microbial proteases action, characterized for the increase of less hydrophobic peptides. Lipolysis increased for both samples during the 120 days of storage and it was higher in UHT milk produced from raw milk without CO₂ addition. The results had shown that CO₂ addition to raw milk preserved its physical-chemical and microbiological quality during refrigerated storage and positively affected the quality maintenance of UHT milk during its storage.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diversos fatores contribuem para a limitada vida de prateleira dos produtos lácteos refrigerados, tais como a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, a presença de enzimas bacterianas, as condições de tratamento térmico e as temperaturas de distribuição e armazenamento dos produtos (LOSS; HOTCHKISS, 2000).

A refrigeração do leite cru é o método mais eficiente e mundialmente aceito para controlar o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, que são os responsáveis pela acidificação do leite. Por outro lado, a refrigeração favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos, os quais produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas resistentes aos tratamentos térmicos usuais da indústria láctea, que prejudicam a qualidade do leite e dos produtos processados. Estudos mostram que o aumento das contagens de psicotróficos no leite cru afeta negativamente a vida de prateleira de leites UHT (Ultra High Temperature), pasteurizado e em pó, de queijos duros, queijo cottage, manteiga e iogurte (DATTA; DEETH, 2001; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

A indústria láctea brasileira, assim como a do resto do mundo, foi inicialmente projetada para a recepção e o processamento de leite quente, recebido diariamente em latões. Esta realidade não é mais a dominante no setor. Atualmente, o leite é refrigerado nas fazendas (7°C), pode ser captado a cada dois dias (BRASIL, 2002) e é armazenado na indústria para posterior processamento. Neste novo contexto, o leite cru refrigerado pode ser transportado por longas distâncias entre os centros produtores e os processadores e é perfeitamente possível que seja processado 5 a 7 dias após a ordenha, o que permite o desenvolvimento de micro-organismos que afetam negativamente sua qualidade e a dos produtos processados. Este quadro é agravado no mercado “spot”, ou seja, na comercialização de leite cru refrigerado entre indústrias. Geralmente são cooperativas ou pequenas indústrias nacionais que vendem o leite excedente para indústrias de maior porte ou melhores posicionadas no mercado (NOGUEIRA,

2006). Desta forma, a possibilidade de processamento de um leite cru refrigerado e armazenado por períodos maiores que 7 dias aumenta e, conseqüentemente, a possibilidade de se ter problemas de qualidade nos produtos processados é também maior.

No caso específico do leite UHT, o principal problema que limita sua vida de prateleira é a gelificação, fenômeno que causa o aumento da viscosidade do leite durante seu armazenamento. Uma das causas da gelificação é a proteólise, tanto pela plasmina, enzima natural do leite, quanto por enzimas termorresistentes produzidas por psicotróficos (DATTA; DEETH, 2003). Diversos trabalhos têm relacionado o aumento da viscosidade à proteólise causada pela atividade destas enzimas no leite UHT (DATTA; DEETH, 2003; TOPÇU; NUMANOĞLU; SALDAMLI, 2006; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A utilização de métodos para controlar o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos é de interesse da indústria láctea, pois viabiliza o armazenamento do leite cru por maior tempo, sem perda de qualidade para os produtos processados. Uma forma de controle utilizada é a termização, que consiste de um tratamento térmico de menor intensidade do que a pasteurização, usualmente empregando temperaturas entre 60 e 69°C por 15-20 segundos. O objetivo da termização é eliminar bactérias, especialmente psicotróficas, evitando sua proliferação e a conseqüente produção de enzimas termorresistentes que eventualmente causam a deterioração dos produtos lácteos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). A legislação brasileira (BRASIL, 1996) permite o pré-aquecimento do leite cru, ou seja, a termização, com a finalidade de reduzir sua carga microbiana, desde que não ocorram alterações das características próprias do leite cru. Além disso, o leite pré-aquecido deve manter as reações enzimáticas do leite cru. Entretanto, este método é pouco prático, tornando-se inviável quando se trata da produção primária de leite, com captação direta do produtor, sem passagem por postos de resfriamento com estrutura para tratamento térmico do leite.

Outro método que surge como alternativa para a conservação da qualidade do leite cru refrigerado é a utilização do dióxido de carbono (CO₂). Estudos têm demonstrado que a adição de CO₂ ao leite cru controla o desenvolvimento de micro-organismos psicrótrópicos à temperatura de refrigeração (ESPIE; MADDEN, 1997; KING; MABBITT, 1982; ROBERTS; TORREY, 1988; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003; RUAS-MADIEDO et al., 1998). A ação antimicrobiana do CO₂ é proporcional à sua concentração e seu efeito inibitório sobre os micro-organismos depende da temperatura, acidez, atividade de água, tipo e fase de desenvolvimento do microrganismo (SARANTÓUPOULOS et al., 1996).

Para a obtenção de produtos de melhor qualidade e maior vida de prateleira deve-se atuar desde o início da cadeia produtiva do leite, ou seja, na garantia da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru. A hipótese deste trabalho é que a inibição do desenvolvimento de micro-organismos psicrótrópicos por meio da adição de CO₂ possa minimizar os problemas de qualidade que limitam a vida de prateleira do leite UHT, o qual respondia em 2008 por 76% do leite fluido consumido no Brasil (EMBRAPA, 2008). O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o impacto da adição de CO₂ sobre a qualidade do leite cru e do leite UHT.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da concentração de CO₂ e da temperatura de armazenamento sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru;
2. Avaliar o efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre as características físico-químicas do leite UHT durante o armazenamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Qualidade do leite cru

A indústria láctea brasileira, assim como a do resto do mundo, foi inicialmente projetada para a recepção e o processamento de leite quente, recebido diariamente em latões. Entretanto, com a implantação do Programa Nacional de Qualidade do Leite (1998), o Brasil começou a empregar esforços para garantir a qualidade do leite em toda cadeia produtiva. Este esforço culminou com a publicação da Instrução Normativa N^o51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), através da qual foram estabelecidas normas para coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.

Segundo essas regras, após a ordenha, o leite cru pode ser armazenado em tanques de expansão direta, devendo ser refrigerado a temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$ no tempo máximo de 3 horas; ou em tanques de refrigeração por imersão, refrigerado a temperatura $\leq 7^{\circ}\text{C}$ também em 3 horas. Além disso, permite-se o uso de tanques comunitários, desde que baseado no princípio de operação por expansão direta. No caso da passagem do leite cru refrigerado por um posto de refrigeração, este deve ser resfriado a temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$ em trocador de calor de placas e permanecer neste estabelecimento por no máximo 6 horas. Este tempo pode ser estendido para 24 horas no caso do leite cru tipo C, enquanto perdurar sua produção. Neste novo contexto, de produção e captação o leite cru pode ser mantido refrigerado por longos períodos o que viabiliza o desenvolvimento de micro-organismos psicrótróficos que afetam negativamente sua qualidade e a dos produtos processados.

Os padrões microbiológicos para o leite cru refrigerado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste são contagem padrão em placas máxima de $7,5 \times 10^5$ ufc/mL e contagem de células somáticas abaixo de 750.000 cél/mL. Estes limites só passarão a ser válidos nas regiões norte e nordeste a partir de 01 de julho de 2010, onde ainda vigoram os máximos de 1×10^6 ufc/mL e 1.000.000 cél/mL para

contagem padrão em placas e a contagem de células somáticas, respectivamente (BRASIL, 2002).

No entanto, esse padrão microbiológico nem sempre é alcançado. Avaliando o leite cru de quatro regiões brasileiras quanto ao atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela IN nº 51, Nero et al. (2005), observaram que 48,6% das amostras avaliadas apresentaram contagem de aeróbios mesófilos $> 10^6$ ufc/mL, sendo 21,3% na região de Viçosa (MG), 56,0% na região de Pelotas (RS), 47,6% na região de Londrina (PR) e 68% na região de Botucatu (SP). Os autores enfatizaram que a melhoria desse quadro está relacionada à refrigeração na conservação e transporte do leite cru, bem como na implantação de programas de boas práticas de ordenha e transporte, além de assistência técnica nas propriedades rurais.

A temperatura de armazenamento do leite após a ordenha é um dos principais fatores que determinam sua vida de prateleira. O armazenamento refrigerado minimiza o problema de crescimento de micro-organismos mesófilos, que crescem a temperaturas de 25-30°C, e que causam a acidificação do leite através da fermentação da lactose. Entretanto, a baixa temperatura favorece o crescimento de micro-organismos psicrófilos que embora sejam, na sua maioria, termolábeis, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que são normalmente associadas à deterioração da qualidade dos produtos lácteos processados (DATTA; DEETH, 2001; MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Trabalho desenvolvido por Sanvido (2007) demonstrou que o tempo de armazenamento do leite cru refrigerado ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) afetou significativamente a contagem de todas as classes de micro-organismos avaliados. A contagem total de mesófilos, que inicialmente era característica de leite de boa qualidade ($7,4 \times 10^3$ ufc/mL), aumentou 3 e 5 ciclos logarítmicos após 4 e 7 dias de armazenamento refrigerado, respectivamente. Nos mesmos períodos, a contagem de psicrófilos passou da ordem de 10^3 para 10^6 e 10^7 ufc/mL. O aumento das contagens microbiológicas foi acompanhado pelo aumento da proteólise do leite cru.

A importância do controle da presença de micro-organismos psicotróficos no leite cru, bem como sua relação com a qualidade dos produtos lácteos processados, especialmente quando as contagens são acima de 10^6 ufc/mL, não é um assunto novo e é amplamente discutido na literatura (MUIR, 1996; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Os micro-organismos psicotróficos presentes no leite cru são bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, e *Flavobacterium*, e Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Destes gêneros, o mais comumente encontrado em leite é o *Pseudomonas*, com destaque para a espécie *P. fluorescens*. Outras espécies incluem *P. fragi*, *P. putida* e *P. aeruginosa* (COUSIN; BRAMLEY, 1981; COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Muitos destes micro-organismos apresentam temperatura ótima de desenvolvimento entre 20 e 30°C, mas também podem se desenvolver em temperatura de refrigeração (MUIR, 1996).

Na produção primária do leite, os principais pontos de contaminação por micro-organismos psicotróficos são latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos e utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente (COUSIN; BRAMLEY, 1981; HAYES; BOOR, 2001). Segundo Santana et al. (2001), que avaliaram cinco propriedades leiteiras na região de Londrina, a água residual de tanques de expansão foi a principal fonte de contaminação por psicotróficos no processo de produção de leite. Nos tanques de expansão a água residual apresentou contagens de psicotróficos de até $2,6 \times 10^7$ ufc/mL.

Altas contagens de psicotróficos (até 10^7 ufc/mL) também foram encontradas em amostras de leite coletadas de tanques coletivos e individuais, onde se observou a predominância de bactérias psicotróficas Gram-negativas (81,2%), dos gêneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* e *Yersinia*.

Pseudomonas foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens* foi a espécie predominante (ARCURI et al., 2008). Além disso, Pinto, Martins e Vanetti (2006), que avaliaram a qualidade microbiológica de leite cru refrigerado destinado à produção de leite UHT, observaram que 100% das amostras dos silos apresentaram contagem de psicotróficos $>10^5$ ufc/mL, sendo que 50% apresentaram contagem $>10^6$ ufc/mL. Os autores concluíram que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não foram adequadas para minimizar a contaminação microbiana e o desenvolvimento de bactérias psicotróficas.

Trabalho recente publicado por Souza et al. (2009) encontrou contagens de mesófilos variando de $6,2 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^7$ ufc/mL e de psicotróficos variando de $3,2 \times 10^2$ a $9,6 \times 10^5$ ufc/mL em amostras de leite cru de propriedades rurais de Minas Gerais. Quando a avaliação foi realizada no tanque comunitário utilizado por estas propriedades, as contagens médias foram de $1,8 \times 10^5$ e $7,4 \times 10^4$ ufc/mL para mesófilos e psicotróficos, respectivamente. A proximidade entre o tanque comunitário e as propriedades rurais contribuiu para a rápida entrega, de modo a controlar a multiplicação de mesófilos, neste caso, proporcionando a obtenção de leite cru com qualidade microbiológica satisfatória e atendendo os limites estabelecidos pela legislação vigente.

Enzimas secretadas por micro-organismos psicotróficos durante o armazenamento refrigerado do leite podem reduzir seu valor econômico. A proteólise reduz o rendimento de produtos de base protéica como queijo, iogurte e leite em pó e está relacionada a defeitos de qualidade como alterações de sabor em leite pasteurizado e gelificação de leite UHT. Já o desenvolvimento da lipólise produz ácidos graxos livres causando a rancidez do leite e de produtos lácteos, e, conseqüentemente, a rejeição pelos consumidores. Segundo diversos autores, a atividade enzimática passa a ter importância quando as contagens de psicotróficos ultrapassam 10^6 ufc/mL (COUSIN, 1982; MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

A produção de proteases por psicrotróficos em amostras de leite cru armazenadas a 2°C, 4°C e 7°C por 10 dias foi avaliada por Haryani et al. (2003). Os autores observaram o aumento da contagem de psicrotróficos das amostras nas três temperaturas de armazenamento. Entretanto, as contagens bacterianas foram significativamente maiores a 7°C e pouca proteólise ocorreu no leite armazenado a 2°C por 10 dias. A produção de proteases ou proteólise foi observada após 6 dias a 2°C, 4 dias a 4°C e apenas após 2 dias a 7°C. Desta forma, os autores concluíram que para prevenir o desenvolvimento de psicrotróficos e, conseqüentemente, a produção de proteases, o leite deve ser armazenado antes do tratamento térmico por períodos inferiores aos estudados em seu experimento.

Em outro estudo, Celestino, Iyer e Roginski (1996) avaliaram o efeito do armazenamento refrigerado (4°C/48 horas) sobre a qualidade do leite cru. O armazenamento resultou em aumento de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. O número de psicrotróficos como proporção da contagem de mesófilos aumentou de 47 para 80% após 2 dias. Os autores ainda observaram uma maior concentração de ácidos graxos livres e menor pH no leite armazenado, resultado de sua maior ação enzimática e bacteriana quando comparado ao leite fresco. Já Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009) não encontraram correlação entre atividade proteolítica e a contagem de psicrotróficos no leite cru refrigerado de dois laticínios do estado do Rio Grande do Sul. Os autores sugerem que a proteólise está principalmente associada a linhagens específicas de bactérias psicrotróficas com elevada capacidade proteolítica.

Nörnberg et al. (2009) isolaram outras espécies de psicrotróficos com alta atividade proteolítica de leite cru de tanques e silos de armazenamento, tais como *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* e *Aeromonas* sp. As proteases destes micro-organismos mostraram-se bastante resistentes aos tratamentos térmicos de pasteurização e UHT e causaram a coagulação de leite UHT após 5 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Estes resultados mostram claramente o

potencial dos micro-organismos psicrotóxicos para deterioração da qualidade dos produtos lácteos fabricados a partir de leite cru de baixa qualidade.

3.2. Qualidade do leite esterilizado

Em 2007 o Brasil passou a ocupar a 6ª posição na classificação mundial dos principais países produtores de leite, com uma produção de 25,327 milhões de toneladas do produto. Deste total, cerca de 33% são processados como leite fluido – pasteurizado e UHT. As vendas de leite fluido aumentaram de 3,9 bilhões de litros em 1991, para 6,6 bilhões de litros em 2006. A participação no mercado do UHT passou, no mesmo período, de 5,2% para 75,8% do total de leite fluido (EMBRAPA, 2008). Isto indica a preferência do consumidor por este produto, provavelmente devido à facilidade de armazenamento e maior vida de prateleira quando comparado ao leite pasteurizado.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1997), entende-se por leite UHT (Ultra-Alta Temperatura, UAT) o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. O leite UHT integral deve apresentar no mínimo 3,0% de gordura e 8,2% de extrato seco desengordurado, acidez de 0,14 a 0,18 g ácido láctico/100 mL e ser estável ao etanol 68%. Como controle de esterilidade comercial o produto, após incubação a 35-37°C/7 dias, não deve sofrer modificações que alterem a embalagem, deve ser estável ao etanol 68%, a acidez não pode variar mais do que 0,02 g de ácido láctico/100 mL em relação à acidez inicial e não sofrer alterações sensoriais. O produto ainda pode ser adicionado dos estabilizantes citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio, separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1% p/p.

A qualidade do leite UHT e sua vida de prateleira estão diretamente relacionadas à qualidade do leite cru utilizado em sua fabricação. A ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas de psicotróficos no leite UHT causa defeitos sensoriais, como por exemplo, o gosto amargo produzido pela liberação de peptídeos hidrofóbicos e o sabor de ranço causado pelo aumento dos níveis de ácidos graxos livres de cadeia curta (DATTA et al., 2002). Considerando que o produto é comercialmente estéril, o principal problema que limita sua vida de prateleira é o fenômeno da gelificação, que causa o aumento da viscosidade durante o armazenamento e eventualmente a perda de fluidez, com a formação de um gel (DATTA; DEETH, 2001; DATTA et al., 2002; FOX; MCSWEENEY, 1998; MANZI; PIZZOFERRATO, 2006).

O leite possui mais de 60 enzimas nativas, das quais aproximadamente 20 já foram isoladas e caracterizadas. As enzimas nativas são aquelas sintetizadas pelas células secretoras ou derivadas do sangue e as de maior importância quando se refere à qualidade do leite cru são as enzimas proteolíticas e lipolíticas. Algumas das enzimas com atividade proteolítica são a plasmina, catalase, elastase, Catepsinas B, D e G, enquanto somente a lipase lipoproteica apresenta atividade lipolítica. Além das enzimas nativas, as produzidas por micro-organismos, no caso específico do leite cru refrigerado, por psicotróficos, também apresentam atividade proteolítica e lipolítica (KELLY; O'FLAHERTY; FOX, 2006; KELLY; FOX, 2006; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A plasmina é a principal protease nativa do leite e encontra-se associada às micelas de caseína e à membrana do glóbulo de gordura do leite. Ela está presente no leite cru tanto na forma ativa (plasmina) como na forma de seu precursor enzimaticamente inativo (plasminogênio). O leite cru tem aproximadamente 0,3 mg/L de plasmina e aproximadamente nove vezes mais de plasminogênio. A atividade de plasmina no leite é controlada por um sistema de ativadores e inibidores enzimáticos. Os ativadores de plasmina não são afetados pela pasteurização e são levemente inativados pelo processamento UHT. O tratamento térmico altera o balanço natural entre ativadores e inibidores,

favorecendo os ativadores, o que pode resultar no aumento da proteólise no leite (BASTIAN; BROWN, 1996; DATTA; DEETH, 2001; NIELSEN, 2002). Enright et al. (1999) atribuíram, em seu estudo, a formação de sedimentos no leite UHT desnatado à atividade de plasmina durante armazenamento do produto.

A plasmina hidrolisa principalmente a β -caseína, formando γ -caseína e proteose-peptona, enquanto as proteases de psicotróficos, da mesma forma que a quimosina, atacam predominantemente a κ -caseína na ligação 105-106, seguida por uma intensa hidrólise não específica. A β -caseína também é prontamente hidrolisada pelas enzimas produzidas por psicotróficos, enquanto a α_{s1} -caseína é lentamente hidrolisada (DATTA; DEETH, 2001; DATTA; DEETH, 2003; MANZI; PIZZOFERRATO, 2006; MUIR, 1996; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Recio et al. (2000) demonstraram que proteases de *Pseudomonas fluorescens* B52, embora menos específicas que a quimosina, hidrolisam a κ -caseína na ligação 105-106 e também nas ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. Além da ação direta das proteases de psicotróficos sobre a κ -caseína, elas também podem agir como ativadores de plasminogênio, convertendo plasminogênio em plasmina, acelerando o processo de gelificação do leite UHT (KOHLMANN; NIELSEN; LADISCH, 1991; FAJARDO-LIRA; NIELSEN, 1998; FAJARDO-LIRA et al., 2000).

Proteases produzidas por psicotróficos geralmente são extremamente estáveis aos tratamentos térmicos de pasteurização e UHT. Entretanto, a estabilidade térmica destas enzimas pode variar de uma cepa para outra. Dados compilados por Datta e Deeth (2001) mostram que cepas diferentes de *Pseudomonas fluorescens* apresentam atividades residuais distintas quando submetidas ao mesmo tratamento térmico. Por exemplo, após tratamento térmico de 135°C/2 s a cepa OM41 apresentou 95,8% de atividade residual, enquanto a cepa OM228 não apresentou atividade enzimática residual.

Quando ocorre gelificação no leite UHT, o gel formado é uma rede protéica tridimensional composta por cadeias ligadas de proteínas do soro e caseínas.

Durante o processamento UHT ocorre a desnaturação da β -lactoglobulina (β -Lg), que interage através de ligações dissulfeto (-S-S-) com as micelas de caseína, particularmente com a κ -caseína (κ -CN), formando o complexo β -Lg- κ -CN (MANZI; PIZZOFERRATO, 2006). Segundo McMahon (1996), a gelificação do leite UHT pode ser considerada como um processo de duas fases. Na primeira fase, sítios de ligação são formados pela liberação do complexo β -Lg- κ -CN das micelas de caseína. Esta liberação pode ser induzida por qualquer ação (enzimática ou não enzimática) que enfraqueça as ligações entre o complexo e a micela. A segunda fase consiste do acúmulo do complexo β -Lg- κ -CN na fase soro do leite. Quando a concentração de proteínas no soro alcança um nível crítico, ocorre a gelificação, sendo que as micelas que ainda não liberaram o complexo podem também ser incorporadas à rede do gel. Qualquer condição de processo ou armazenamento do leite UHT que acelere ou retarde a liberação do complexo β -Lg- κ -CN da micela de caseína poderá acelerar ou retardar a gelificação do produto (DATTA; DEETH, 2003). A liberação do complexo por ação enzimática pode ocorrer via plasmina ou via enzimas de bactérias psicotróficas. De modo geral, associa-se à plasmina a gelificação do leite UHT produzido com leite cru de boa qualidade, e às proteases de psicotróficos a gelificação do produto fabricado a partir de leite cru de baixa qualidade (FOX; MCSWEENEY, 1998).

A hidrólise das diferentes porções da caseína leva à formação de géis com características distintas. Datta e Deeth (2003) observaram a formação de um gel firme no leite UHT incubado a 40°C/3 horas com proteases de *Pseudomonas*, enquanto a amostra incubada com plasmina ficou apenas turva, indicando uma digestão parcial da caseína. Os autores sugeriram que o gel firme é similar ao formado pela ação da renina, que assim como as proteases de *Pseudomonas* hidrolisa preferencialmente o glicomacropéptido hidrofílico da κ -caseína na superfície da micela. Esta hidrólise libera as micelas de caseína praticamente intactas e reduz a repulsão estérica entre elas, permitindo a formação de um gel mais compacto. A plasmina hidrolisa a β -caseína, localizada no interior da micela, provocando sua desestabilização e inibindo a formação de um gel firme.

Estudo recente desenvolvido por Gaucher et al. (2008) classificou os peptídeos do leite UHT após seis meses de armazenamento, através de espectrometria de massa, em diferentes categorias, dependendo da potencial fonte causadora da proteólise. Foram identificados 42, 17, 36, 21 e 19 peptídeos resultantes da proteólise da caseína pela plasmina, Catepsina G, Catepsina B, elastase e Catepsina D, respectivamente. Os autores também identificaram duas ligações peptídicas que provavelmente foram hidrolisadas por proteases de *Pseudomonas fluorescens* B52, além de outros peptídeos derivados de proteólise não enzimática ou de origem desconhecida.

Os peptídeos produzidos pela ação da plasmina ou de proteases de psicotróficos também podem ser diferenciados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP) pela metodologia proposta por Datta e Deeth (2003) e Le, Datta e Deeth (2006). Segundo os autores, a análise é possível porque os peptídeos produzidos por ação das enzimas de psicotróficos são menores e menos hidrofóbicos, e, desta forma, eluem primeiro nos cromatogramas do que os peptídeos produzidos pela plasmina, que são maiores e mais hidrofóbicos. Segundo os autores, o método mostrou-se adequado para distinguir entre a proteólise do leite causada pela plasmina ou por proteases bacterianas.

O efeito da qualidade do leite cru sobre a proteólise do leite UHT durante 180 dias de armazenamento a 25°C foi investigado por Topçu, Numanoğlu e SaldamLı (2006). O leite UHT produzido com leite cru considerado de baixa qualidade pelos autores (contagem de células somáticas de 621.000 cél/mL, contagem padrão em placas de $2,2 \times 10^6$ ufc/mL e de psicotróficos de $4,8 \times 10^3$ ufc/mL) apresentou altos níveis de proteólise, o que levou à formação de gosto amargo, sedimentação e gelificação, reduzindo a vida de prateleira do produto. No estudo, a proteólise do leite foi atribuída tanto a proteases bacterianas quanto à plasmina.

Vidal-Martins et al. (2005) acompanharam a evolução do índice proteolítico e da viscosidade aparente durante 120 dias de vida de prateleira do leite UHT. A

contagem de psicotróficos no leite cru também foi avaliada, e alcançou níveis médios de $4,4 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^9$ ufc/mL dependendo do mês em que as amostras foram coletadas. Os autores observaram o aumento do índice proteolítico no decorrer do armazenamento e da viscosidade aparente após 60 dias de estocagem, que foram relacionados à presença de proteases produzidas por psicotróficos do leite cru. Datta e Deeth (2003) também observaram alta viscosidade em leites gelificados. Entretanto, não encontraram correlação entre viscosidade e proteólise dos leites avaliados. De acordo com os autores, a viscosidade é alta quando o leite está se aproximando do ponto de gelificação, mas decresce após a quebra do gel pela ação proteolítica. Em seguida, a proteólise continua progressivamente e a viscosidade do leite retorna a baixos níveis.

3.3. Utilização de dióxido de carbono (CO₂) em leite fluido

Considerando que apesar do desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos, o resfriamento é ainda a melhor forma de conservação do leite, pesquisas têm sido conduzidas visando minimizar o desenvolvimento dessa classe de micro-organismos e suas conseqüências para o leite e os produtos lácteos. Dentre estas, o uso do dióxido de carbono tem sido explorado e uma ampla revisão sobre sua aplicação para melhorar a qualidade do leite e de produtos lácteos foi publicada (HOTCHKISS; WERNER; LEE, 2006). Pesquisas têm mostrado que o CO₂, quando dissolvido em meio aquoso, pode retardar o desenvolvimento de psicotróficos (DANIELS; KRISHNAMURTHI; RIZVI, 1985; DIXON; KELL, 1989; ESPIE; MADDEN, 1997; KING; MABBITT, 1982; ROBERTS; TORREY, 1988).

Os mecanismos de inibição pelo qual o CO₂ afeta o desenvolvimento e o metabolismo microbiano ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto, modos de ação foram propostos e resumidos por Loss e Hotchkiss (2000) e Hotchkiss, Werner e Lee (2006), e incluem: **1)** substituição do O₂ pelo CO₂,

desfavorecendo o crescimento de micro-organismos aeróbicos; **2)** diminuição do pH do meio devido à dissolução do CO₂ e formação de ácido carbônico na fase aquosa do alimento; **3)** efeito direto sobre o metabolismo dos micro-organismos. Como o CO₂ é solúvel em lipídios, ele se dissolverá na camada lipídica da membrana celular, passando através dela e se concentrando no citoplasma, o que causa a diminuição do pH intracelular e o *stress* da célula. O CO₂ também pode interferir diretamente nos processos enzimáticos dentro da célula, como a expressão dos genes.

Embora os mecanismos de inibição bacteriana pelo CO₂ não tenham sido elucidados, o resultado de sua ação é o prolongamento da fase lag e o aumento do tempo de geração dos micro-organismos, o que resulta numa menor velocidade de desenvolvimento, estendendo a vida de prateleira dos produtos aos quais foi adicionado (ESPIE; MADDEN, 1997; HOTCHKISS; CHEN; LAWLESS, 1999; KING; MABBITT, 1982; MA; BARBANO; SANTOS, 2003; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003; RASHED; MEHANNA; MEHANNA, 1986; ROBERTS; TORREY, 1988).

King e Mabbitt (1982) observaram que a adição de 1300 ppm de CO₂ ao leite cru armazenado a 10°C reduziu a taxa de crescimento de psicotróficos e aumentou em 2,5 dias a vida de prateleira do produto. Resultados semelhantes foram obtidos por Roberts e Torrey (1988) em leite cru armazenado a 7°C por 6 dias. Trabalhando com concentrações de CO₂ mais elevadas (~3000 ppm) Rashed, Mehanna e Mehanna (1986) observaram menores taxas de crescimento de psicotróficos, bactérias lácticas e coliformes no leite armazenado a 7°C por 3 dias, quando comparado ao leite não tratado.

Martin, Werner e Hotchkiss (2003) examinaram os efeitos de diferentes concentrações de CO₂ (30, 680, 1200, 1700 ppm) sobre o desenvolvimento microbiano em leite cru armazenado a 15°C. O dióxido de carbono influenciou as fases lag, log e estacionária e os resultados indicaram que o efeito inibitório provavelmente seria maior em temperaturas de armazenamento mais baixas.

O efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre a vida de prateleira do leite pasteurizado foi estudado por Ruas-Madiedo et al. (1998). O leite cru foi adicionado de CO₂ até pH 6,2, armazenado a 4°C durante 4 dias, degaseificado à vácuo, pasteurizado (72°C/15 s) e armazenado a 4°C por 7 dias. Segundo os autores, após a pasteurização, o leite tratado com CO₂ apresentou maior vida de prateleira, possivelmente devido à presença de CO₂ residual não removido pela degaseificação seguida da pasteurização.

Outros estudos têm mostrado o efeito da adição de CO₂ sobre as características físico-químicas do leite. Ma et al. (2001) avaliaram o impacto da adição de CO₂ sobre os resultados de análises como pH, teste de antibióticos, fosfatase alcalina e composição por infravermelho. Os autores observaram a diminuição do ponto de congelamento e do pH com o aumento da concentração de CO₂. Entretanto, essas alterações foram reversíveis após a degaseificação do leite. Os testes de antibióticos, composição por infravermelho e fosfatase alcalina não foram influenciados pela adição de CO₂. Outros componentes do leite, como caseínas, proteínas do soro, monossacarídeos livres, ácidos orgânicos e vitaminas lipossolúveis também não foram afetados pelo tratamento do leite com CO₂ (RUAS-MADIEDO et al., 1996; RUAS-MADIEDO et al., 1998; RUAS-MADIEDO et al., 2000).

A inibição de desenvolvimento de psicotróficos resulta na menor produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e, conseqüentemente, em menor lipólise e proteólise, conforme demonstrado por Ma, Barbano e Santos (2003). Estes autores observaram que a adição de 1500 ppm de CO₂ retardou o crescimento de micro-organismos psicotróficos e diminuiu a proteólise e lipólise do leite cru armazenado por 21 dias a 4°C.

Em resumo, as pesquisas mostram que a adição de CO₂ ao leite cru refrigerado reduz o desenvolvimento microbiano e prolonga sua vida de prateleira. Como conseqüência da redução do desenvolvimento microbiano e da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, pode-se evitar defeitos de qualidade nos produtos processados. Os efeitos da adição de CO₂ sobre o leite cru e

pasteurizado são descritos na literatura científica. Entretanto, não foram encontradas na literatura pesquisas relacionando a conservação do leite cru através da adição de CO₂ sobre a qualidade e vida de prateleira do leite UHT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

O leite utilizado em todos os experimentos foi proveniente do Laticínio Ati Latte situado em Itatiba/SP. Após a ordenha, o leite foi resfriado em trocador de calor de placas ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) e imediatamente transportado em latões, devidamente higienizados, para a planta de processamento de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP. O tempo de transporte foi, em média, 40 minutos.

4.2. Efeito da concentração de CO₂ sobre a qualidade do leite cru

4.2.1. Processamento

Os ensaios foram realizados em escala laboratorial utilizando-se leite cru integral e o fluxograma geral do experimento é apresentado na Figura 1.

Imediatamente após a recepção, o leite cru (30 litros) foi dividido em duas porções, acondicionadas em cubas de inox: leite controle (sem adição de CO₂) e leite cru adicionado de CO₂ (leite cru_{CO2}). A adição de CO₂ foi realizada a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ até pH $6,20\pm 0,05$ utilizando-se um tubo de PVC perfurado devidamente higienizado acoplado num cilindro de CO₂ (Figura 2).

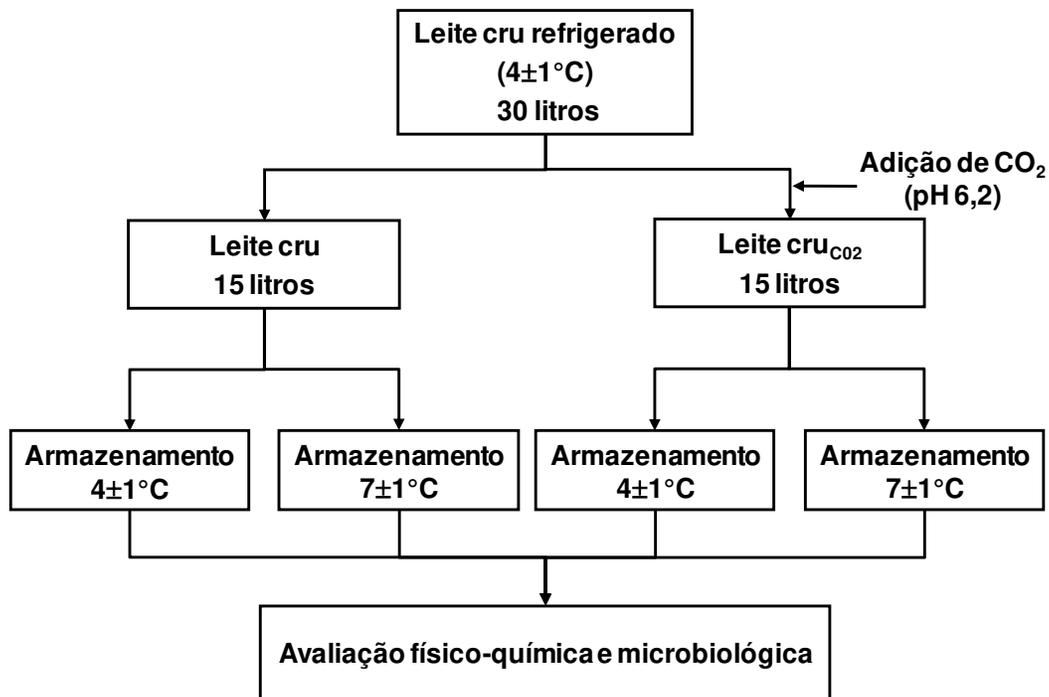


Figura 1. Fluxograma geral do experimento.

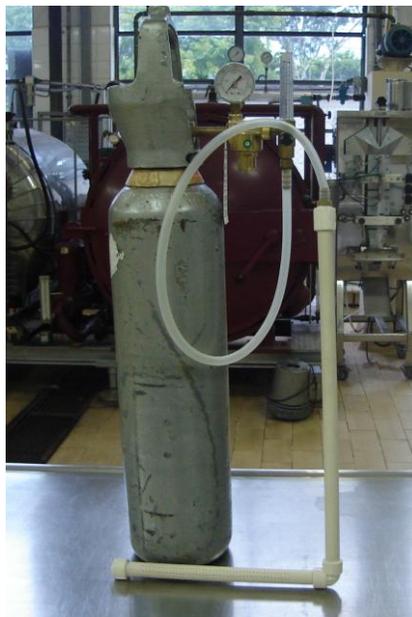


Figura 2. Cilindro de CO₂ com tubo de PVC perfurado acoplado utilizado na carbonatação do leite.

As amostras controle e adicionada de CO₂, foram acondicionadas em garrafas de vidro de 300 mL higienizadas e esterilizadas em autoclave (121°C/15 min) e fechadas hermeticamente com tampas metálicas. Em seguida, foram subdivididas e armazenadas em BOD a 4±1°C ou 7±1°C. As condições de temperatura de armazenamento escolhidas levaram em consideração a temperatura máxima para conservação do leite cru na propriedade rural (7°C) segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002) e a temperatura reconhecidamente aceita como adequada para conservação do leite cru (≤ 4°C). O fim da vida de prateleira do leite foi definido com base no limite de contagem padrão em placas estabelecido na IN nº 51 (BRASIL, 2002) para leite cru refrigerado, que é 7,5x10⁵ ufc/mL.

4.2.2. Procedimento de amostragem e análises realizadas

Imediatamente após a recepção do latão, o leite cru foi submetido à agitação utilizando-se misturador perfurado de aço inox devidamente higienizado e as amostras coletadas foram colocadas em frascos estéreis, destinados à realização das análises microbiológicas, e frascos higienizados, para as análises físico-químicas.

O leite cru foi analisado quanto ao pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, lactose, cinzas, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não protéico (NNP) e conteúdo de ácidos graxos livres (AGL). Após a injeção de CO₂ o leite foi avaliado quanto à concentração de CO₂.

Para caracterização microbiológica o leite cru foi avaliado quanto à contagem padrão em placas, contagem de micro-organismos psicrótrópicos e de *Pseudomonas* spp.

Durante o armazenamento refrigerado amostras foram aleatoriamente escolhidas e avaliadas a cada dois dias quanto ao pH, acidez, nitrogênio total, nitrogênio não caseico, nitrogênio não protéico, conteúdo de ácidos graxos livres e

concentração de CO₂. Diariamente, o leite cru foi avaliado pelas mesmas análises microbiológicas utilizadas para sua caracterização. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, com exceção da concentração de CO₂ e do conteúdo de ácidos graxos livres que foram feitos em duplicata. As avaliações microbiológicas também foram realizadas em duplicata.

4.2.3. Determinações físico-químicas

Todas as avaliações físico-químicas foram realizadas utilizando-se metodologias oficiais da AOAC (1995), com exceção da gordura que foi realizada de acordo com LANARA (1981). O pH foi determinado utilizando-se potenciômetro calibrado e o eletrodo foi introduzido diretamente nas amostras. A acidez foi determinada por titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic) e solução alcoólica de fenolftaleína como indicador. Sólidos totais foram determinados por secagem em estufa a 105°C e o teor gordura utilizando-se o Método de Gerber.

As frações protéicas foram determinadas pelo método de Kjeldahl, o qual se baseia na determinação do nitrogênio após digestão a quente da proteína e compostos nitrogenados em presença de H₂SO₄ concentrado, com produção de sulfato de amônio, que, em presença de solução de hidróxido de sódio, libera NH₃ que é recebido na solução de ácido bórico. A amônia na solução de ácido bórico é titulada com solução de HCl com normalidade conhecida e assim determina-se o teor de nitrogênio na amostra. O nitrogênio não protéico (NNP) foi avaliado a partir do filtrado após precipitação do leite pela adição de ácido tricloroacético (TCA 24%). O nitrogênio não caseico (NNC) foi avaliado a partir do filtrado após precipitação do leite ao ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6).

Todos os resultados de nitrogênio foram expressos como proteína usando o fator de conversão de 6,38. A proteína (P) e caseína (CN) foram calculadas por (NT-NNP) x 6,38 e (NT-NNC) x 6,38, respectivamente, onde NT é o conteúdo de

nitrogênio total do leite. No caso do leite cru, o decréscimo da relação (CN/P) x 100 foi utilizado como índice de proteólise.

A concentração de CO₂ foi determinada utilizando-se analisador de CO₂ MOCON Pac Check 650 (MOCON, Mineapolis, USA) conforme descrito por Ma et al. (2001). O equipamento é ilustrado na Figura 3. O equipamento determina a porcentagem de CO₂ dissolvido no leite e liberado para o espaço livre do frasco selado após tratamento com H₂SO₄ 1N. Para estabelecer uma curva padrão, oito frascos de vidro foram preparados, cada um com 25 mL de leite cru não adicionado de CO₂ (4°C). A cada frasco foram adicionados água (pH corrigido para 8,0 com NaOH 1N) e uma solução de NaHCO₃ 0,057M em diferentes proporções para se conseguir concentrações de CO₂ equivalentes a 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 ppm. O ponto zero da curva corresponde ao leite cru sem adição de CO₂. Cada frasco foi imediatamente selado com tampa de borracha e o CO₂ do espaço livre foi medido após a adição do ácido sulfúrico. Assim foi possível fazer a conversão da concentração de CO₂ dissolvido (como %CO₂) para ppm de CO₂. Para cada experimento foi construída uma curva padrão que foi utilizada para conversão dos valores durante todo o período de análises. Um exemplo de curva de calibração é apresentado na Figura 4.



Figura 3. Analisador de CO₂ MOCON Pac Check 650.

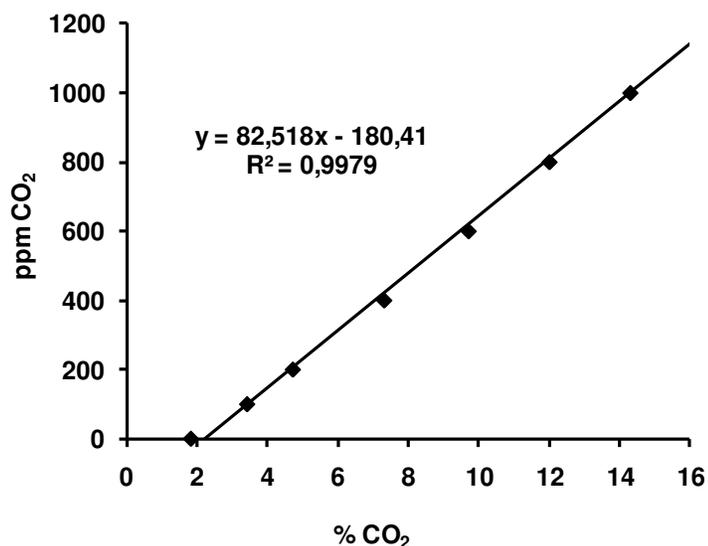


Figura 4. Exemplo de curva padrão obtida para conversão dos valores de concentração de CO₂ de porcentagem (%) para ppm.

O conteúdo de ácidos graxos livres foi determinado pelo método de sabão de cobre descrito por Shipe, Senyk e Fountain (1980) e modificado por Ma, Barbano e Santos (2003). Uma alíquota de 1 mL de leite foi pesada em tubos de centrífuga (Nalgene Oak Ridge Teflon FEP, 50 mL) contendo 0,2 mL de HCl 0,7N, agitada em vortex e armazenados sob refrigeração até o dia seguinte. No segundo dia de análise, adicionou-se aos tubos, a temperatura ambiente, 0,2 mL de solução de Triton –X 1% para prevenir a formação de emulsão durante a etapa de agitação. Em seguida adicionou-se 4 mL do reagente cobre (trietanolamina e nitrato de cobre pH 8,3), seguido de nova agitação em vortex. Após esta etapa, 12 mL do solvente CHM (clorofórmio:heptano:metanol, 49:49:2) foram adicionados aos tubos, que foram agitados na posição horizontal em mesa agitadora por 30 min a 350 rpm. As amostras foram então centrifugadas a 5000 rpm/10 min. Uma alíquota do sobrenadante (3,5 mL) foi adicionada a um tubo contendo 0,1 mL de reativo de cor (solução de álcool n-butílico e dietilditiocarbamato de sódio) seguido da leitura da absorbância a 440 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Photonics, Modelo SP-2000UV, USA) utilizando cubeta de vidro de 1 cm.

A massa de ácidos graxos livres (AGL) foi calculada usando-se a equação da reta da curva de calibração que utiliza ácido palmítico como padrão. O resultado final foi expresso em unidades de meq de AGL/ kg de leite e foi calculado como: $AGL_{(meq/kg, \text{ expresso } \acute{a}c. \text{ palmítico})} = [(\mu\text{g AGL}_{\text{amostra}} \times 0,001)/256,43]/(g_{\text{amostra}} \times 0,001)$. A curva padrão foi construída a partir de cinco concentrações de ácido palmítico: 60, 120, 180, 240 e 300 μg de ácido palmítico/g de hexano. A cada tubo foi adicionado 1 mL da solução padrão. Após evaporação do solvente a temperatura ambiente, 0,2 mL de HCl 0,7N e 1 mL de água mili-Q foram adicionados a cada tubo. Em seguida as amostras foram tratadas como descrito para o leite. O aumento da concentração de ácidos graxos livres foi usado como índice de lipólise. Um exemplo de curva padrão é apresentado na Figura 5.

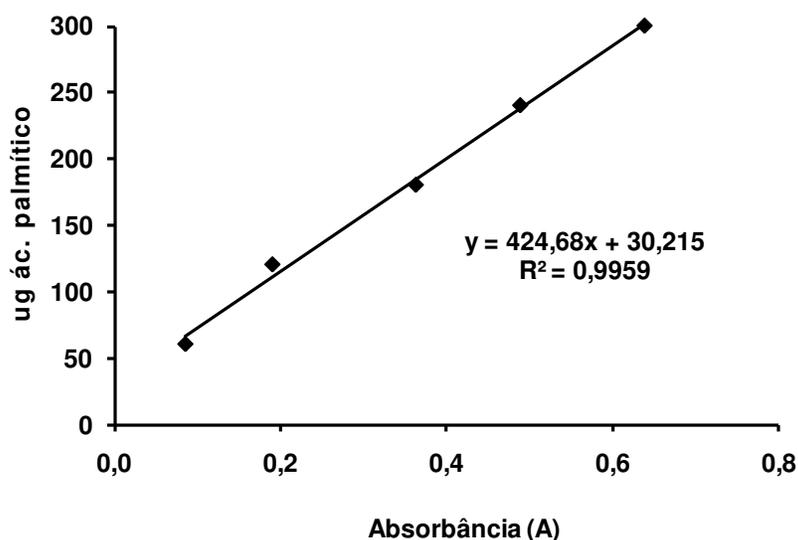


Figura 5. Exemplo de curva padrão obtida para cálculo da massa de ácidos graxos livres no leite.

4.2.4. Determinações microbiológicas

Para as análises microbiológicas do leite cru, uma alíquota de 10 mL do leite foi transferida para um frasco contendo 90 mL de solução de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir desta, foram feitas as diluições subsequentes necessárias à realização das análises.

As contagens padrão em placas e de psicotróficos foram realizadas segundo metodologia da APHA (1992). A contagem de *Pseudomonas* spp. foi feita conforme descrito por Hayes e Nielsen (2000). As diluições foram feitas de acordo com o tempo de armazenamento das amostras, estimando-se a contagem de micro-organismos presentes no leite. A contagem padrão em placas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA), incubando as placas a 35°C/48 horas. Para a contagem de psicotróficos utilizou-se ágar padrão (PCA), plaqueamento em superfície e incubação a 7°C/10 dias. A mesma técnica foi utilizada para a contagem de *Pseudomonas* spp., em ágar isolamento de *Pseudomonas* (PIA), incubando-se as placas a 30°C/24 horas.

4.2.5. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de sub-sub-parcelas divididas (*split-split-plot*) e o experimento completo foi repetido 2 vezes. O fator principal foi a adição de CO₂ com dois níveis de variação (com e sem CO₂); o fator secundário foi a temperatura de armazenamento com dois níveis de variação (4±1 e 7±1°C) e o terceiro fator foi o tempo de armazenamento do leite cujos níveis de variação foram dependentes da vida de prateleira do produto, ou seja, do tempo que as amostras levaram para atingir a contagem padrão em placas de $7,5 \times 10^5$ ufc/mL. O efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento microbiano, a proteólise e lipólise foi avaliado por análise de variância multivariada e pelo teste de comparação entre médias de Tukey. A regressão linear foi utilizada para correlacionar o efeito da

adição de CO₂ e o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos com a proteólise e lipólise no leite cru. Foi considerado o nível de significância de 5%.

O desenvolvimento dos micro-organismos foi avaliado utilizando-se o modelo matemático de Gompertz descrito na Equação 1, segundo Martin, Werner e Hotchkiss (2003). Os parâmetros avaliados foram tempo da fase lag, taxa de crescimento e tempo de geração.

$$Y(t) = Y_0 + a_1 \cdot e^{\{-e^{[-a_2 \cdot (t-\tau)]}\}} \quad (1)$$

Onde,

$Y(t)$ = log da contagem de micro-organismos no tempo t ;

Y_0 = log da contagem de micro-organismos no tempo zero;

t = tempo (dias);

a_1 , a_2 e τ = parâmetros do modelo de Gompertz.

A partir dos parâmetros a_1 , a_2 e τ calculou-se o tempo da fase lag, a taxa de crescimento e o tempo de geração conforme as Equações 2, 3 e 4.

$$\text{Tempo de fase lag (dias)} = t_1 - (1 - a_2) \quad (2)$$

$$\text{Taxa de crescimento (ufc / ml / tempo)} = a_1 \cdot a_2 / e \quad (3)$$

$$\text{Tempo de geração (dias)} = \ln(2) \cdot e / a_1 \cdot a_2 \quad (4)$$

4.3. Efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre a qualidade do leite UHT

4.3.1. Processamento

Após ordenha, refrigeração e transporte para a FEA/UNICAMP, o leite cru (~200 litros) refrigerado (4±1°C) foi dividido em duas porções que foram

armazenadas em tanque de expansão (Etscheid Techno SA, Modelo KW 250-2, Pirajuí, SP) com capacidade de 250 litros dotado de agitação e controle automático de temperatura (Figura 6). Os tanques foram programados para ter o menor tempo de agitação possível a fim de minimizar a perda do CO₂ injetado ao leite. A agitação foi programada para acontecer a cada 16 horas durante 3 minutos. Além disso, aproximadamente a cada 3 horas, quando o leite atingia a temperatura de 5°C, o tanque ligava automaticamente a agitação e o resfriamento até que a temperatura retornasse a 4°C. Este processo levava ~5 minutos. Em um tanque foi mantido o leite cru sem adição de CO₂ (4±1°C) e o leite do segundo tanque foi adicionado de CO₂. A adição de CO₂ foi realizada a 4±1°C até pH 6,20±0,05 utilizando-se um tubo de PVC perfurado devidamente higienizado (Figura 2). O leite controle e o adicionado de CO₂ foram mantidos refrigerados a 4°C por 6 dias antes do processamento UHT, conforme condições estabelecidas na primeira fase do trabalho.



Figura 6. Tanques de expansão utilizados para o armazenamento do leite cru.

Após o período de armazenamento refrigerado, os leites foram aquecidos, sob agitação, em tanque pasteurizador até 80°C e imediatamente resfriados a 4°C, para eliminação do CO₂ e conseqüente recomposição do pH. Em seguida, foram acondicionados em latões higienizados e encaminhados para a planta de processamento UHT. Antes do processamento o leite foi adicionado de citrato de sódio (0,1%) para prevenir a desestabilização das proteínas durante o tratamento térmico.

Os leites foram processados na Planta Piloto de Sistemas de Embalagem, instalada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP. A linha de processamento e embalagem era composta pelos seguintes equipamentos: tanques de matéria-prima; homogeneizador de pistão com dois estágios (Alitec Comércio e Indústria Ltda., Pindamonhangaba, SP), trocador de calor de placas (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas, SP); tanque de produto e máquina de embalagem tipo forma, enche e fecha (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas, SP). Os acessórios de controle do trocador de calor são: termômetro (termorresistor tipo PT100) conectado ao painel de controle digital e localizado após o tubo de retenção; válvula de desvio de fluxo do tipo pneumática, controlada automaticamente através do painel de controle; anel restritor posicionado na saída da seção de resfriamento de leite retornado e válvula agulha localizada na saída da seção de resfriamento. A configuração da linha é apresentada nas Figuras 7 e 8.

A máquina de embalagem realizava a filtração de ar, a esterilização do filme plástico e a termossoldagem para produção das embalagens. A esterilização das embalagens foi efetuada por imersão em solução de peróxido de hidrogênio 35% a 35±2°C por 13 s e exposição à radiação ultravioleta de 260 µW/cm² em 254 nm por pelo menos 1,0 s, emitida por lâmpada TUV 15W T5 instalada a 10 mm do filme. Essa operação era realizada na parte traseira da máquina de embalagem, contendo a bobina plástica, o tanque de imersão e os roletes guias do filme.



Figura 7. Linha de processamento UHT e embalagem asséptica com o tanque de produto e acessórios para o envase. 1) tanques de matéria-prima; 2) trocador de calor; 3) tanque de produto; 4) máquina de embalagem asséptica.



Figura 8. Detalhe da linha de processamento UHT mostrando: 1) tanques de matéria-prima; 2) trocador de calor; 3) homogeneizador.

Para o processamento UHT, o leite resfriado ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) era bombeado passando inicialmente pela seção de aquecimento do trocador até atingir a temperatura de $68\text{-}72^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, era homogeneizado (210 kgf/cm^2 no primeiro estágio e 40 kgf/cm^2 no segundo estágio). O tratamento térmico foi realizado a $140^{\circ}\text{C}/5\text{ s}$ e o leite foi então resfriado a temperaturas entre 14 e 20°C . As amostras foram envasadas assepticamente em sacos de polietileno de baixa densidade pigmentados de branco com dióxido de titânio 1,5% (PEBD) e armazenadas ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. A vazão da linha de processamento foi de 260 litros/h. O fluxograma geral de armazenamento do leite cru e processamento UHT é apresentado na Figura 9.

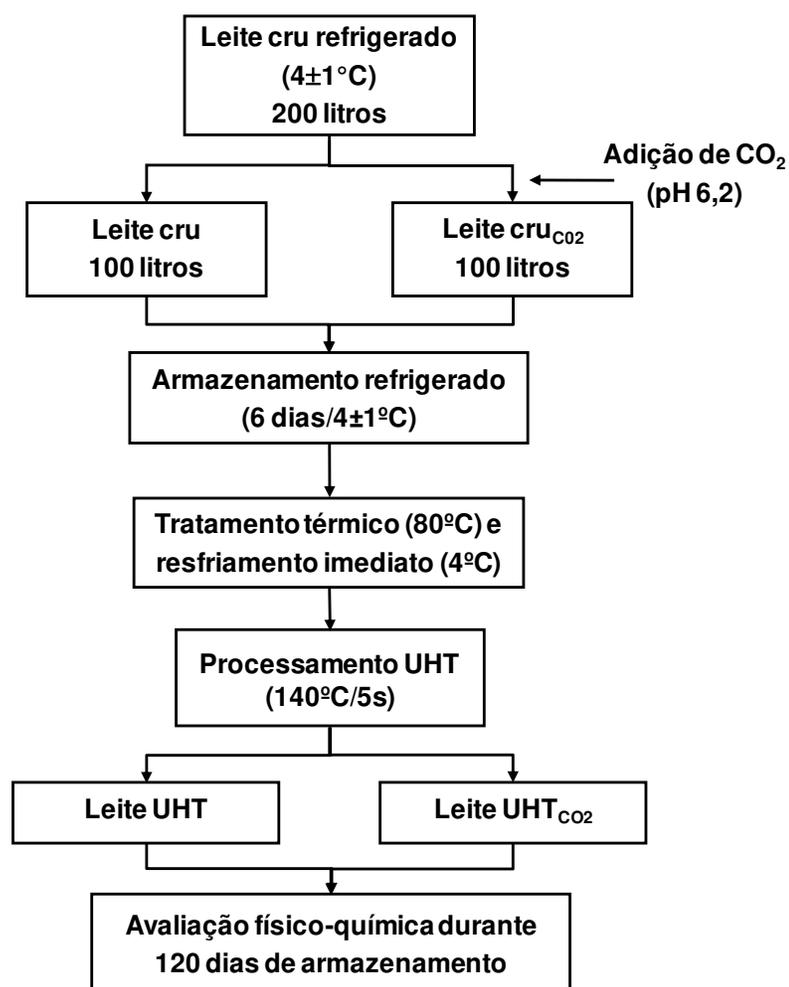


Figura 9. Fluxograma geral de armazenamento do leite cru e processamento do leite UHT.

4.3.2. Procedimento de amostragem e análises realizadas

Após a recepção, o leite foi misturado para a coleta de amostras representativas do lote para avaliação microbiológica e físico-química. As amostras foram coletadas como já descrito anteriormente (Item 4.2.2). O leite cru foi avaliado quanto à presença de resíduos de antibióticos, contagem de células somáticas (CCS), pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, lactose, cinzas, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não proteico (NNP), conteúdo de ácidos graxos livres (AGL), frações individuais de caseína e padrão de peptídeos por HPLC-RP. O leite cru foi também avaliado quanto à contagem padrão em placas, contagem de psicrotróficos e de *Pseudomonas* spp., contagem de micro-organismos termodúricos mesófilos e psicrotróficos e contagem de esporos mesófilos e psicrotróficos. Para avaliação da contagem de células somáticas, amostras de leite cru foram coletadas em frascos contendo bronopol para sua conservação e encaminhadas à temperatura ambiente para a Clínica do Leite (ESALQ-USP, Piracicaba/SP).

O tanque contendo o leite controle foi mantido fechado durante os 6 dias de armazenamento refrigerado. O tanque contendo o leite adicionado de CO₂ foi monitorado diariamente quanto ao pH e concentração de CO₂. Quando o pH encontrava-se acima de 6,20±0,05, CO₂ era borbulhado ao leite até que o pH retornasse ao valor inicial. Após a reposição, o pH e a concentração de CO₂ eram novamente avaliados.

Após 6 dias de armazenamento, amostras de cada tanque foram coletadas para realização das mesmas determinações físico-químicas realizadas para o leite cru, exceto contagem de células somáticas, gordura, extrato seco total, lactose e cinzas. As avaliações microbiológicas foram as mesmas realizadas para o leite cru.

No dia seguinte ao processamento (dia 1) foi realizada a caracterização dos leites UHT produzidos a partir do leite cru adicionado ou não de CO₂. As amostras foram avaliadas quanto ao pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, lactose,

nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não proteico (NNP), conteúdo de ácidos graxos livres (AGL). Foi realizada também a avaliação da esterilidade comercial dos lotes.

Durante o armazenamento à temperatura ambiente, amostras de cada lote foram aleatoriamente escolhidas e avaliadas quinzenalmente, durante 120 dias, quanto às mesmas características físico-químicas analisadas para caracterização do leite UHT, exceto gordura, extrato seco total e lactose. A avaliação das frações individuais de caseína por HPLC-RP foi realizada após 1 e 120 dias de armazenamento, enquanto o padrão de peptídeos, também por HPLC-RP, foi avaliado após 1, 60 e 120 dias de armazenamento das amostras.

As análises de pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, lactose, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não proteico (NNP) foram realizadas em triplicata. Concentração de CO₂, conteúdo de ácidos graxos livres, frações individuais de caseína e padrão de peptídeos por HPLC-RP foram feitos em duplicata. Todas as avaliações microbiológicas foram realizadas em duplicata.

4.3.3. Determinações físico-químicas

As determinações de pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC) e nitrogênio não proteico (NNP) foram realizadas segundo metodologias descritas anteriormente (Item 4.2.3). A porcentagem de lactose foi calculada pela diferença entre os sólidos totais e os demais sólidos do leite. O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C, segundo AOAC (1995).

A proteólise do leite UHT durante a estocagem foi avaliada através do conteúdo de nitrogênio total (NT), nitrogênio não protéico (NNP) e nitrogênio não caseico (NNC) utilizando-se o método de Kjeldahl, como descrito anteriormente (Item 4.2.3). Durante o tratamento UHT (140°C/5s), ocorrem diversas interações

protéicas e as frações nitrogenadas solúveis em TCA 24% e em pH 4,6 não representam o nitrogênio não protéico (NNP) e nitrogênio não caseico (NNC) do leite, respectivamente. Entretanto, as nomenclaturas NNP e NNC foram mantidas e utilizadas para expressar a proteólise neste trabalho, ambas como porcentagem do nitrogênio total (NT). Assim, o aumento das relações $(\text{NNP}/\text{NT}) \times 100$ e $(\text{NNC}/\text{NT}) \times 100$ foram utilizados como índices de proteólise.

O grau de proteólise das frações individuais de caseína do leite foi determinado por cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP), de acordo com Bobe et al. (1998). Para tanto, alíquotas de 500 μL de leite foram congeladas a -20°C para posterior análise. No dia da análise uma solução contendo 0,1 M de Tampão Bis Tris (pH 6,8), 6 M de cloridrato de guanidina, 5,37mM citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotreitol (pH 7) foi adicionada diretamente às amostras congeladas numa proporção de 1:1 (v:v) a temperatura ambiente. Após o descongelamento, cada amostra foi agitada por 10 segundos, incubada por 1 hora a temperatura ambiente e então centrifugada a 16.000xg por 5 min. A camada de gordura foi retirada com uma espátula e a solução restante foi diluída 1:3 (v:v) com uma solução de 4,5 M de cloridrato de guanidina e solvente A (acetonitrila:água:ácido trifluoracético, 100:900:1, pH 2).

Para identificação das frações protéicas do leite, padrões de α_s -caseína (70% de pureza, Sigma, USA), β -caseína (90% de pureza, Sigma, USA), κ -caseína (80% de pureza, Sigma, USA), α -lactoalbumina (85% de pureza, Sigma, USA) e β -lactoglobulina (90% de pureza, Sigma, USA) foram preparados nas seguintes concentrações: 4,0 mg/mL de α_s -CN; 3,0 mg/mL de β -CN; 1,5 mg/mL de κ -CN; 0,5 mg/mL de α -La e 1,0 mg/mL de β -Lg (Bobe et al., 1998). Os padrões foram preparados de uma só vez e congelados em alíquotas a -20°C . As alíquotas de padrão foram tratadas da mesma forma que as amostras de leite.

A separação e identificação das frações protéicas foram conduzidas em cromatógrafo Shimadzu Class VP equipado com detector de luz UV. Utilizou-se coluna Gemini C₁₈ (5 μm , 250 x 4,6 mm, Phenomenex, USA) precedida por pré-coluna Gemini (5 μm , 4,0 x 3,0 mm, Phenomenex, USA). As amostras preparadas

foram filtradas através de membrana de PTFE 0,45 µm (Milipore, USA), sendo que 20 µL da solução foram injetados no sistema HPLC. A separação por cromatografia foi realizada em temperatura ambiente e as fases móveis foram: Solvente A, (acetonitrila:água:ácido trifluoracético, 100:900:1) e Solvente B (acetonitrila:água:ácido trifluoracético, 900:100:1). O gradiente de solventes foi iniciado com 27% do solvente B, aumentando-se gradativamente a proporção do solvente B imediatamente após a injeção da amostra para 32% (2 min), 48% (37 min), 50% (41 min), retornando para as condições iniciais após 2 min (27%) e mantendo-se essa condição até 50 min para estabilização da coluna antes de uma nova injeção. O fluxo utilizado foi de 1,2 mL/min e a detecção foi realizada a 220 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A avaliação do padrão de peptídeos por HPLC-RP foi realizada para a identificação da proteólise causada por plasmina ou por enzimas de psicotróficos pela análise dos peptídeos liberados na quebra das caseínas, segundo metodologia descrita por Datta e Deeth (2003). Os extratos solúveis em TCA 12% foram preparados pela adição de TCA 24% em igual volume de leite seguido de agitação e incubação por 1 hora a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 24.000 g por 15 min e o sobrenadante filtrado em papel filtro Whatman 41. A fração solúvel em pH 4,6 foi preparada pelo ajuste do pH do leite até 4,6 com ácido acético 10%, seguido de agitação e incubação por 1 hora a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada e processada da mesma forma descrita para os filtrados de TCA 12%.

A análise de HPLC foi realizada em cromatógrafo Shimadzu Class VP descrito anteriormente, usando uma coluna X-Terra MS C₁₈ (5 µm, 150 x 2,1 mm, Waters, USA) a 40°C, fluxo de 0,9 mL/min e detecção a 210 nm. O solvente A foi 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água e o solvente B foi 0,1% de TFA em acetonitrila grau HPLC. O gradiente de solventes foi iniciado com 20% do solvente B. A proporção do solvente B aumentou de 20 para 35% durante os primeiros 20 min e depois de 5 min aumentou para 65% em 20 min e finalmente para 100% em

5 min, retornando à condição inicial após 10 minutos. O volume de amostra injetado foi de 50 µL. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.3.4. Determinações microbiológicas

A contagem padrão em placas, de psicotróficos e de *Pseudomonas* spp. foram determinadas segundo as metodologias citadas para avaliação do leite cru (Item 4.2.4). A contagem de micro-organismos termodúricos mesófilos e psicotróficos e de esporos mesófilos e psicotróficos foi realizada conforme metodologia da APHA (1992). Para avaliação dos micro-organismos termodúricos e dos esporos, as amostras de leite, coletadas em tubos estéreis, passaram por tratamento térmico a 62,8°C/5 minutos, e a 80°C/12 minutos, respectivamente, seguido de resfriamento imediato em banho de gelo. As contagens de micro-organismos termodúricos e esporos mesófilos foram realizadas pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA) incubando as placas a 35°C/48 horas. As contagens de micro-organismos termodúricos e esporos psicotróficos foram feitas pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando ágar padrão (PCA) seguido de incubação a 7°C/10 dias.

A contagem de células somáticas do leite cru foi determinada por espectrofotometria infravermelha usando contador eletrônico de células somáticas Bentley Somacount 500 (Bentley Instruments Inc. Chasca, MN, USA), na Clínica do Leite (ESALQ-USP). A presença de antibióticos foi avaliada utilizando o kit Delvotest (DSM Food Specialities Dairy Ingredients, Holanda). O teste qualitativo fundamenta-se no desenvolvimento de esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* em pré-inoculados em ágar, utilizando púrpura de bromocresol como indicador. Na ausência de antibiótico o microrganismo inoculado no ágar se desenvolve produzindo ácido e, conseqüentemente, alterando a cor do meio de roxo para amarelo. Na presença do antibiótico (teste positivo), o desenvolvimento do microrganismo é inibido, não ocorrendo a produção do ácido e alteração da cor do meio.

4.3.5. Avaliação da esterilidade comercial

Para avaliação da esterilidade comercial, amostras de cada lote de leite processado foram incubadas a 35-37°C durante 7 dias. Decorrido esse período, as amostras foram avaliadas quanto à contagem padrão em placas, estabilidade ao álcool 68% e acidez. Para atender ao padrão da legislação brasileira, o produto deveria apresentar ausência de micro-organismos mesófilos, estabilidade ao etanol 68%, não apresentar variação de acidez acima de 0,02 g de láctico/100 mL em relação à amostra antes da incubação e nem modificações que alterem a embalagem (BRASIL, 1997).

4.3.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas (*Split-plot*) em blocos com três repetições. O bloco foi o leite utilizado em cada um dos três processamentos. As parcelas foram os tratamentos aplicados (2 níveis de variação) e a sub-parcela foi o tempo de armazenamento (9 níveis de variação), que correspondem à avaliação no dia seguinte aos processamentos (tempo zero) e quinzenalmente durante 120 dias. O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento, bem como da interação destes fatores sobre as características físico-químicas do leite UHT foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da concentração de CO₂ e da temperatura de armazenamento sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru

5.1.1. Caracterização do leite cru

O leite cru utilizado nos processamentos apresentou composição típica (Tabela 1) e tanto os requisitos físico-químicos como microbiológicos atenderam aos padrões estabelecidos pela IN nº 51 (BRASIL, 2002) que são: acidez 0,14-0,18% de ácido láctico, mínimo de 3,0% de gordura, 2,9% de proteína e 8,4% de extrato seco desengordurado e contagem padrão em placas menor que $7,5 \times 10^5$ ufc/mL. Essas características indicam que a matéria prima foi higienicamente obtida e adequadamente conservada até o início dos experimentos. O teor de gordura do leite foi relativamente alto para os padrões brasileiros, o que implicou em um valor de extrato seco desengordurado (ESD) ligeiramente menor (8,34%) que o padrão estabelecido na legislação (8,4%).

O leite tratado com CO₂ apresentou concentração média de 1194 ± 153 ppm. Esta concentração apresentou pequenas variações durante todo o experimento (Figura 10). Ao final do experimento, as concentrações de CO₂ foram de 1153 ± 137 e 1142 ± 153 ppm para os leites armazenados a 4 e 7°C, respectivamente. O pH das amostras não variou significativamente ao longo do tempo e foi, em média, $6,82 \pm 0,03$ para o leite controle e $6,32 \pm 0,06$ para o leite adicionado de CO₂, independente da temperatura de conservação.

Tabela 1. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru utilizado como matéria-prima (n = 2).

	Média ± DP ⁽¹⁾
pH	6,81 ± 0,10
Acidez (°D)	14,59 ± 0,49
EST (%)	12,56 ± 0,13
Gordura (%)	4,22 ± 0,26
ESD (%)	8,34 ± 0,11
Lactose (%)	5,01 ± 0,08
Proteína total (%) ⁽²⁾	2,97 ± 0,13
Proteína (%)	2,80 ± 0,11
Caseína (%)	2,30 ± 0,06
CN/P (%) ⁽³⁾	82,30 ± 1,13
Contagem padrão em placas (ufc/mL)	3,7 x 10 ³
Psicrotróficos (ufc/mL)	1,7 x 10 ²
<i>Pseudomonas</i> spp. (ufc/mL)	1,8 x 10 ⁴

⁽¹⁾DP = Desvio padrão; ⁽²⁾Proteína total = nitrogênio total x 6,38; ⁽³⁾CN/P (%): caseína como % da proteína.

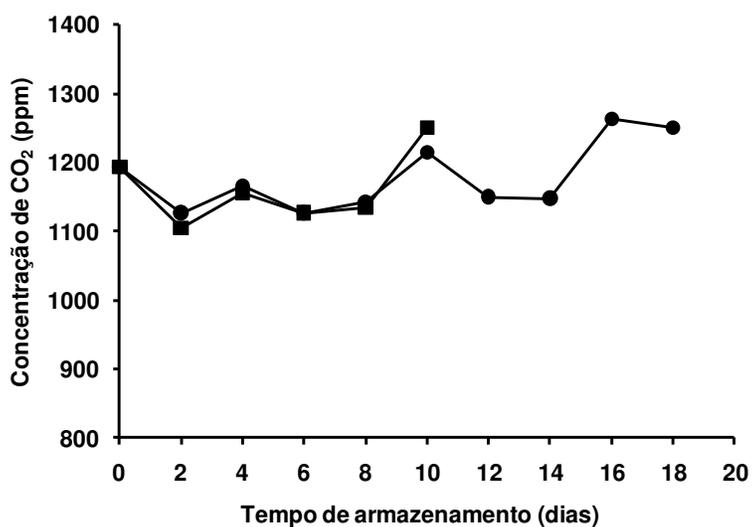


Figura 10. Concentração de CO₂ (ppm) nas amostras de leite cru durante o armazenamento refrigerado a 4±1°C (●) e 7±1°C (■).

5.1.2. Efeito da concentração de CO₂ sobre o desenvolvimento microbiano

A adição de CO₂, a temperatura e o tempo de armazenamento afetaram significativamente a contagem padrão em placas do leite cru (Tabela 2). Durante o armazenamento refrigerado a contagem padrão em placas aumentou para todos os tratamentos (Figura 11), entretanto o tempo necessário para que se atingisse a contagem limite ($7,5 \times 10^5$ ufc/mL) foi maior para a amostra adicionada de CO₂ e armazenada a 4°C.

Tabela 2. Resultado da análise estatística do desenvolvimento microbiano (n = 2).

	Valor de $p^{(1)}$		
	CPP ⁽²⁾	Psicrotróficos	<i>Pseudomonas</i> spp.
Tratamento ⁽³⁾	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Temperatura de armazenamento ⁽⁴⁾	<0,0001	<0,0001	0,04
Tempo de armazenamento	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tratamento x temperatura	0,0989	0,8960	0,0867
Tratamento x tempo	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Temperatura x tempo	0,0002	0,0001	0,5641
Tratamento x temperatura x tempo	0,5682	0,0225	0,0057

⁽¹⁾ $p < 0,05$; ⁽²⁾CPP: contagem padrão em placas; ⁽³⁾Tratamento: leite cru adicionado ou não de CO₂; ⁽⁴⁾4 ou 7°C.

Observa-se na Figura 11 que partindo-se da contagem padrão inicial de $3,7 \times 10^3$ ufc/mL, o leite adicionado de CO₂ armazenado a 4°C foi conservado por aproximadamente 14 dias, enquanto que o leite não adicionado de CO₂ e armazenado na mesma temperatura foi conservado por 8 dias. O tempo de conservação do leite armazenado a 7°C, adicionado ou não de CO₂, foi de 8 e 5 dias, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Ma et al. (2003), que observaram que o leite armazenado a 4°C, adicionado de 1500 ppm de CO₂ levou aproximadamente 14 dias para atingir a contagem padrão de $3,0 \times 10^5$ ufc/mL, partindo de uma contagem inicial de 10^4 ufc/mL. Observa-se ainda que as amostras armazenadas a 4°C sem adição de CO₂ e a 7°C adicionada de

CO₂ apresentaram aproximadamente o mesmo tempo de conservação (8 dias), sugerindo que a adição de CO₂ ao leite cru a 7°C tem efeito equivalente à sua conservação na menor temperatura (4°C), sem adição de CO₂. Desta forma, a temperatura de 7°C, atualmente permitida pela legislação brasileira para armazenamento do leite cru, em conjunto com a adição de CO₂ poderia conservar a qualidade do leite da mesma forma que o produto armazenado a 4°C sem a adição de CO₂.

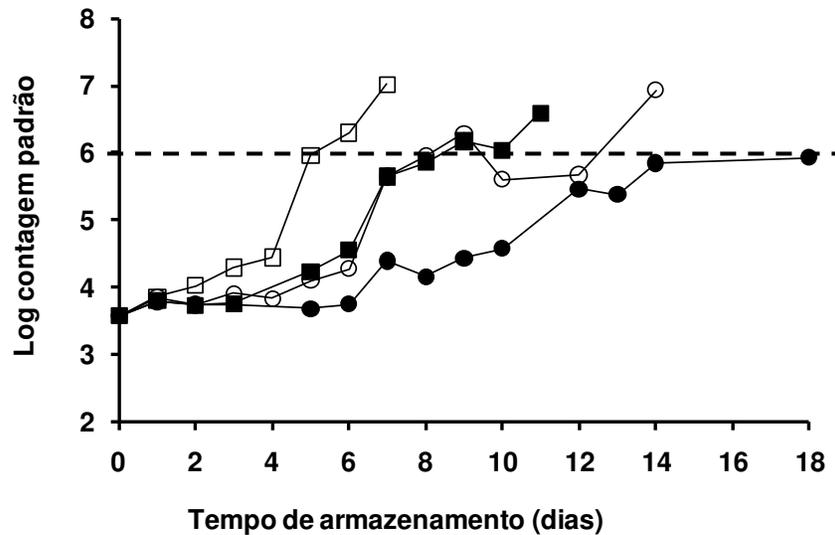


Figura 11. Log da contagem padrão em placas (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO₂; (○) 4°C sem CO₂; (■) 7°C com CO₂, (□) 7°C sem CO₂; (---) contagem padrão máxima permitida pela legislação brasileira ($7,5 \times 10^5$ ufc/mL).

A adição de CO₂, a temperatura e o tempo de armazenamento também afetaram significativamente o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos e de *Pseudomonas* spp. (Tabela 2), cujas contagens aumentaram ao longo do tempo para todos os tratamentos (Figuras 12 e 13). Embora a legislação brasileira não estabeleça uma contagem limite de psicrotróficos para leite cru, diversos autores (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001, SØRHAUG; STEPANIAK, 1997) mostraram que a qualidade dos produtos lácteos processados pode ser

prejudicada se essa contagem for superior a 10^6 ufc/mL. Os resultados mostraram que a adição de CO_2 teve um efeito mais importante do que a temperatura de armazenamento no controle do desenvolvimento de psicrotróficos. A amostra não adicionada de CO_2 e armazenada a 4°C levou 5 dias para atingir a contagem de psicrotróficos considerada crítica para o processamento, enquanto que para o leite armazenado a 7°C este tempo foi de 3-4 dias. Por outro lado, na presença de CO_2 , esses tempos se estenderam para 13 e 8 dias para as amostras armazenadas a 4 e 7°C , respectivamente (Figura 12).

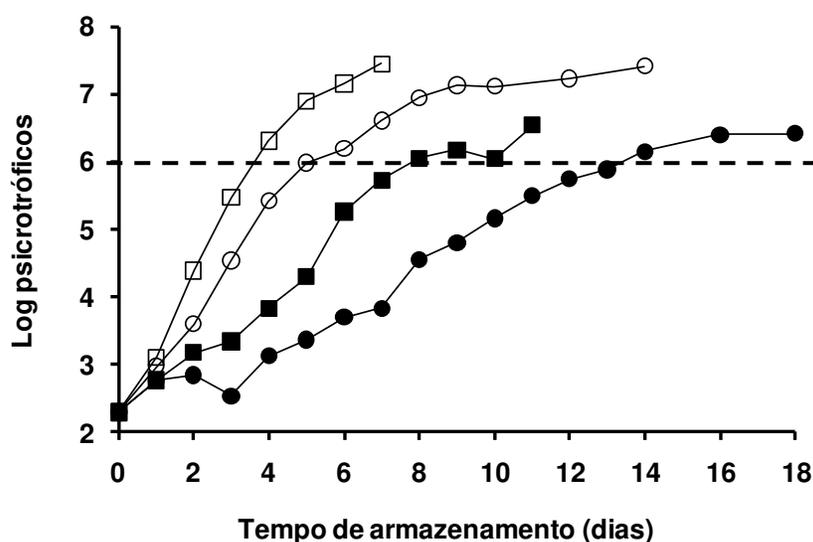


Figura 12. Log da contagem de psicrotróficos (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO_2 ; (○) 4°C sem CO_2 ; (■) 7°C com CO_2 , (□) 7°C sem CO_2 ; (---) contagem de psicrotróficos considerada crítica para o processamento do leite.

O mesmo comportamento da contagem de psicrotróficos foi observado para a contagem de *Pseudomonas* spp. Estes micro-organismos representam aproximadamente 10% da microbiota do leite cru recém-ordenhado e são os psicrotróficos mais importantes presentes no leite cru refrigerado, produzindo enzimas com alta capacidade proteolítica e lipolítica (NIELSEN, 2002; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Considerando também como válido o limite crítico de 10^6

ufc/mL, observou-se que as amostras não adicionadas de CO₂ levaram praticamente o mesmo tempo para atingir essa contagem (~4-5 dias), enquanto nas amostras adicionadas de CO₂ este tempo se estendeu para 14 e 11 dias no leite armazenado a 4 e 7°C, respectivamente (Figura 13).

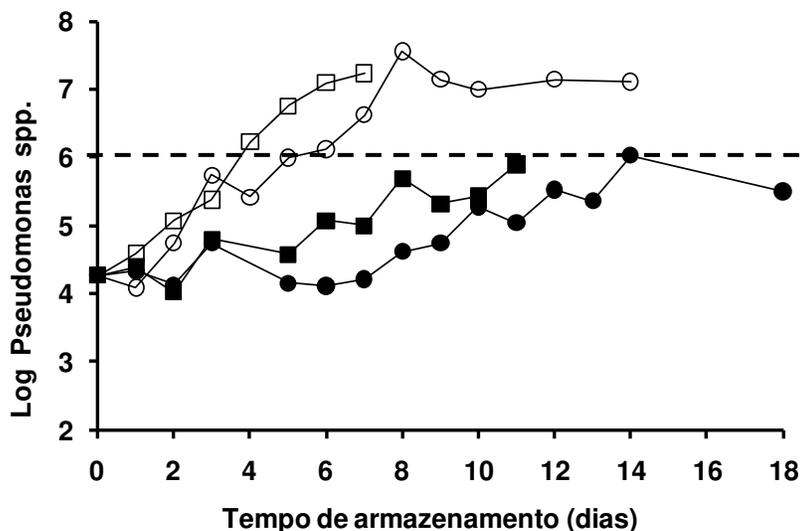


Figura 13. Log da contagem de *Pseudomonas* spp. (ufc/mL) do leite cru durante o armazenamento refrigerado. (●) 4°C com CO₂; (○) 4°C sem CO₂; (■) 7°C com CO₂, (□) 7°C sem CO₂; (---) contagem de psicotróficos considerada crítica para o processamento do leite.

A adição de CO₂ afetou o tempo de fase lag, o tempo de geração e a taxa de crescimento dos micro-organismos psicotróficos. Na presença de CO₂ o tempo de fase lag dos psicotróficos aumentou em 400 e 140% quando o leite cru foi armazenado a 4 e 7°C, respectivamente (Figura 14a). Estes resultados sugerem que o CO₂ foi mais eficiente para retardar o desenvolvimento dos micro-organismos psicotróficos no leite cru armazenado a 4 do que a 7°C. Simultaneamente, a 4 °C na presença do CO₂ o tempo de geração de psicotróficos aumentou 132% (Figura 14b) e a taxa de crescimento reduziu 57% (Figura 14c), quando comparado ao leite não adicionado de CO₂. Estes valores foram de 122 e 55% para o leite cru armazenado a 7°C (Figura 14b e 14c). Este

comportamento evidencia a eficiência do CO₂ em retardar o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos, tanto a 4°C quanto a 7°C, o que evitaria possíveis defeitos de qualidade nos produtos lácteos processados, causados pelas enzimas produzidas por estes micro-organismos.

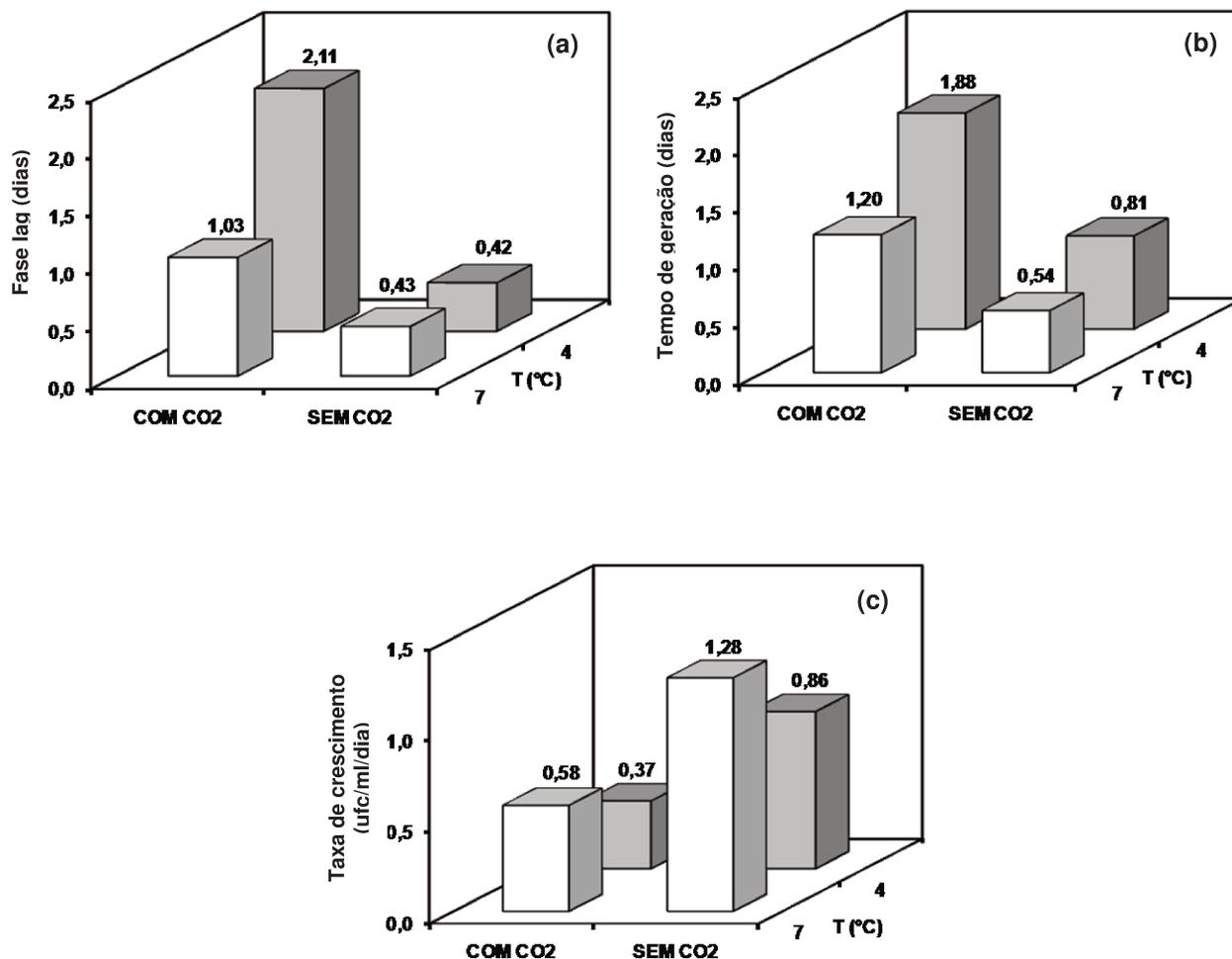


Figura 14. (a) Fase lag, (b) tempo de geração e (c) taxa de crescimento de micro-organismos psicrotróficos em leite cru adicionado ou não de CO₂, armazenados a 4±1°C e 7±1°C.

O tempo de fase lag, o tempo de geração e a taxa de crescimento de *Pseudomonas* também foram influenciados pela presença do CO₂ (Figuras 15a, 15b e 15c), exceto para o tempo de fase lag das amostras armazenadas a 7°C sem adição de CO₂ que apresentaram este parâmetro ligeiramente maior que as amostras adicionadas de CO₂. As amostras armazenadas a 4°C e adicionadas de CO₂ apresentaram um aumento de 182% e 329% no tempo de fase lag e no tempo de geração (Figuras 15a e 15b), respectivamente, quando comparadas às amostras não adicionadas de CO₂, armazenadas na mesma temperatura. Já a taxa de crescimento foi 75% menor na presença de CO₂ (Figura 15c).

O leite armazenado a 7°C adicionado de CO₂ apresentou aumento de 277% no tempo de geração de *Pseudomonas* (Figura 15b) e redução de 73% na taxa de crescimento (Figura 15c) quando comparada ao leite sem adição de CO₂. Amigo, Olano e Calvo (1995) também observaram o aumento da fase lag e a diminuição da taxa de crescimento de diferentes espécies de *Pseudomonas* em leite cru adicionado de CO₂ (pH 6,0) e armazenado a 7°C.

No que diz respeito à qualidade do leite processado no Brasil, trabalho recente (ARCURI et al., 2008) mostrou que a maioria dos micro-organismos psicotróficos isolados de leite cru apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica em temperaturas de refrigeração de 4°C, 7°C e 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração da qualidade do leite e conseqüentemente dos produtos lácteos. Desta forma, a adição de CO₂ ao leite cru poderia contribuir para a manutenção da qualidade do leite cru processado no Brasil.

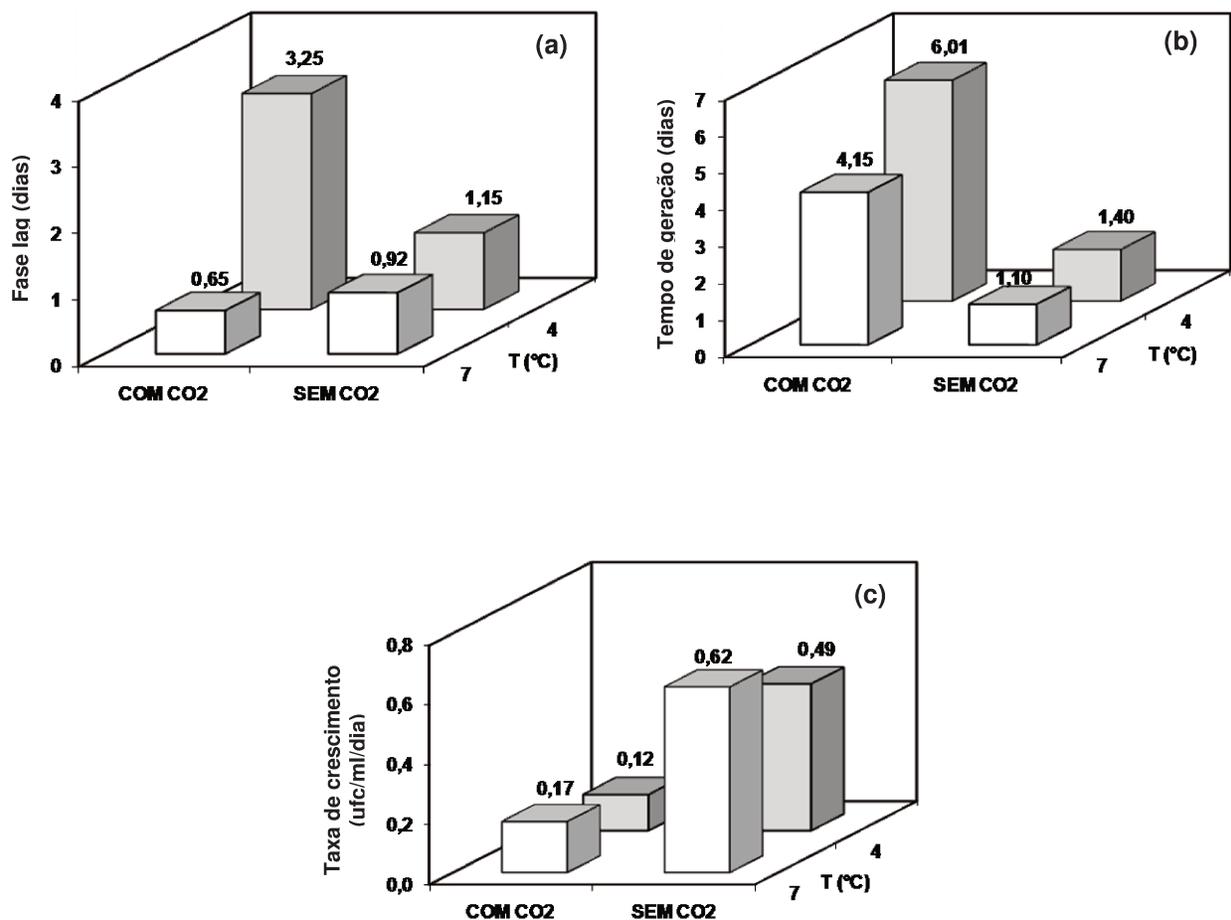


Figura 15. (a) Fase lag, (b) tempo de geração e (c) taxa de crescimento de *Pseudomonas* spp. em leite cru com e sem adição de CO₂, armazenados a 4±1°C e 7±1°C.

5.1.3. Efeito da adição de CO₂ sobre a proteólise e lipólise do leite cru

A Tabela 3 apresenta o efeito da adição de CO₂, da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como da interação entre estes fatores sobre a proteólise e lipólise do leite cru. Ambas aumentaram significativamente ao longo do tempo de armazenamento, entretanto, considerando-se que a interação entre

os tratamentos e o tempo de armazenamento foi significativa, utilizou-se a análise de regressão linear para avaliar tal interação.

Tabela 3. Resultado da avaliação estatística do efeito da adição de CO₂ sobre a proteólise e lipólise do leite cru refrigerado (n = 2).

	Valor de $p^{(1)}$	
	CN/P ⁽²⁾	AGL ⁽³⁾
Tratamento ⁽⁴⁾	0,1437	<0,0001
Temperatura de armazenamento ⁽⁵⁾	0,1985	0,7023
Tempo de armazenamento	<0,0001	<0,0001
Tratamento x temperatura	1	0,8925
Tratamento x tempo	0,0002	0,0002
Temperatura x tempo	0,3977	0,9495
Tratamento x temperatura x tempo	0,9850	0,9903

⁽¹⁾ $p < 0,05$. ⁽²⁾ CN/P (%): caseína como porcentagem da proteína. ⁽³⁾ AGL: ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg leite). ⁽⁴⁾ Tratamento: leite cru adicionado ou não de CO₂, ⁽⁵⁾ 4 ou 7°C.

Observa-se nas Figuras 16a e 16b que a proteólise e a lipólise aumentaram, respectivamente, aproximadamente 2,2 e 2,7 vezes mais rápido no leite cru sem adição de CO₂ do que no leite adicionado de CO₂. A maior ação proteolítica e lipolítica também foi observada por Ma, Barbano e Santos (2003) em leite cru refrigerado sem adição de CO₂ quando comparado ao adicionado de 1500 ppm de CO₂. A proteólise e a lipólise podem ser causadas tanto por enzimas naturais do leite cru, como plasmina e lipase lipoprotéica, quanto por enzimas produzidas por micro-organismos psicotróficos durante o armazenamento refrigerado (FOX; MCSWEENEY, 1998). A atividade da plasmina não foi avaliada neste experimento, entretanto, a análise de regressão linear mostrou que existe uma correlação significativa ($p < 0,0001$) entre a contagem de psicotróficos e o aumento da proteólise (Figura 17a), representada pelo decréscimo do teor de caseína como porcentagem da proteína (CN/P). Da mesma forma, o aumento da contagem de psicotróficos resultou no aumento significativo ($p = 0,0007$) da lipólise

(Figura 17b), representada pelo aumento da concentração de ácidos graxos livres. Alguns gêneros de psicrotróficos têm um grande poder de deterioração do leite e, segundo Muir e Banks (2003), pelo menos 20% de todos os psicrotróficos isolados de leite cru podem causar proteólise e lipólise e 70% destes psicrotróficos são classificados como *P. fluorescens*, que exibem tanto atividade proteolítica quanto lipolítica.

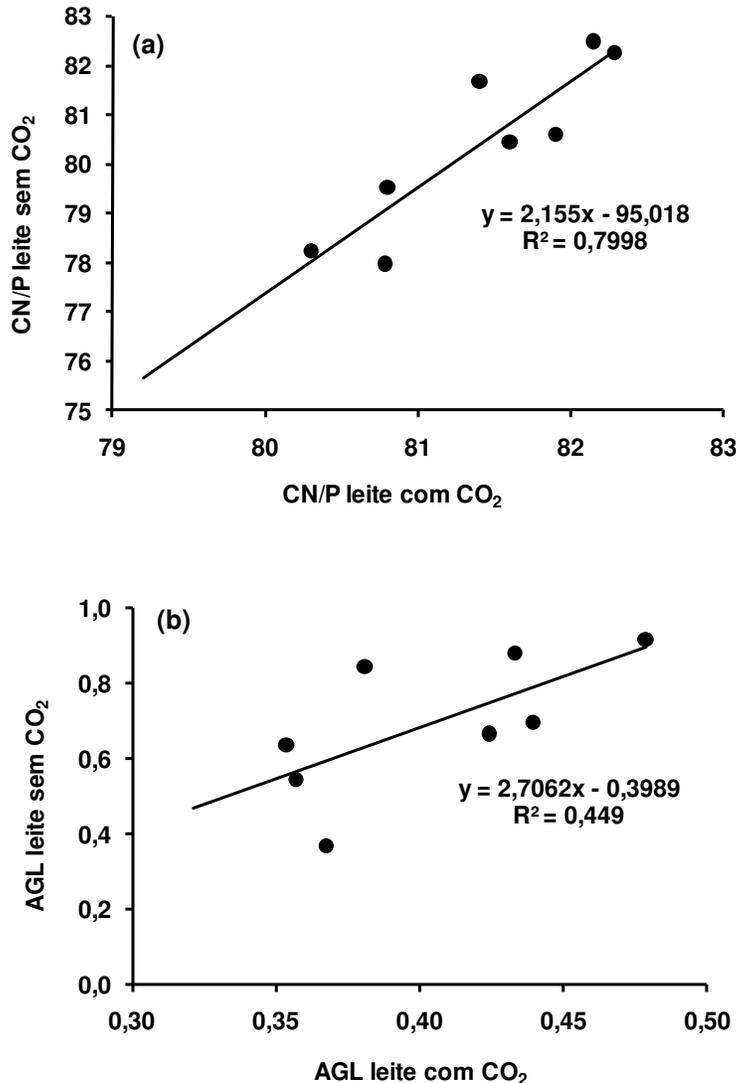


Figura 16. (a) Correlação entre CN/P (%) do leite com e sem adição de CO₂ (Intervalo de confiança [-0,206; -0,099] com nível de significância de 95%) e **(b)** Correlação entre AGL (meq. á. palmítico/kg leite) do leite com e sem adição de CO₂ (Intervalo de confiança [-0,004; +0,011] com nível de significância de 95%).

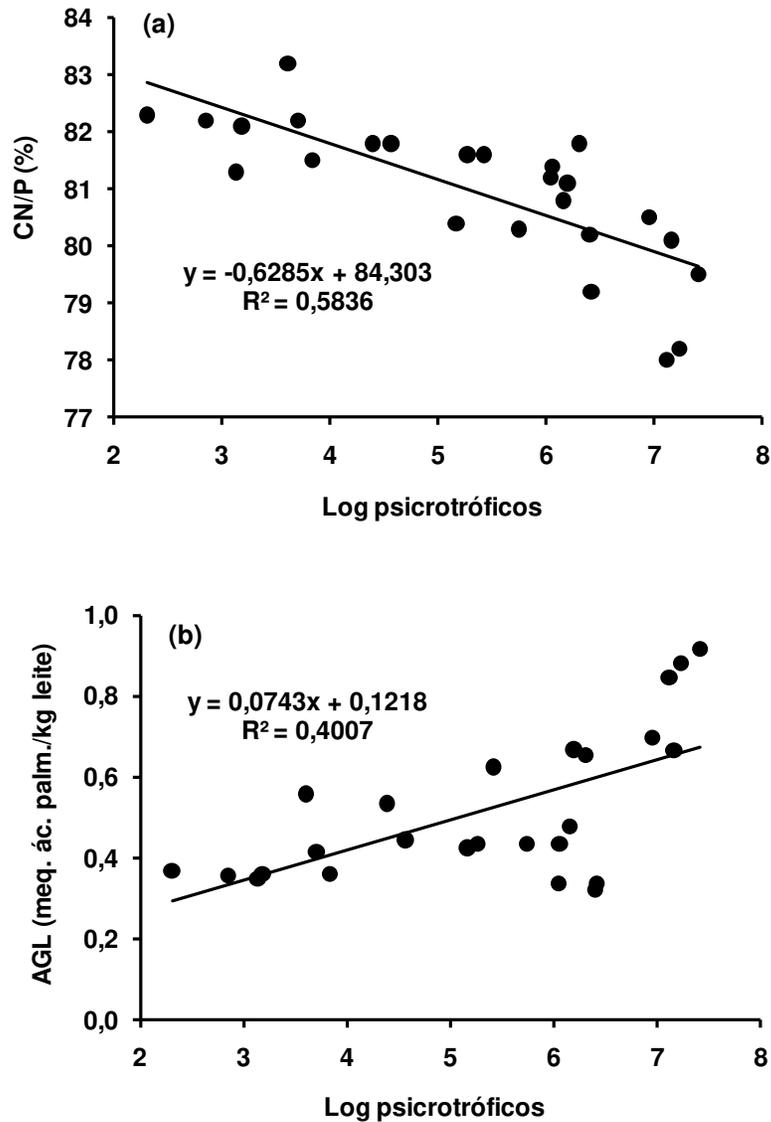


Figura 17. (a) Correlação entre a CN/P (%) e a contagem de psicotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [-0,857; -0,399] com nível de significância de 95%) e **(b)** Correlação entre a concentração de AGL (meq. ác. palmítico/kg de leite) e a contagem de psicotróficos do leite cru refrigerado (Intervalo de confiança [0,035; 0,113] com nível de significância de 95%).

As menores taxas de proteólise e lipólise observadas para o leite com adição de CO₂ podem estar relacionadas à menor contagem de psicotróficos e, conseqüentemente, à redução da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas,

já que a ação antimicrobiana do CO₂ ocorre principalmente sobre essa classe de micro-organismos.

Em conclusão, com base nos resultados desta primeira etapa do trabalho, foi definida uma condição de armazenamento do leite cru visando a manutenção da qualidade tanto da amostra adicionada de CO₂, quanto da não adicionada. Foram também definidas as características de armazenamento do leite cru em tanques de expansão e não em garrafas hermeticamente fechadas. Segundo os resultados obtidos, o leite adicionado ou não de CO₂, armazenado a 4°C/6 dias, apresentou contagem padrão em placas e de psicotróficos que ainda atendem aos requisitos de qualidade aceitáveis para processamento, sem prejudicar a qualidade da matéria-prima. Portanto, ficou definido o armazenamento do leite cru em tanques de expansão à temperatura de 4°C por um período de 6 dias antes do processamento UHT.

5.2. Efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre as características físico-químicas do leite UHT

5.2.1. Efeito da concentração de CO₂ sobre as características físico-químicas e microbiológicas da matéria-prima

As Tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru utilizado como matéria-prima (Dia 0) e do leite cru adicionado ou não de CO₂ após 6 dias de armazenamento refrigerado (4°C).

Tabela 4. Características físico-químicas do leite cru no dia da recepção (Dia 0) e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado ou não de CO₂ (n=3).

	Leite cru Dia 0	Leite cru Dia 6	Leite cru _{CO2} Dia 6	
	Média ± DP ⁽¹⁾	Média ± DP	Média ± DP	p ⁽²⁾
pH	6,88 ± 0,03 ^a	6,80 ± 0,07 ^b	6,25 ± 0,05 ^c	<0,0001
Acidez (°D)	15,65 ± 1,06 ^b	15,41 ± 1,28 ^b	31,55 ± 3,10 ^a	<0,0001
Extrato seco total (%)	11,12 ± 0,43	---	---	---
Gordura (%)	3,14 ± 0,43	---	---	---
ESD (%)	8,18 ± 0,28	---	---	---
Cinzas (%)	0,68 ± 0,02	---	---	---
Lactose (%) ⁽³⁾	4,26 ± 0,20	---	---	---
Proteína total (%)	3,03 ± 0,16 ^a	2,99 ± 0,23 ^a	2,92 ± 0,34 ^a	0,6597
Proteína (%)	2,86 ± 0,16 ^a	2,83 ± 0,23 ^a	2,73 ± 0,34 ^a	0,5138
Caseína (%)	2,30 ± 0,12 ^a	2,23 ± 0,18 ^a	2,19 ± 0,26 ^a	0,5695
Caseína (% proteína) ⁽⁴⁾	80,43 ± 0,89 ^a	78,72 ± 0,30 ^b	80,31 ± 1,12 ^a	0,0003
AGL ⁽⁵⁾	0,27 ± 0,02 ^{ab}	0,30 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,03 ^b	0,0015

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (p<0,05). ⁽¹⁾DP: Desvio padrão; ⁽²⁾p<0,05; ⁽³⁾Lactose calculada por diferença; ⁽⁴⁾Caseína como porcentagem da proteína; ⁽⁵⁾AGL: ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg de leite).

No momento da recepção (Dia 0), o leite cru apresentou composição característica de um produto de boa qualidade (Tabela 4), atendendo aos requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), com exceção ao extrato seco desengordurado que ficou abaixo do padrão (8,4%). Quanto aos padrões microbiológicos, a contagem padrão em placas ficou abaixo do limite de 7,5x10⁵ ufc/mL e todos os demais micro-organismos avaliados (psicrotróficos, *Pseudomonas* spp., esporos mesófilos e psicrotróficos e termodúricos mesófilos e psicrotróficos) apresentaram baixas contagens (Tabela 5). A contagem de células somáticas (CCS) média foi de 505±152 cél/mL e não foi detectada presença de antibiótico no leite cru utilizado nos três processamentos.

Estes resultados indicam que a matéria-prima foi obtida de animais saudáveis, armazenada e transportada higienicamente para posterior processamento.

Tabela 5. Características microbiológicas do leite cru no dia da recepção e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado ou não de CO₂ (n=3).

	Leite cru	Leite cru	Leite cru _{CO2}	<i>p</i> ⁽¹⁾
	Dia 0	Dia 6	Dia 6	
Contagens (ufc/mL)	Média	Média	Média	
CPP ⁽²⁾	2,81 x 10 ^{3b}	2,77 x 10 ^{6a}	3,25 x 10 ^{3b}	0,0030
Psicrotróficos	5,24 x 10 ^{2b}	9,24 x 10 ^{6a}	7,24 x 10 ^{3b}	<0,0001
<i>Pseudomonas</i> spp.	4,68 x 10 ^{3b}	1,35 x 10 ^{6a}	5,13 x 10 ^{3b}	0,0014
Esporos mesófilos	8,41 x 10 ^{1a}	1,26 x 10 ^{2a}	1,96 x 10 ^{2a}	0,3473
Esporos psicrotróficos	1,00 x 10 ^{2a}	9,09 x 10 ^{1a}	1,00 x 10 ^{2a}	0,9157
Termodúricos mesófilos	2,01 x 10 ^{3b}	1,22 x 10 ^{6a}	3,17 x 10 ^{3b}	0,0008
Termodúricos psicrotróficos	4,22 x 10 ^{2b}	2,80 x 10 ^{6a}	5,80 x 10 ^{3b}	0,0003

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (*p*<0,05).
⁽¹⁾*p*<0,05; ⁽²⁾Contagem padrão em placas.

Observa-se na Tabela 4 que o pH e a acidez foram significativamente diferentes entre as amostras de leite cru. Este resultado era esperado, uma vez que a adição de CO₂ aumenta a acidez e diminui o pH do leite.

Após 6 dias de armazenamento refrigerado não foram observadas variações significativas nas porcentagens de proteína total, proteína e caseína entre o leite cru (Dia 0) e as amostras adicionada ou não de CO₂. Entretanto, o teor de caseína como porcentagem da proteína, diminuiu significativamente para o leite cru armazenado sem adição de CO₂, mantendo-se constante quando o leite foi adicionado de CO₂. Durante o mesmo período de armazenamento, a concentração de ácidos graxos livres do leite cru adicionado ou não de CO₂ não diferiu significativamente da matéria-prima no dia da recepção (Dia 0). Entretanto, após 6 dias de refrigeração, foi observada maior concentração de AGL no leite cru

sem adição de CO₂, o que representa maior lipólise desta amostra, quando comparada ao leite adicionado de CO₂ (Dia 6).

Observa-se na Tabela 5 que a adição de CO₂ afetou significativamente a contagem padrão em placas, a contagem de psicotróficos, de *Pseudomonas* spp., e de termodúricos mesófilos e psicotróficos, sendo que todas aumentaram no leite sem adição de CO₂ após 6 dias de armazenamento, enquanto que no leite adicionado de CO₂ as mesmas permaneceram constantes. As contagens de esporos mesófilos e psicotróficos não foram afetadas pela adição de CO₂. A contagem padrão em placas que inicialmente era da ordem de 10³ ufc/mL aumentou para 10⁶ ufc/mL quando o leite cru não foi adicionado de CO₂. A contagem de psicotróficos aumentou 4 ciclos logarítmicos atingindo o limite considerado crítico (10⁶ ufc/mL) para processamento do leite cru segundo diversos autores (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001, SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). As contagens de *Pseudomonas* spp. e de termodúricos mesófilos aumentaram em 3 ciclos logarítmicos, enquanto esse aumento foi de 4 ciclos para os termodúricos psicotróficos. As menores taxas de proteólise e lipólise apresentadas pelo leite adicionado de CO₂ estão relacionadas, provavelmente, à melhor característica microbiológica deste leite.

A partir destes resultados pode-se observar que após 6 dias de armazenamento a 4±1°C, o leite cru adicionado de CO₂ manteve a mesma qualidade físico-química e microbiológica do dia da ordenha, enquanto o leite cru sem adição de CO₂ sofreu perda significativa de sua qualidade. Estes resultados são consistentes com outros estudos que também relataram o controle do desenvolvimento microbiano e conseqüentemente da proteólise e lipólise em leite cru adicionado de CO₂ (AMIGO; OLANO; CALVO, 1995; ESPIE; MADDEN, 1997; KING; MABBITT, 1982; MA; BARBANO; SANTOS, 2003; MARTIN; WERNER; HOTCHKISS, 2003).

A Figura 18 apresenta as variações de pH e concentração de CO₂ do leite cru tratado durante os 6 dias de armazenamento refrigerado. O pH do leite variou entre 6,18 e 6,30 e a concentração de CO₂ de 972 a 1119 ppm. A partir do dia 1,

quando se fez necessário, foi realizada a correção do pH através adição de CO_2 ao leite. Assim, as variações observadas no gráfico da Figura 18, para cada dia de armazenamento, representam o pH e a concentração de CO_2 no leite antes e depois da correção do pH para 6,20. Perdas de CO_2 durante o armazenamento foram atribuídas à agitação periódica do leite dentro do tanque de expansão, ao tamanho do espaço livre dentro do tanque, já que seu volume máximo era de 250 litros e continha apenas 100 litros de leite e à falta de hermeticidade no fechamento do tanque. O leite cru não adicionado de CO_2 permaneceu no tanque de expansão fechado e não foi monitorado durante o armazenamento refrigerado.

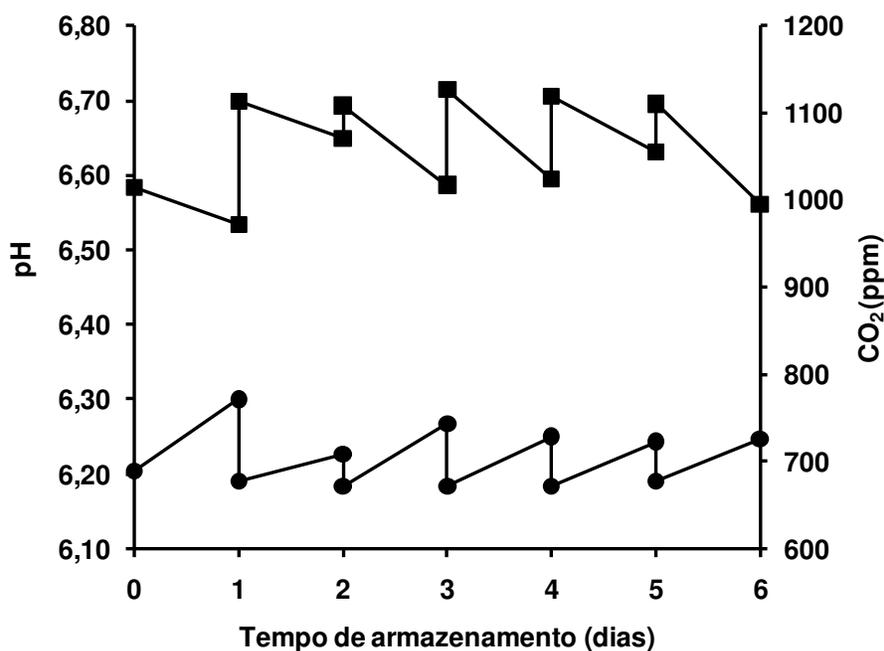


Figura 18. Comportamento do pH e da concentração de CO_2 durante os 6 dias de armazenamento refrigerado do leite cru tratado. (●) pH; (■) CO_2 .

5.2.2. Caracterização físico-química do leite UHT

A composição dos leites UHT produzidos a partir de leite cru adicionado ou não de CO₂ (Tabela 6) atendeu aos padrões estabelecidos pelo Regulamento de Identidade e Qualidade do leite UHT integral (BRASIL, 1997) que são: mínimo de 3,0% de gordura e 8,2% de extrato seco desengordurado (ESD), acidez entre 0,14-0,18% de ácido láctico e estabilidade ao álcool 68%.

Tabela 6. Composição físico-química do leite UHT produzido a partir de leite cru adicionado ou não de CO₂ (n=3).

	Leite UHT	Leite UHT _{CO2}	<i>p</i> ⁽²⁾
	Média ± DP ⁽¹⁾	Média ± DP ⁽¹⁾	
pH	6,78 ± 0,03 ^a	6,74 ± 0,05 ^a	0,0948
Acidez (°D)	15,22 ± 1,07 ^b	16,46 ± 0,53 ^a	0,0066
Extrato seco total (%)	11,83 ± 0,58 ^a	11,42 ± 0,33 ^a	0,0842
Gordura (%)	3,18 ± 0,40 ^a	3,28 ± 0,36 ^a	0,5861
ESD (%)	8,65 ± 0,70 ^a	8,14 ± 0,24 ^a	0,0563
Proteína total (%)	2,93 ± 0,30 ^a	2,92 ± 0,31 ^a	0,9329
Proteína (%)	2,76 ± 0,29 ^a	2,75 ± 0,32 ^a	0,9433
NNP/NT (%) ⁽⁴⁾	6,11 ± 0,75 ^a	6,13 ± 1,02 ^a	0,9649
NNC/NT (%) ⁽⁵⁾	11,30 ± 0,61 ^a	10,82 ± 0,84 ^a	0,1892
Cinzas (%)	0,75 ± 0,03 ^a	0,74 ± 0,05 ^a	0,6487
Lactose (%) ⁽³⁾	4,47 ± 0,49 ^a	4,97 ± 0,87 ^a	0,1492
AGL ⁽⁶⁾	0,17 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,02 ^b	0,0353
Álcool 68%	estável	estável	---

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$); ⁽¹⁾DP: Desvio padrão; ⁽²⁾ $p < 0,05$; ⁽³⁾Lactose calculada por diferença; ⁽⁴⁾Nitrogênio não protéico como porcentagem do nitrogênio total; ⁽⁵⁾Nitrogênio não caseico como porcentagem do nitrogênio total; ⁽⁶⁾AGL: Ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg de leite).

Não foram observadas diferenças significativas entre as características físico-químicas do leite UHT e UHT_{CO2}, com exceção à acidez e à concentração de AGL. O leite UHT_{CO2} apresentou maior acidez e menor concentração de AGL do que o leite UHT (Tabela 6). As amostras apresentaram-se comercialmente estéreis (BRASIL, 1997) uma vez que após o período de incubação de 7 dias a 35-37°C não apresentaram desenvolvimento microbiano, foram estáveis ao álcool 68% e não apresentaram variação de acidez ou alterações na embalagem.

5.2.3. Avaliação do pH durante o armazenamento do leite UHT

O tratamento ($p < 0,0001$), o tempo de armazenamento ($p < 0,0001$) e a interação entre estes fatores ($p = 0,0095$) afetaram significativamente o pH do leite UHT. Em média, durante o período de armazenamento, o pH do leite UHT_{CO2} foi significativamente maior que o pH do leite UHT ($6,79 \pm 0,04$ e $6,75 \pm 0,02$, respectivamente). Entretanto, do ponto de vista tecnológico, essa diferença de 0,04 unidades de pH entre as amostras não é importante. Apesar do tempo de armazenamento ter afetado significativamente o pH das amostras, este apresentou pouca variação durante 90 dias de estocagem. Após 90 dias de armazenamento foi observado o decréscimo mais acentuado do pH do leite UHT e UHT_{CO2} (Figura 19). Apesar das variações significativas durante os 120 dias de armazenamento dos leites, o pH manteve-se inserido na faixa de valores considerada normal para pH de leite que é de 6,60 a 6,90 (FOX; MCSWEENEY, 1998). O decréscimo do pH durante o armazenamento do leite UHT pode ser atribuído aos ácidos formados nas reações de Maillard, à desfosforilação de caseínas e às reações proteína-proteína que resultam na liberação de íons H⁺ (AL-SAAD; DEETH, 2008).

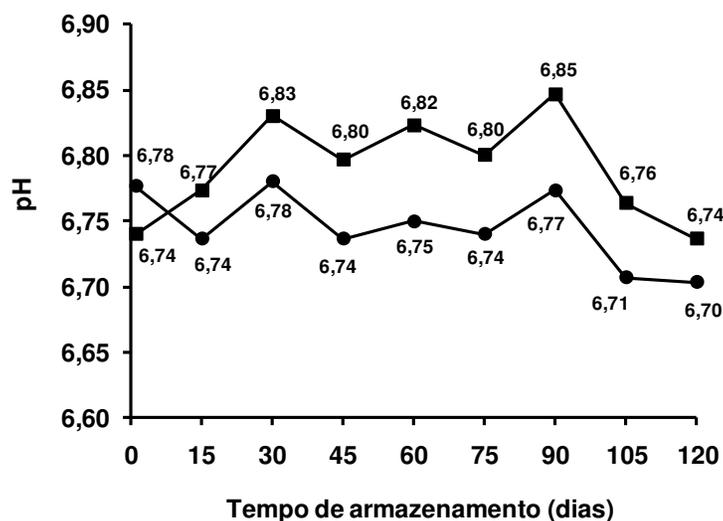


Figura 19. Comportamento do pH do leite UHT e UHT_{CO2} durante 120 dias de armazenamento (●) UHT; (■) UHT_{CO2}.

5.2.4. Avaliação da lipólise durante o armazenamento do leite UHT

A lipólise foi significativamente afetada pelo tratamento ($p < 0,0001$) e pelo tempo de armazenamento das amostras ($p < 0,0001$), entretanto, a interação entre esses fatores não afetou significativamente a lipólise ($p = 0,5727$). Independente do tratamento, a concentração de AGL aumentou ao longo do tempo (Figura 20) e foi, em média, maior no leite UHT do que no leite UHT_{CO2} ($0,21 \pm 0,03$ e $0,16 \pm 0,02$ meq. ác. palm./kg leite, respectivamente). A maior concentração de AGL no leite UHT produzido a partir de leite cru não adicionado de CO₂ pode estar relacionada à baixa qualidade microbiológica da matéria-prima caracterizada especialmente pela alta contagem de micro-organismos psicrotróficos ($9,24 \times 10^6$ ufc/mL) desse leite antes do processamento (Tabela 5).

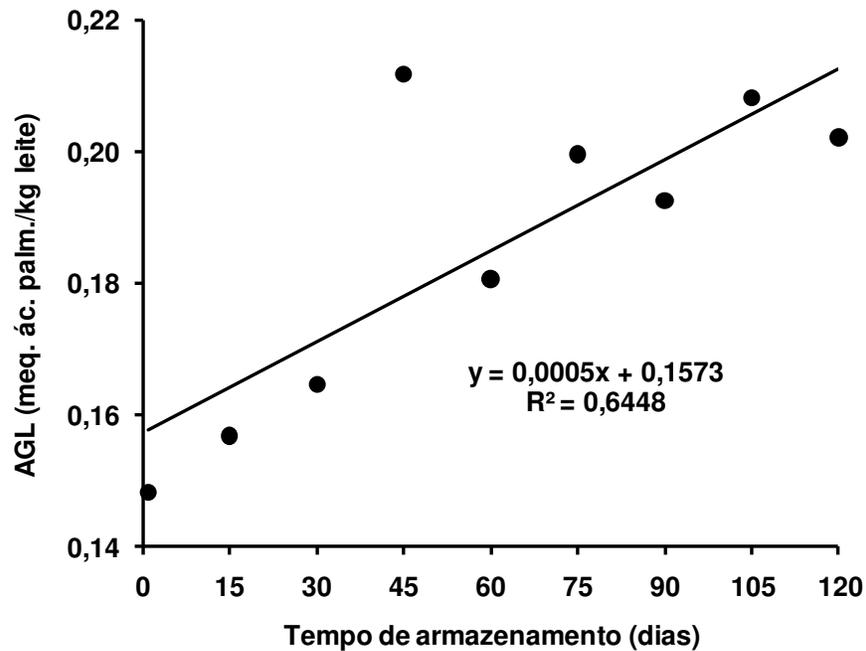


Figura 20. Efeito do tempo de armazenamento na concentração de ácidos graxos livres (AGL).

5.2.5. Avaliação da proteólise durante o armazenamento do leite UHT

A proteólise das amostras de leite UHT durante o armazenamento foi avaliada de três formas: 1) através das frações do NNC e NNP como porcentagem do nitrogênio total; 2) por cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP), analisando as frações de caseína (α -, β - e κ -caseína) ou 3) por HPLC-RP analisando o padrão de peptídeos dos filtrados do leite precipitado a pH 4,6 e por TCA 24%.

A Tabela 7 apresenta o resultado da avaliação estatística para o efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre as frações de NNC/NT e NNP/NT do leite UHT, utilizadas como índice de proteólise.

Tabela 7. Resultado da avaliação estatística do efeito da adição de CO₂ ao leite cru sobre as frações de NNP e NNC (como % do NT) do leite UHT durante sua vida de prateleira (n = 3).

	Valor de $p^{(1)}$	
	NNC/NT ⁽²⁾	NNP/NT ⁽³⁾
Tratamento ⁽⁴⁾	<0,0001	0,0222
Tempo de armazenamento ⁽⁵⁾	<0,0001	0,0045
Tratamento x tempo	0,0153	0,8859

⁽¹⁾ $p < 0,05$. ⁽²⁾ Nitrogênio não caseico como porcentagem do nitrogênio total; ⁽³⁾ Nitrogênio não protéico como porcentagem do nitrogênio total; ⁽⁴⁾ Tratamento: leite UHT produzido a partir de leite cru adicionado ou não de CO₂; ⁽⁵⁾ 120 dias.

Observa-se na Tabela 7 que o NNC/NT foi significativamente maior no leite UHT do que no leite UHT_{CO₂}, com valores médios de 13,17±1,30% e 11,87±0,81%, respectivamente. O NNC/NT aumentou durante os 120 dias de armazenamento para os dois tratamentos (Figura 21), entretanto, a taxa de aumento foi ~1,4 vezes maior no leite UHT (Figura 22). O NNC/NT aumentou 38,3% e 25,3% para o leite UHT e UHT_{CO₂}, respectivamente, e foi menor que o aumento de 74,7% observado por Topçu, Numanoğlu e SaldamLı (2006). Entretanto, estes autores avaliaram o leite UHT por 180 dias, enquanto nos nossos experimentos as amostras foram avaliadas por 120 dias. O aumento da proteólise durante o armazenamento do leite UHT foi também observado por outros autores (ENRIGHT et al., 1999; GARCÍA-RISCO; VILLAMIEL; LÓPEZ-FANDIÑO, 2002; GAUCHER et al., 2008).

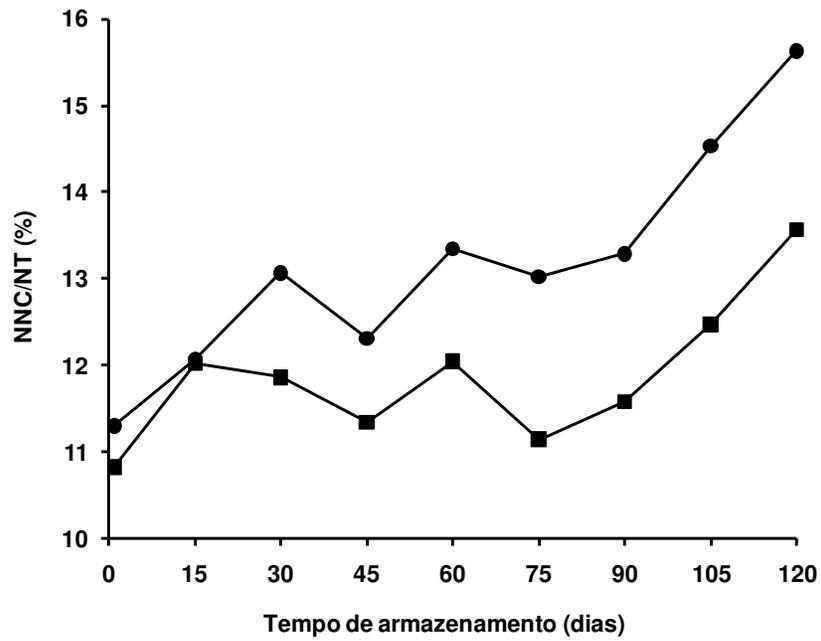


Figura 21. Efeito do tempo de armazenamento sobre o comportamento do NNC/NT do leite UHT (●) e UHT_{CO2} (■).

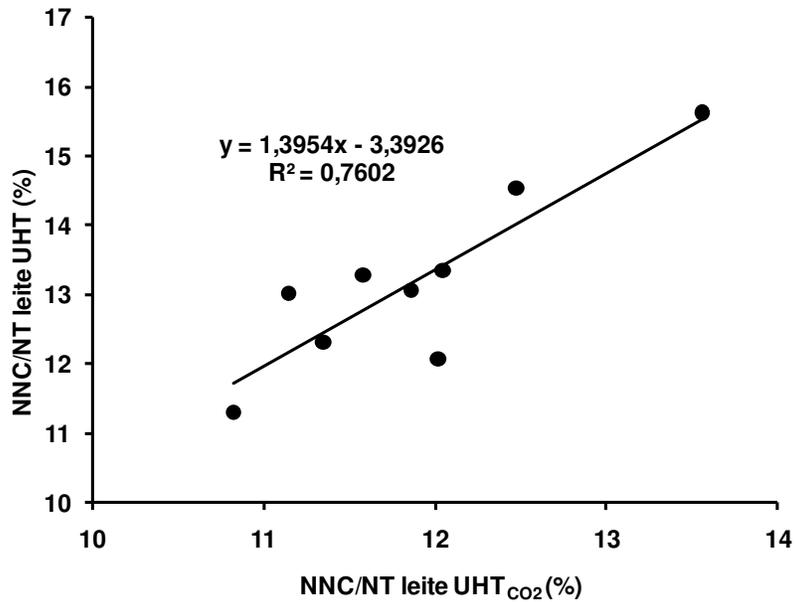


Figura 22. Correlação entre NNC/NT (%) do leite UHT e UHT_{CO2} (Intervalo de confiança [0,695;2,096] com nível de significância de 95%).

A maior proteólise no leite UHT produzido a partir de leite cru sem adição de CO₂ não influenciou a porcentagem de caseína intacta após 120 dias de armazenamento. Observa-se na Figura 23, que apresenta os cromatogramas referentes à avaliação das frações protéicas do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1), que imediatamente após o processamento (Dia 1) praticamente não existem diferenças entre as frações protéicas do leite UHT e UHT_{CO2}. Após 120 dias de armazenamento observou-se a diminuição de todas as frações para as duas amostras, entretanto, esta redução não foi significativa para todas as frações (Tabela 8). Considerando que a somatória das áreas dos picos dos cromatogramas do leite UHT e UHT_{CO2} no 1º dia de armazenamento corresponderam a 100% das frações protéicas, não foram observadas variações significativas após 120 dias de armazenamento, com exceção à fração correspondente às proteínas do soro do leite UHT que sofreu uma redução significativa ao final deste período. Também não se observou diferença significativa para as frações protéicas entre as amostras de leite UHT e UHT_{CO2} após 120 dias de estocagem.

Tabela 8. Porcentagens das áreas dos picos cromatográficos das frações protéicas do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (n=2).

		Área dos picos cromatográficos (%)	
Frações protéicas		Dia 1	Dia 120
Leite UHT	κ-CN	100 ^a	93,7 ^{aA}
	α-CN + β-CN	100 ^a	94,1 ^{aA}
	α-La + β-Lg	100 ^a	87,9 ^{bA}
Leite UHT_{CO2}	κ-CN	100 ^a	98,3 ^{aA}
	α-CN + β-CN	100 ^a	92,1 ^{aA}
	α-La + β-Lg	100 ^a	95,0 ^{aA}

^{a,b} Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si (p<0,05).

^{A,B} Para cada fração protéica, médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferem significativamente entre si (p<0,05).

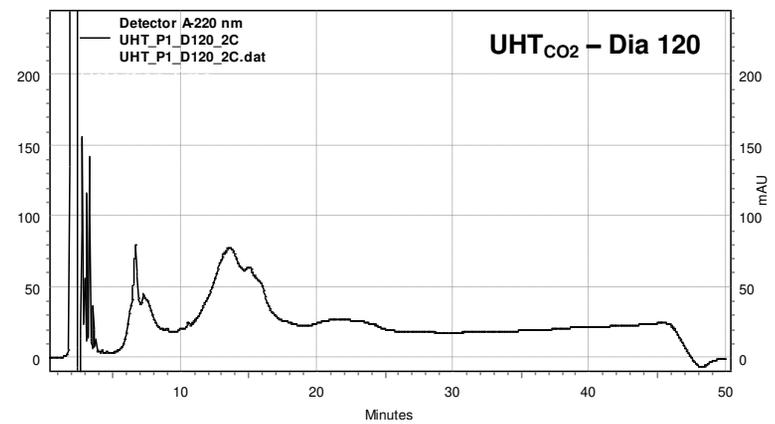
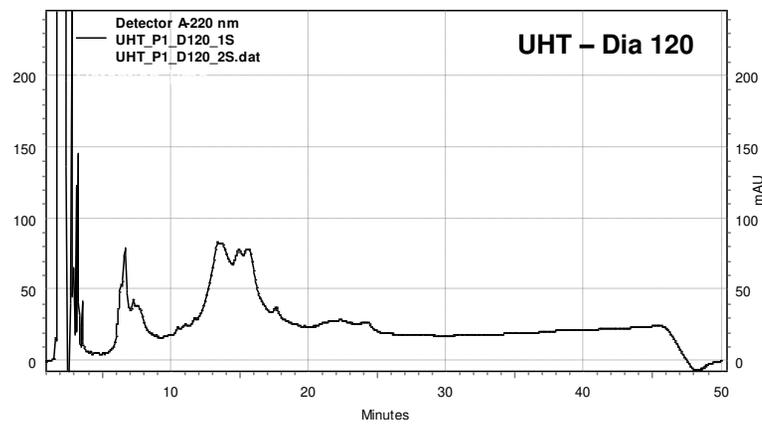
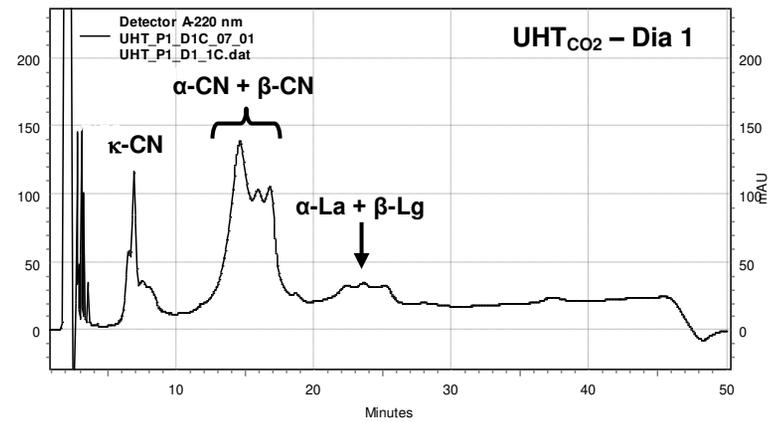
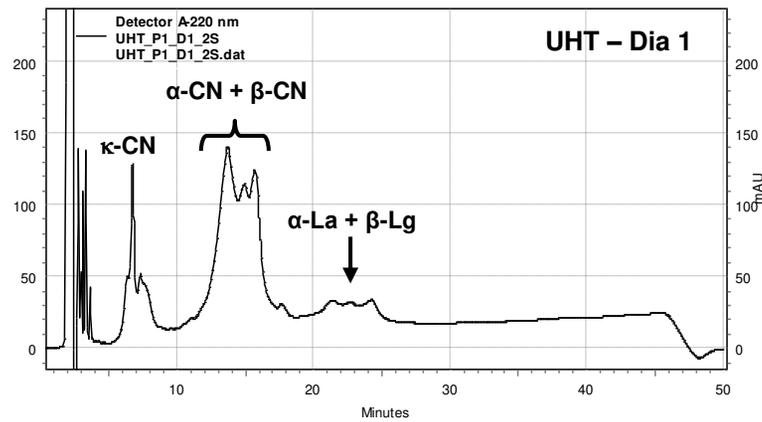


Figura 23. Frações de caseína do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).

Estes resultados correspondem aos dados dos Processamentos 1 e 2. As amostras do Processamento 3 após 120 dias de armazenamento não apresentaram repetibilidade das áreas dos picos e, por isso, os dados referentes a este processamento não foram utilizados. Acredita-se que esse problema deveu-se à uma possível alteração da coluna nesse período de análise. Os cromatogramas referentes ao leite cru (Processamentos 1, 2 e 3) e ao leite UHT e UHT_{CO2} dos Processamentos 2 e 3, assim como os cromatogramas dos padrões individuais utilizados para identificação dos picos, encontram-se no Anexo 1. Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Al-Saadi e Deeth (2008) e Gaucher et al. (2008) observaram a degradação das frações protéicas do leite UHT após 120 e 180 dias de armazenamento, respectivamente.

Simultaneamente, através da avaliação dos peptídeos dos filtrados de leite precipitado em pH 4,6, observou-se que a proteólise no leite UHT e UHT_{CO2} foi promovida tanto pela plasmina quanto pelas proteases termorresistentes produzidas por micro-organismos psicotróficos presentes no leite cru.

Observa-se na Figura 24, que apresenta os cromatogramas com o padrão de peptídeos dos filtrados do leite UHT e UHT_{CO2} em pH 4,6 após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1), que imediatamente após o processamento (Dia 1), os perfis cromatográficos são muito semelhantes e apresentam picos correspondentes à hidrólise tanto por plasmina quanto por proteases microbianas. Ao longo do período de armazenamento a quantidade de peptídeos identificados no leite UHT_{CO2} foi praticamente constante (Figura 24, leite UHT_{CO2} – Dia 1, 60 e 120), sendo mais evidente nesta amostra a hidrólise realizada pela plasmina, uma vez que depois de 120 dias de armazenamento observou-se maior quantidade de peptídeos que eluem após 20 minutos. No leite UHT ocorreu o aumento da concentração de peptídeos durante o período de armazenamento, produzidos tanto pela plasmina (que eluem após 20 minutos) quanto por proteases de psicotróficos (que eluem até 20 minutos), sugerindo maiores índices de proteólise neste leite. Os cromatogramas referentes ao leite cru (Processamentos 1, 2 e 3) e ao leite UHT e UHT_{CO2} dos Processamentos 2 e 3, encontram-se no Anexo 2.

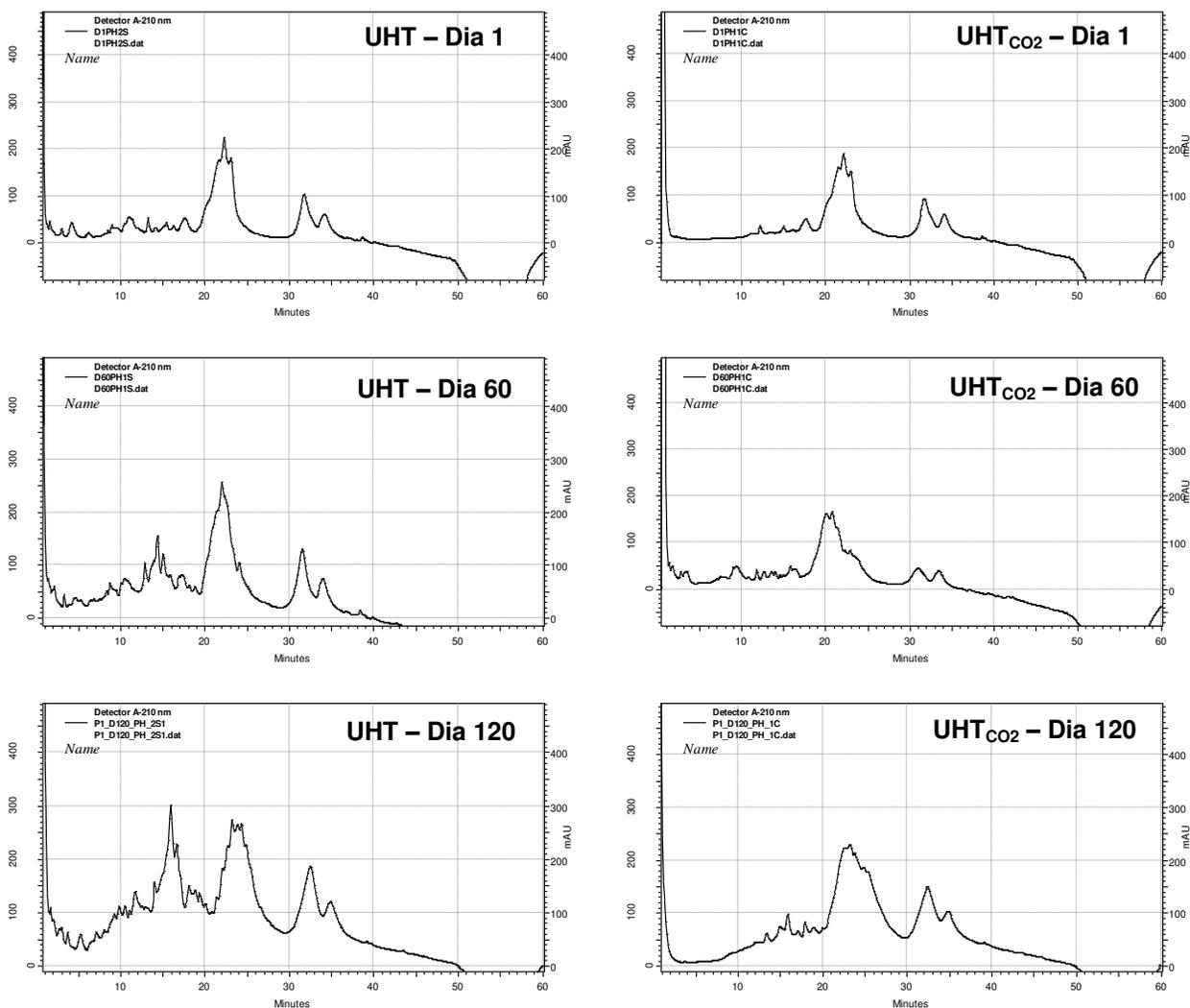


Figura 24. Padrão de peptídeos dos filtrados do leite UHT e UHT_{CO2} em pH 4,6 após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).

O aumento da proteólise possivelmente influenciou na sedimentação do leite UHT. A sedimentação pode ser medida através de método gravimétrico, no qual as embalagens do tipo cartonada tem o leite cuidadosamente esgotado, para pesagem do sedimento que acumula no fundo das caixas. Esta metodologia não pode ser aplicada às embalagens flexíveis utilizadas neste trabalho, pela dificuldade no esgotamento do leite sem homogeneização do sedimento. Apesar de não ter sido avaliada, a sedimentação foi observada em ambas as amostras e foi aparentemente maior no leite UHT (Figura 25).

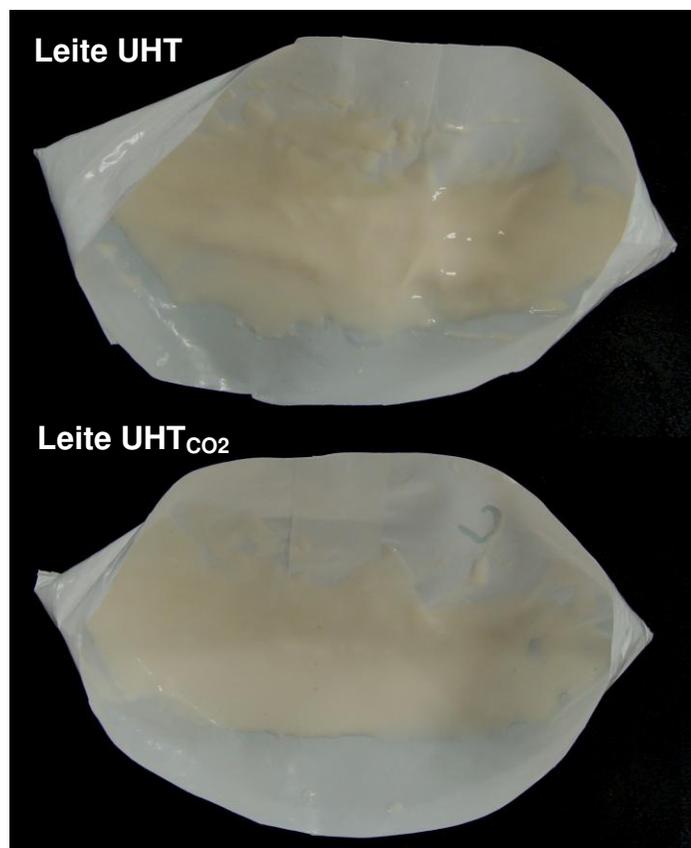


Figura 25. Sedimentação observada no leite UHT e UHT_{CO2}.

O tratamento e o tempo de armazenamento afetaram significativamente a fração NNP/NT (Tabela 7). Independente do tratamento, o NNP/NT aumentou ao longo do tempo (Figura 26) e foi, em média, maior no leite UHT do que no leite UHT_{CO2} ($6,58 \pm 0,32\%$ e $6,30 \pm 0,34\%$, respectivamente).

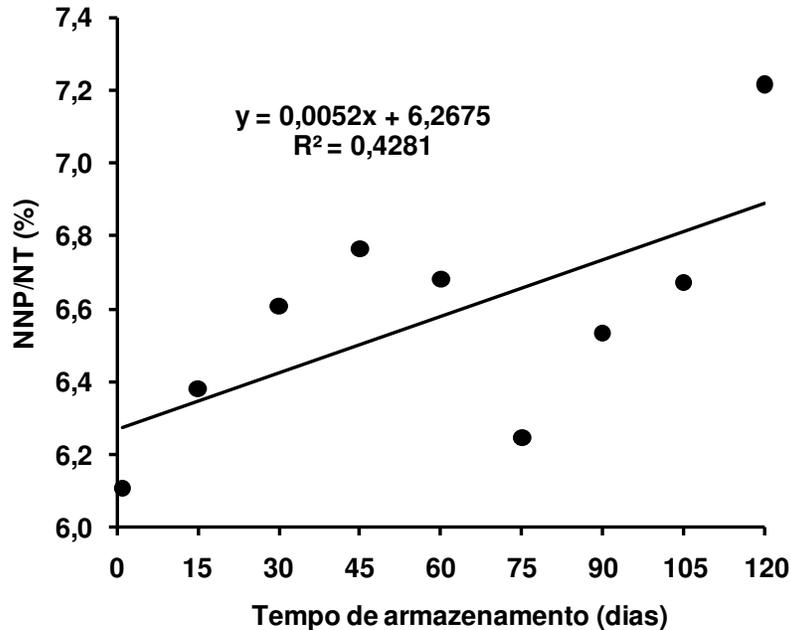


Figura 26. Efeito do tempo de armazenamento sobre o nitrogênio não protéico como porcentagem do nitrogênio total (NNP/NT).

A Figura 27 apresenta os cromatogramas correspondentes aos filtrados obtidos pela precipitação do leite com TCA 24% após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1). Os cromatogramas referentes ao leite cru (Processamentos 1, 2 e 3) e ao leite UHT e UHT_{CO2} dos Processamentos 2 e 3 encontram-se no Anexo 3.

Observa-se na Figura 27 que não foram detectados picos correspondentes à proteólise por micro-organismos, ou seja, que eluem em até 20 minutos, tanto para o leite UHT como para o UHT_{CO2}. Segundo Datta e Deeth (2003), peptídeos produzidos por ação de micro-organismos, os quais são em sua maioria menores que os produzidos por plasmina, seriam detectados após precipitação do leite com TCA. Desta forma, embora tenha se observado proteólise por micro-organismos para ambas as amostras (Figura 24), é provável que os peptídeos formados durante 120 dias de armazenamento sejam ainda precipitáveis pelo TCA 24%, e não foram, portanto, identificados pela cromatografia.

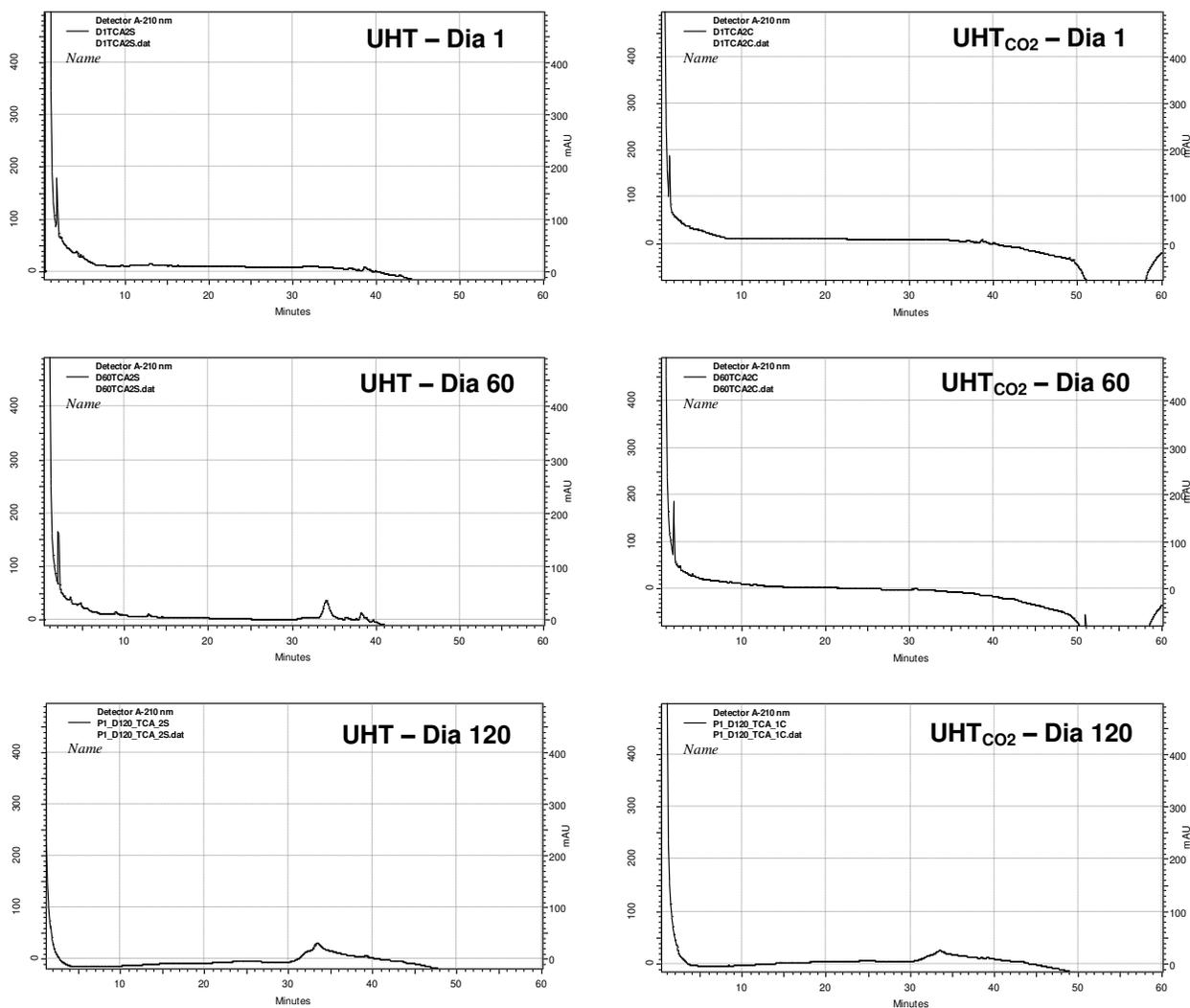


Figura 27. Padrão de peptídeos dos filtrados de TCA do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 1).

Embora alguns pequenos picos produzidos por plasmina, os quais eluem entre 20-40 minutos, tenham sido detectados para ambas as amostras (Figura 27, UHT – Dia 60 e 120; UHT_{CO2} – Dia 120), segundo Datta e Deeth (2003), peptídeos gerados pela ação da plasmina sobre a β -caseína são precipitados pelo TCA e, portanto, não deveriam estar presentes nos filtrados analisados. Esses resultados sugerem que os pequenos picos detectados para ambas as amostras (Figura 27) possam ser originários da hidrólise, por plasmina, de outras frações protéicas, uma vez que todas as frações sofreram hidrólise ao longo do tempo, conforme apresentado na Figura 23.

6. CONCLUSÕES

1. A adição de CO₂ ao leite cru retardou o desenvolvimento microbiano e favoreceu a manutenção da sua qualidade físico-química tanto a 4°C como a 7°C, com maior eficiência na menor temperatura. Amostras armazenadas a 4°C e adicionadas de CO₂ apresentaram menor proteólise e lipólise, relacionado à menor contagem de micro-organismos psicotróficos neste leite.
2. O leite cru adicionado de CO₂ apresentou melhor qualidade físico-química e microbiológica após 6 dias de armazenamento refrigerado, quando comparado ao leite não adicionado de CO₂. O leite UHT obtido a partir de leite cru adicionado de CO₂ apresentou menor proteólise e lipólise durante 120 dias de armazenamento. Em ambas as amostras a hidrólise protéica deveu-se à ação de plasmina e de proteases microbianas, entretanto no leite UHT obtido a partir de leite cru adicionado de CO₂ observou-se menor quantidade de peptídeos liberados pela hidrólise por proteases microbianas.

Os resultados desse trabalho indicaram que a adição de CO₂ manteve a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru durante seu armazenamento refrigerado, o que afetou positivamente a qualidade físico-química do leite UHT. A melhor qualidade microbiológica obtida através da adição de CO₂ ao leite cru resultou num produto UHT com menor proteólise, e, possivelmente, menos susceptível à gelificação.

No Brasil, o leite cru refrigerado é transportado por longas distâncias entre os centros produtores e de beneficiamento, podendo ser processado muitos dias após sua ordenha. Desta forma, a adição de CO₂ ao leite cru, associada às condições adequadas de higiene na ordenha, armazenamento e transporte possibilitariam o beneficiamento de uma matéria-prima de melhor qualidade para o processamento de leite UHT e demais produtos lácteos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SAAD, J. M. S.; DEETH, H. C. Cross-linking of proteins and other changes in UHT milk during storage at different temperatures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 3, p. 93-99, 2008.

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

AMIGO, L.; OLANO, A.; CALVO, M. M. Preservation of raw milk with CO₂. **Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 200, n. 4, p. 293-296, 1995.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Washington, 1995. v. 1-2.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 5, p. 435-457, 1996.

BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 458-463, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, tipo B, tipo C, pasteurizado e Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**: aprovado pela Instrução Normativa Nº 51 de 18/09/2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 08/02/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996**. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18058>>. Acesso em: 19/03/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT)**: aprovado pela Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1252>>. Acesso em: 08/02/2010.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p.119-163.

DANIELS, J. A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIZVI, S. S. H. A review of carbon dioxide effects on microbial growth and food quality. **Journal of Food Protection**, v. 48, n. 6, p. 532-537, 1985.

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

DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; PERKINS, M. L.; DEETH, H. C. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect of heating. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 3, p. 211-227, 2002.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – a review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, n. 2, p. 109-136, 1989.

EMBRAPA (2008). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite. **Estatísticas do leite**. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/>>. Acesso em 08/02/2010.

ENRIGHT, E.; BLAND, A. P.; NEEDS, E. C.; KELLY, A. L. Proteolysis and physicochemical changes in mil on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO₃ addition. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 9, p. 581-591, 1999.

ESPIE, W. E.; MADDEN, R. H. The carbonation of chilled bulk milk. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 5, p. 249-252, 1997.

FAJARDO-LIRA, C.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 4, p. 901-908, 1998.

FAJARDO-LIRA, C.; ORIA, M.; HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2190-2199, 2000.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Black Academic and Professional, 1998, 478p.

GARCÍA-RISCO, M. R.; VILLAMIEL, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Effect of homogenisation on protein distribution and proteolysis during storage of indirectly heated UHT milk. **Lait**, v. 82, n. 5, p. 589-599, 2002.

GAUCHER, I. ; MOLLÉ, D. ; GAGNAIRE, V. ; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 130-143, 2008.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A. J. ; DEETH, H. C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 15-20, 2003.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L., **Applied Dairy Microbiology**. 2ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, p. 59-75.

HAYES, K. D.; NIELSEN, S. S. Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 387-394, 2000.

HOTCHKISS, J. H.; WERNER, B. G.; LEE, E. Y. C. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 5, p. 158-168, 2006.

HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. T. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 690-695, 1999.

KELLY, A. L.; O'FLAHERTY, F.; FOX, P. F. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 563-572, 2006.

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 707-715, 2006.

KING J. S.; MABBITT, L. A. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Research**, v. 49, n. 3, p. 439–447, 1982.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Effects of a low concentration of added plasmin on Ultra-High temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1151-1156, 1991.

LANARA. Secretaria de Defesa Agropecuária. M. A. **Métodos Analíticos Oficiais de Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes**. II - Métodos Físicos e Químicos. Brasília-DF: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1981.

LE, T. X.; DATTA, N.; DEETH, H. C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 823-830, 2006.

LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. The use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. In: SMIT, G. **Dairy processing: Improving quality**. Boca Raton: CRC Press, 2000, p. 391-416.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 1959-1968, 2001.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1616-1631, 2003.

McMAHON D. J. Age-gelation of UHT milk: changes that occur during storage, their effect on shelf life and the mechanism by which age-gelation occurs. In: **Heat Treatments and Alternative Methods**. International Dairy Federation, Brussels, p. 315-326, 1996.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. UHT thermal processing of milk. In: SUN, D. **Thermal Food Processing: New technologies and quality issues**. Boca Raton: CRC Press, 2006, p. 299-334.

MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1932-1940, 2003.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

MUIR, D. D.; BANKS, J. M. Factors affecting the shelf-life of milk and milk products. In: SMIT, G., **Dairy Processing – Improving Quality**. Boca Raton: CRC Press, 2003, p. 185-207.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. de A. F.; PINTO, J. P. de A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

NOGUEIRA, M. P. (2006) Comissão Técnica de Bovinocultura de Leite. **2005: O ano da reviravolta para o leite**. Disponível em: <<http://www.faep.com.br/comissoes/leite/130206.asp>>. Acesso em: 20/01/2010.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrófilas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2009.

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

RASHED, M.A.; MEHANNA, N. M.; MEHANNA, A. S. Effect of carbon dioxide on improving the keeping quality of raw milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 39, n. 2, p. 62-64, 1986.

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

ROBERTS, R. F.; TORREY, G. S. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 52-60, 1988.

RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C.G.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Influence of refrigeration and carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels, free monosaccharides and *myo*-inositol content of raw and pasteurized milk. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 1, p. 44-47, 2000.

RUAS-MADIEDO, P.; BASCARÁN, V.; BRAÑA, A.F.; BADA-GANCEDO, J.C.; REYES-GAVILÁN, C.G. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1552-1555, 1998.

RUAS-MADIEDO, P.; BADA-GANCEDO, J.C.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; DE LLANO, D. G.; REYES-GAVILÁN, C.G. Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw milk by carbon dioxide addition: A pilot-scale study. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 5, p. 502-508, 1996.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ALVES, R. M. V.; OLIVEIRA, L. M; GOMES, T. G. **Embalagens com atmosfera modificada.** Campinas: CETEA/ITAL, 1996, 114p.

SHIPE, W. F.; SENYK, G. F.; FOUNTAIN, K. B. Modified copper soap solvent extraction method for measuring free fatty acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 2, p. 193-198, 1980.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CERESER, N. D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 758-761, 2009.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-40, 1997.

TOPÇU, A.; NUMANOĞLU, E.; SALDAMLI, İ. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 633-638, 2006.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; JUNIOR, O. D. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

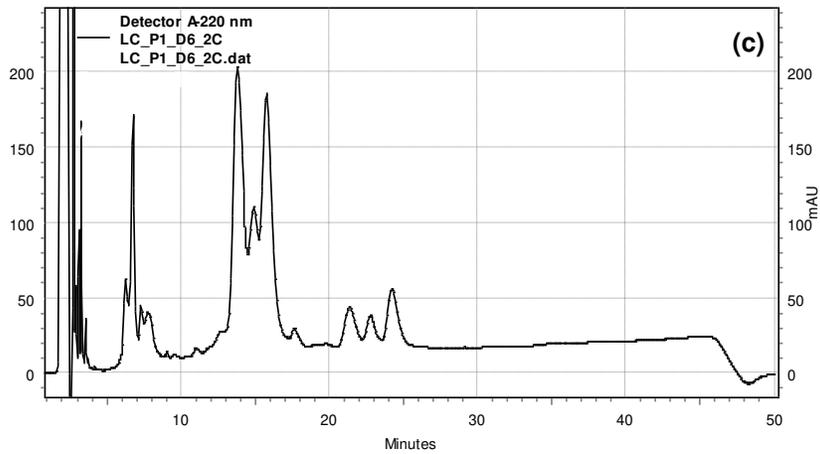
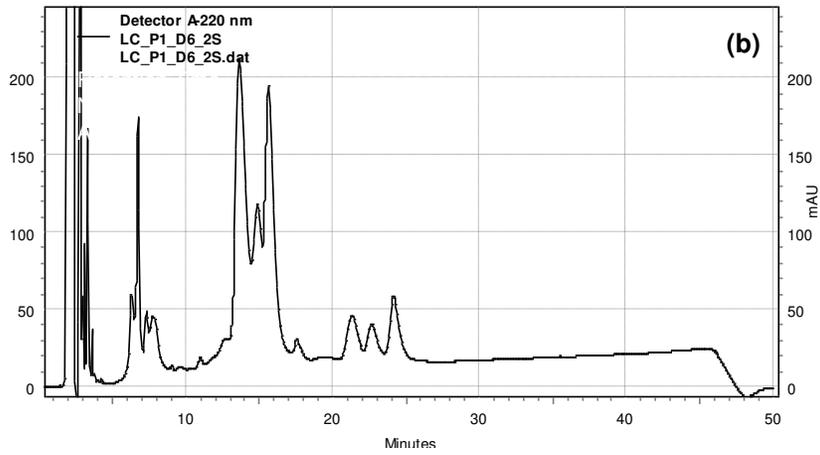
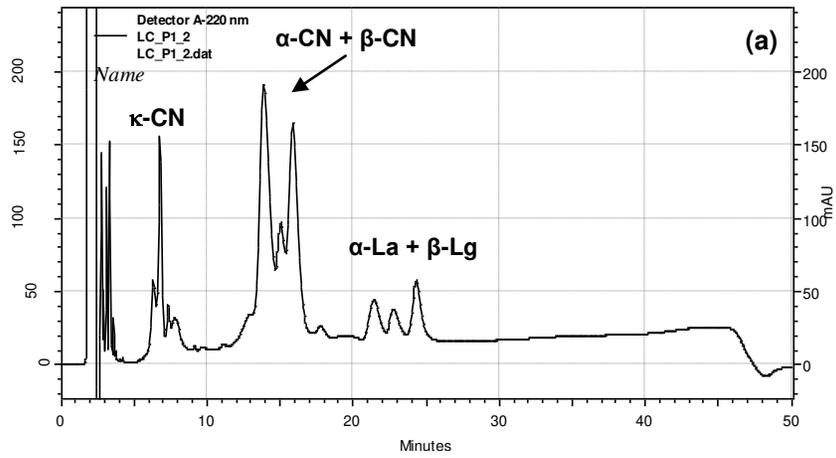
WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 762p.

ANEXO 1

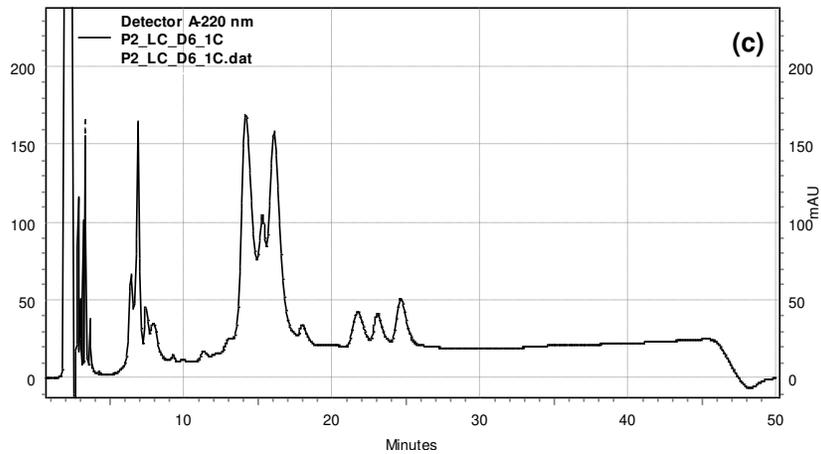
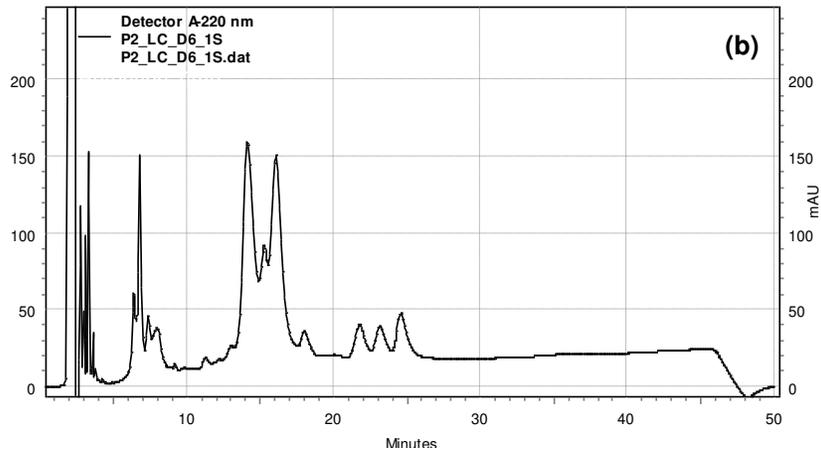
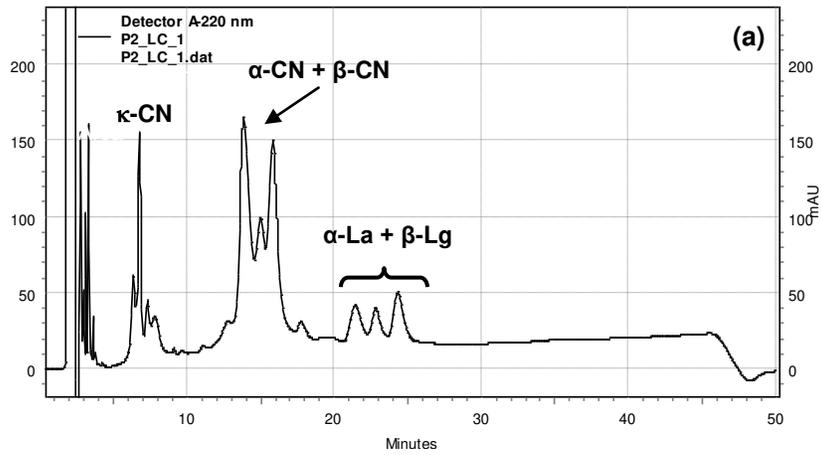
Cromatogramas das frações de caseína do leite cru no Dia 0 e após 6 dias de armazenamento refrigerado (Processamentos 1, 2 e 3).

Cromatogramas das frações de caseína do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamentos 2 e 3).

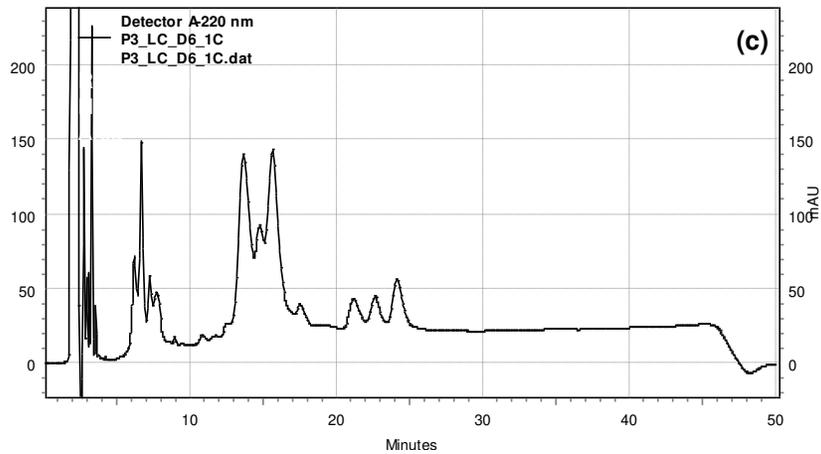
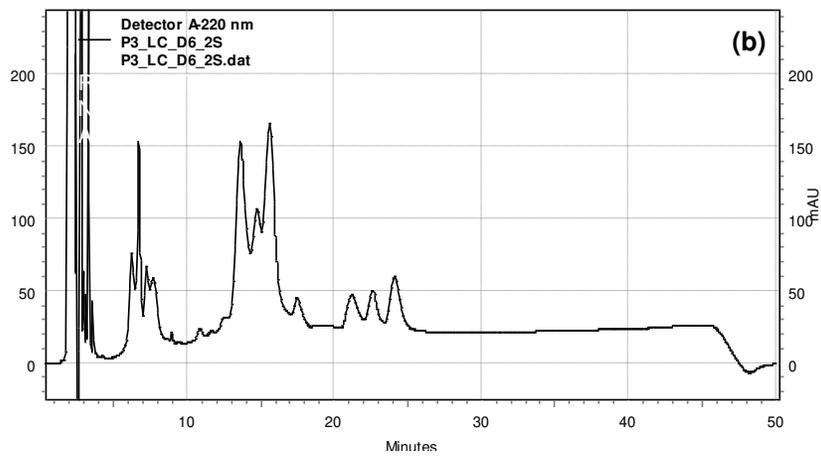
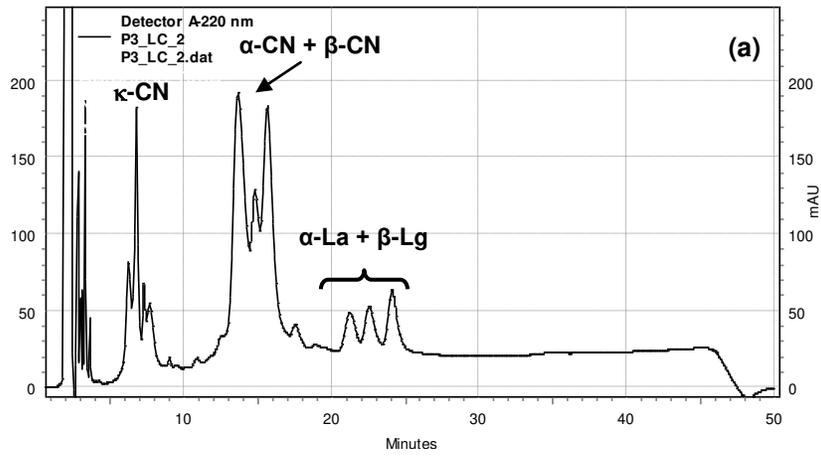
Cromatogramas dos padrões de caseína utilizados para identificação dos picos cromatográficos.



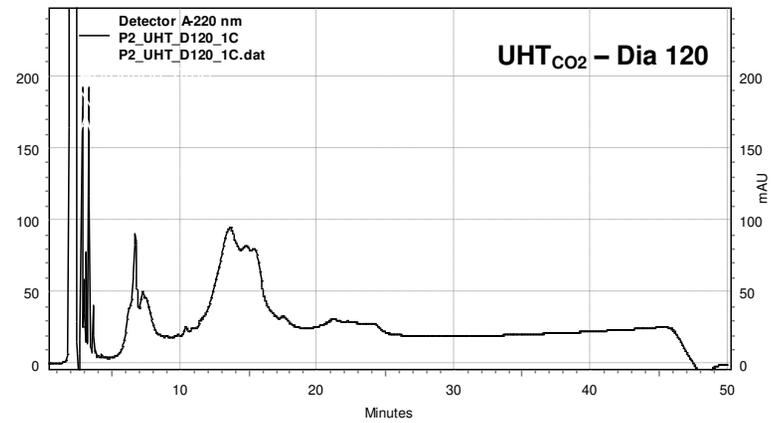
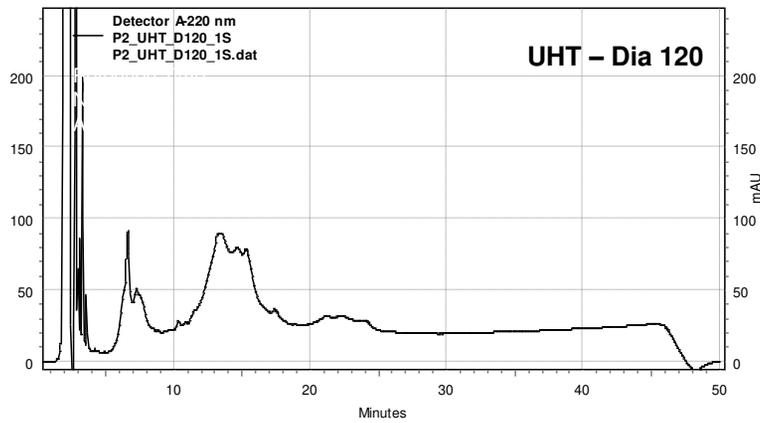
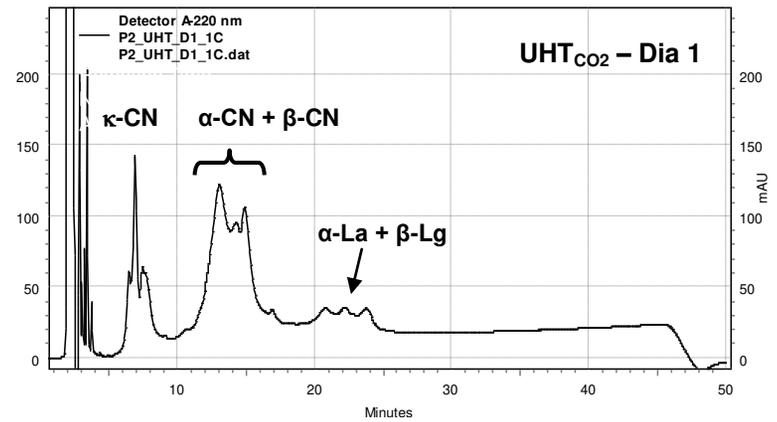
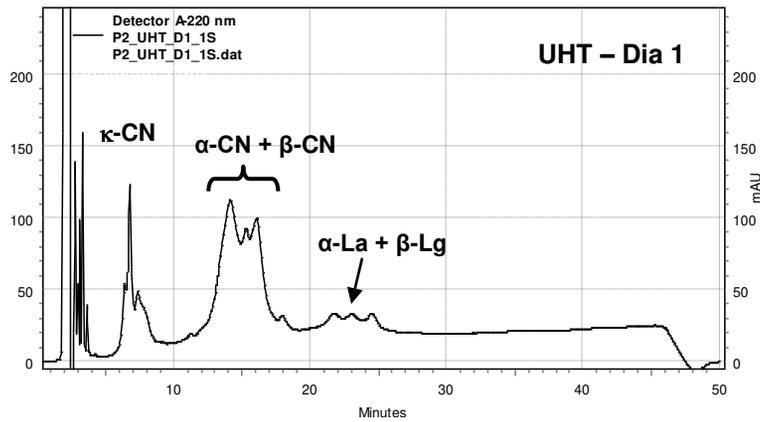
Frações de caseína: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 1).



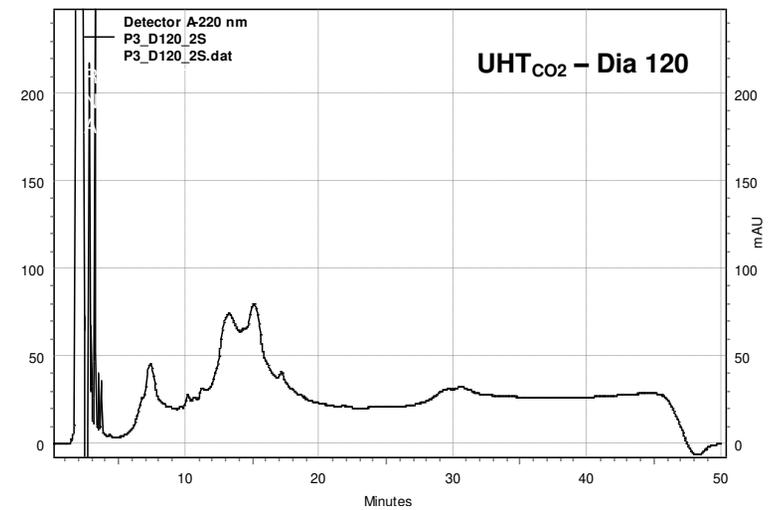
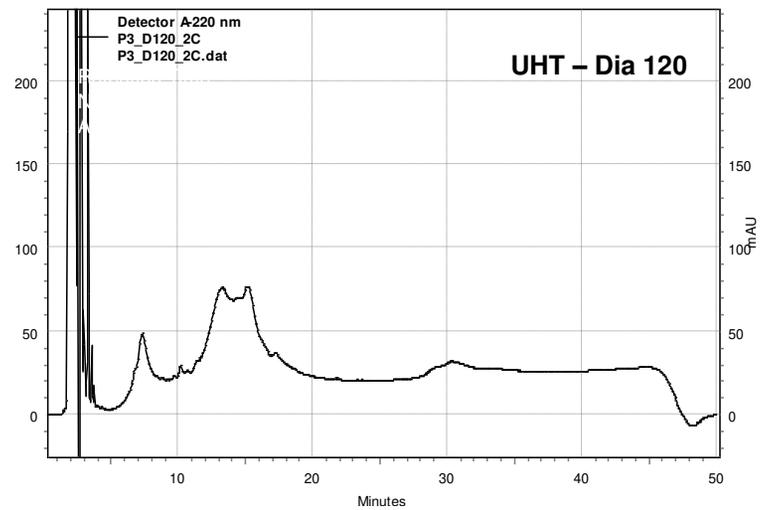
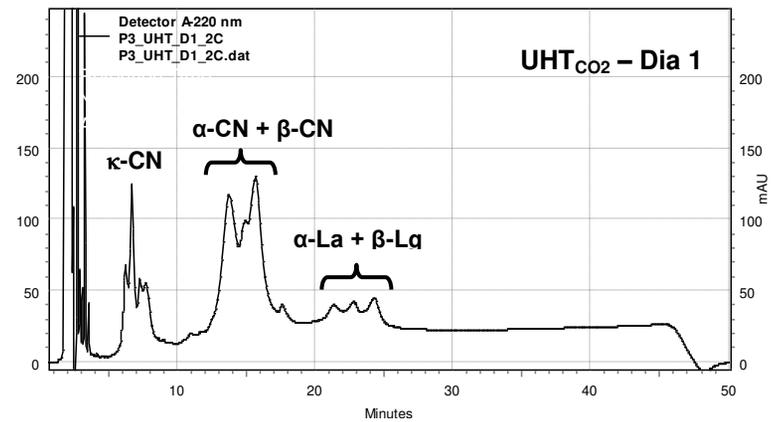
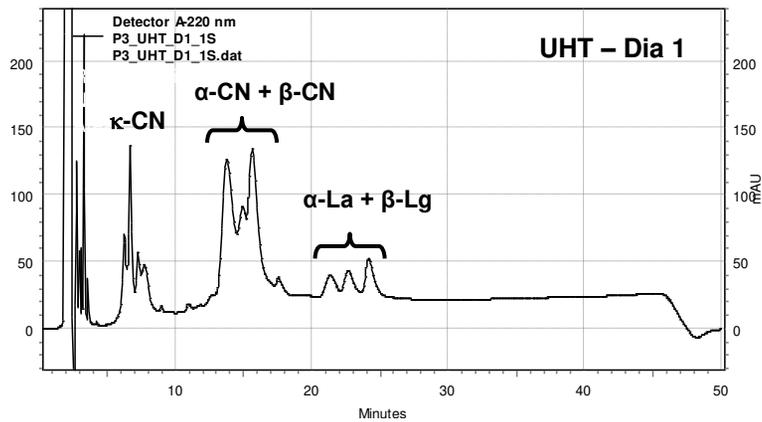
Frações de caseína: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 2).



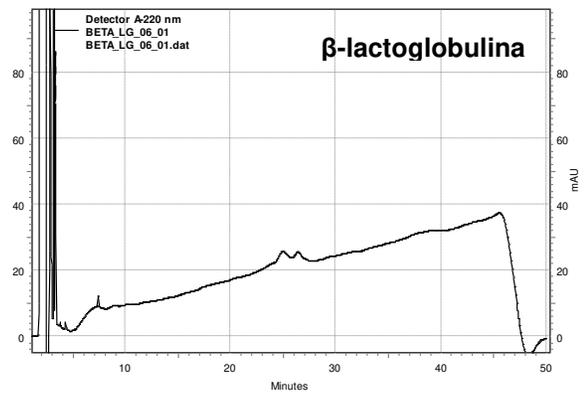
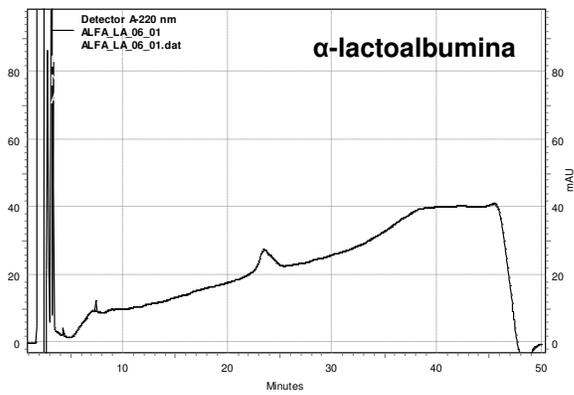
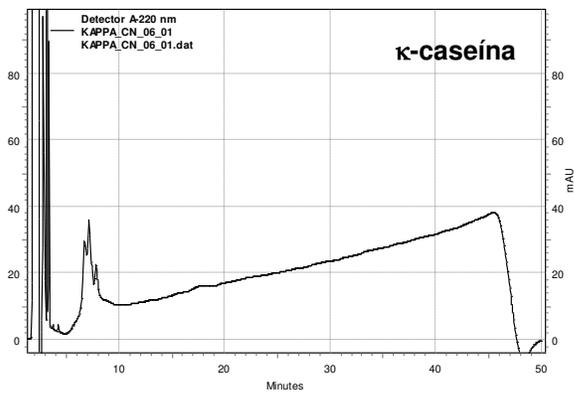
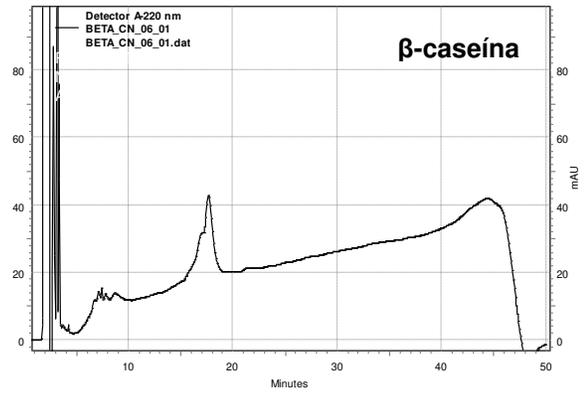
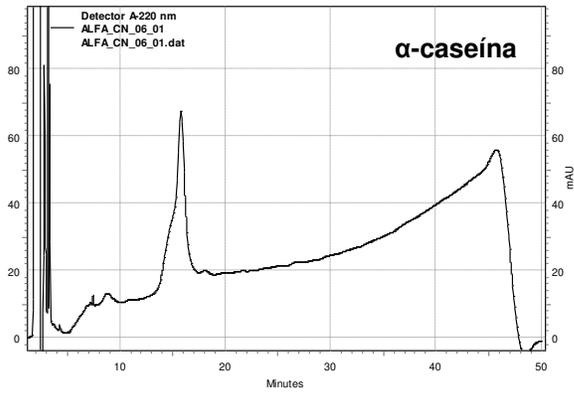
Frações de caseína: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 3).



Frações de caseína do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamento 2).



Frações de caseína do leite UHT e UHT_{CO2} após 1 e 120 dias de armazenamento (Processamento 3).

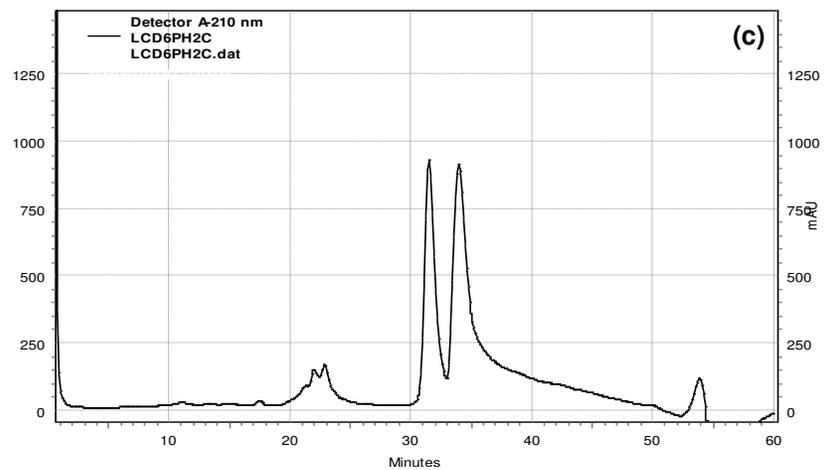
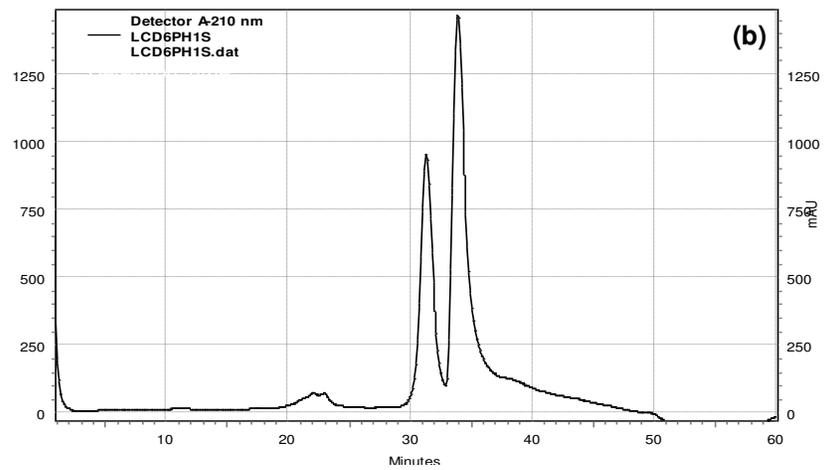
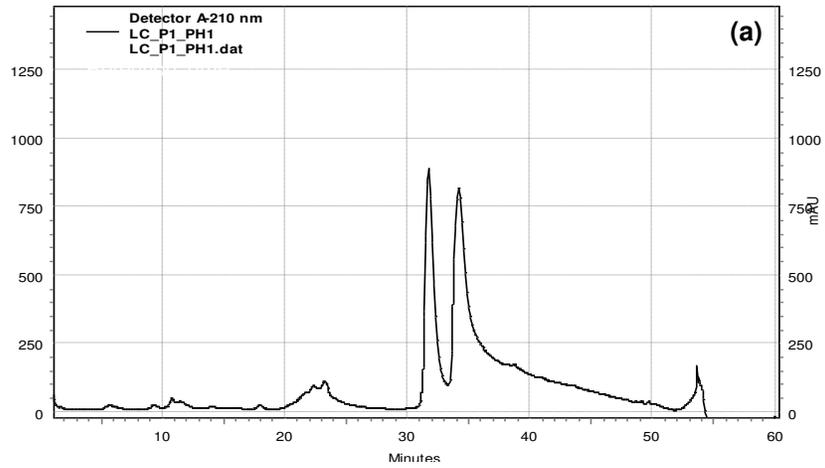


Padrões de caseína utilizados para localização dos picos nos cromatogramas.

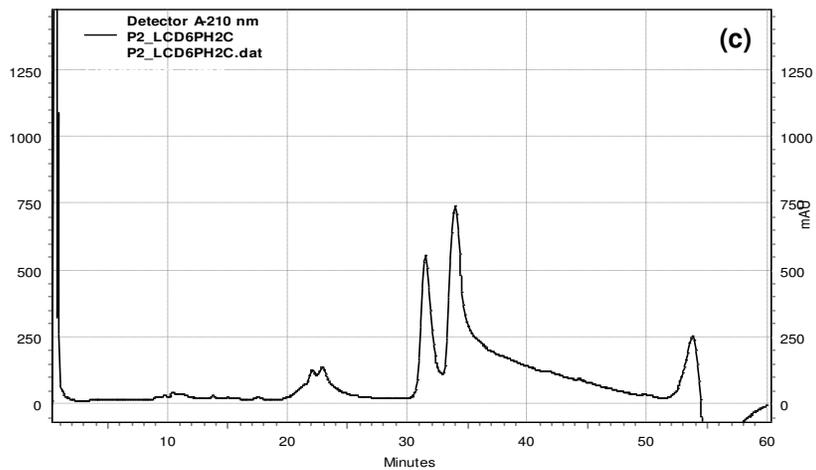
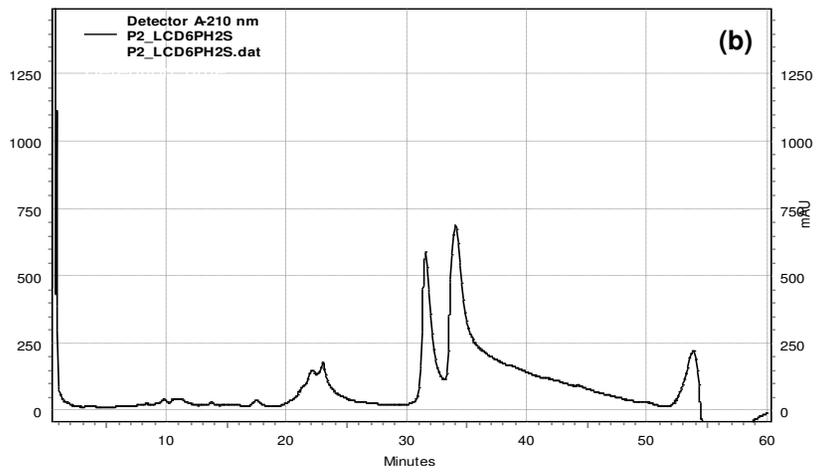
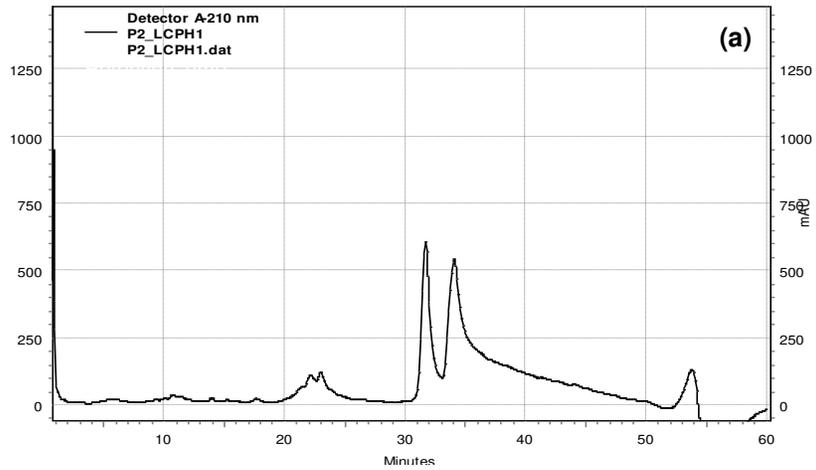
ANEXO 2

Padrão de peptídeos dos filtrados em pH 4,6 do leite cru no Dia 0 e após 6 dias de armazenamento refrigerado (Processamentos 1, 2 e 3).

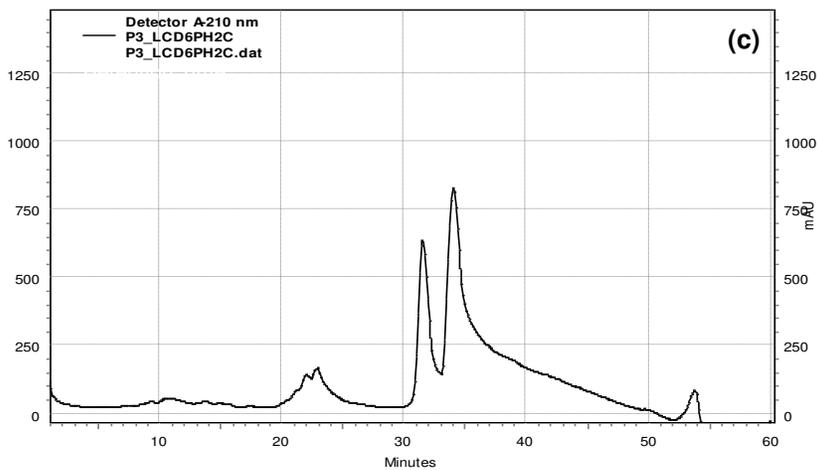
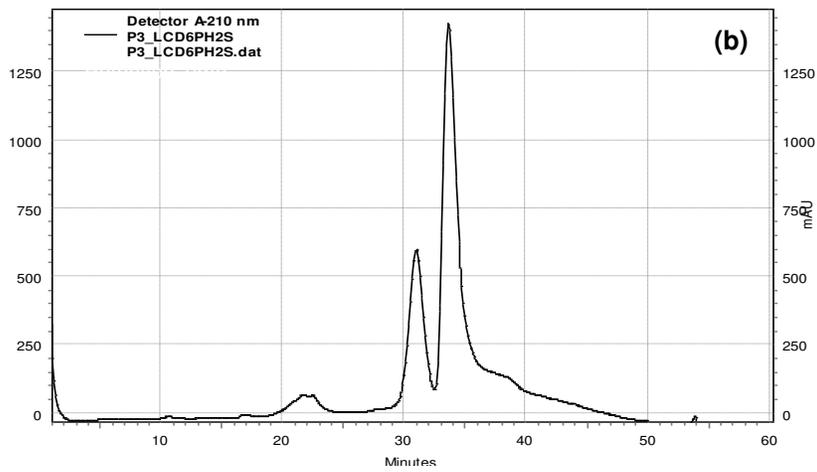
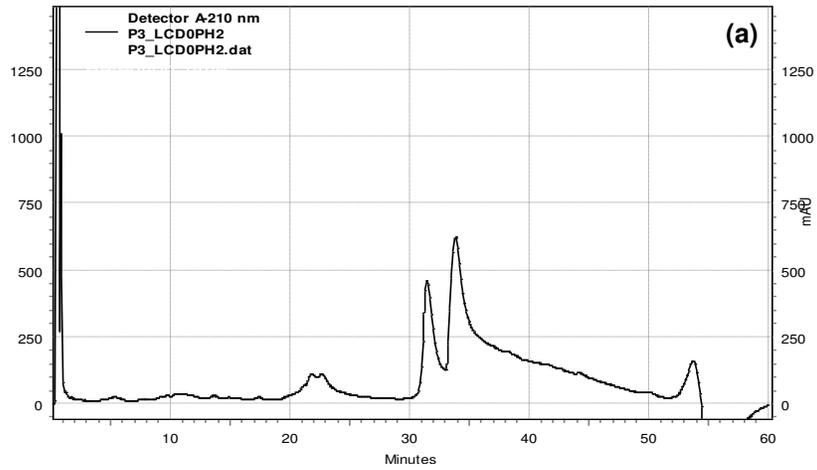
Padrão de peptídeos dos filtrados em pH 4,6 do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamentos 2 e 3).



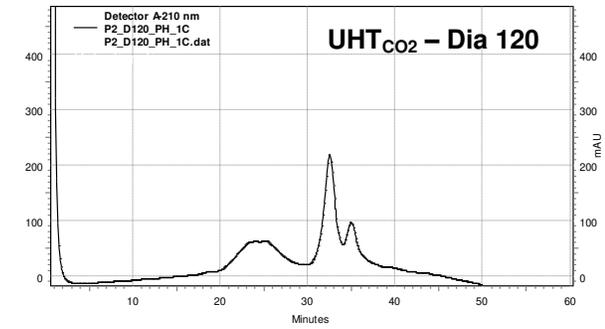
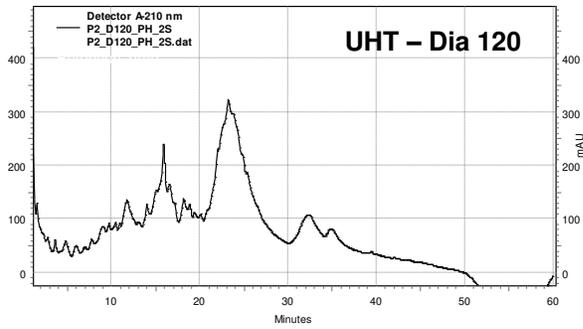
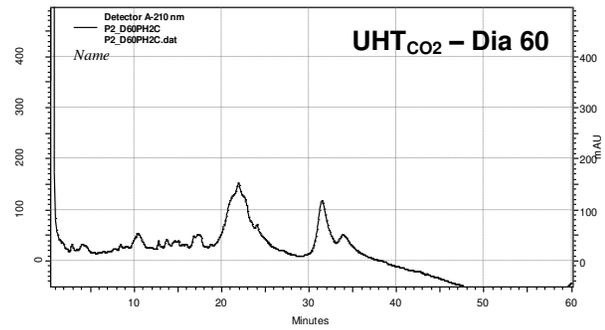
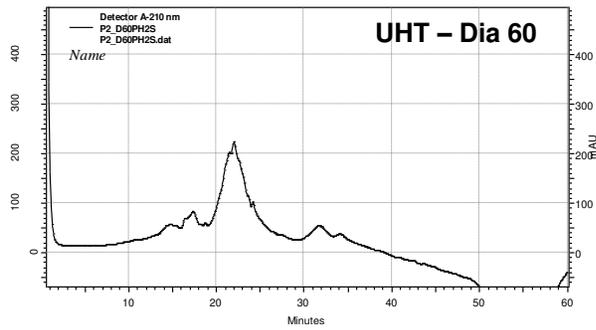
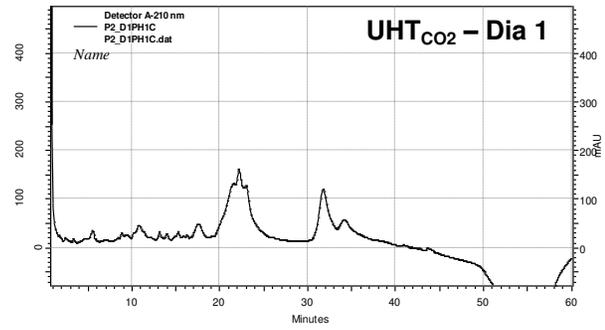
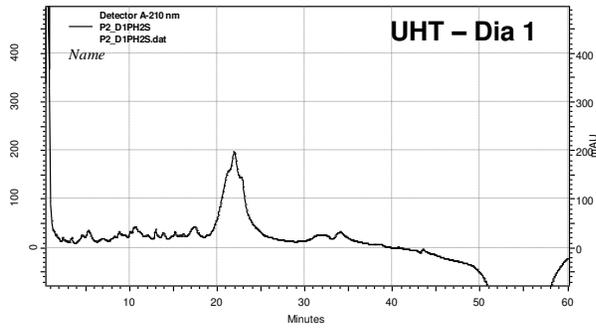
Padrão de peptídeos dos filtrados em pH 4,6: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 1).



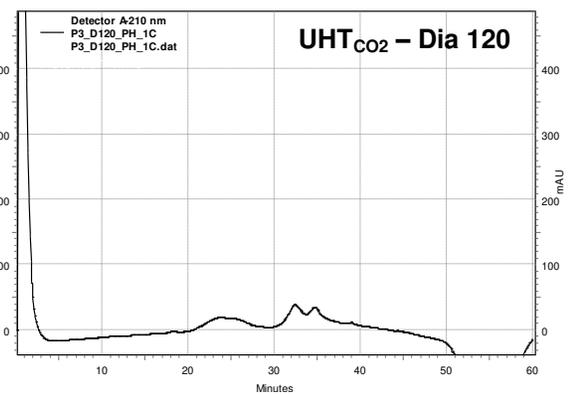
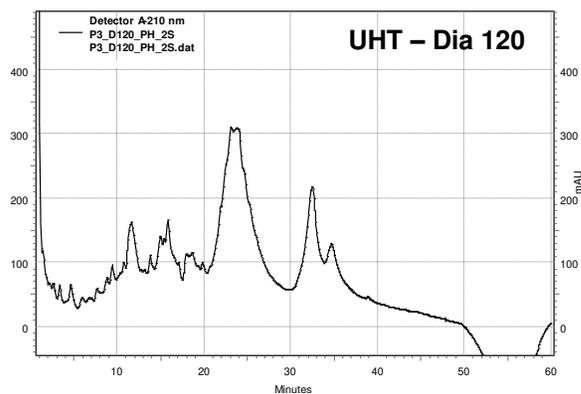
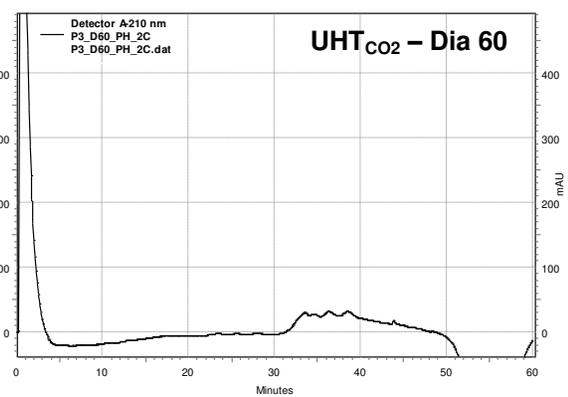
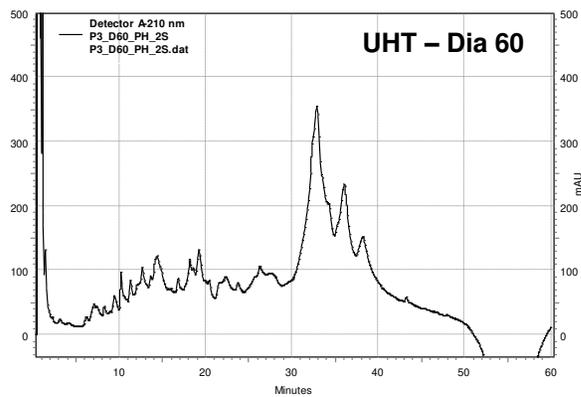
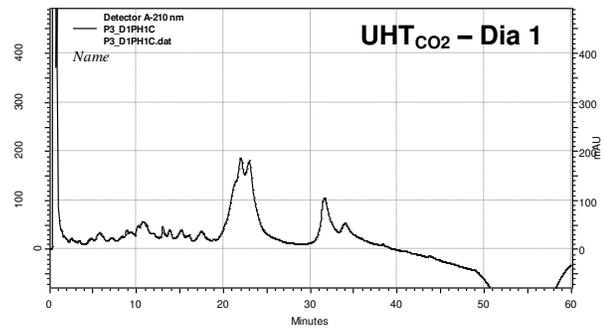
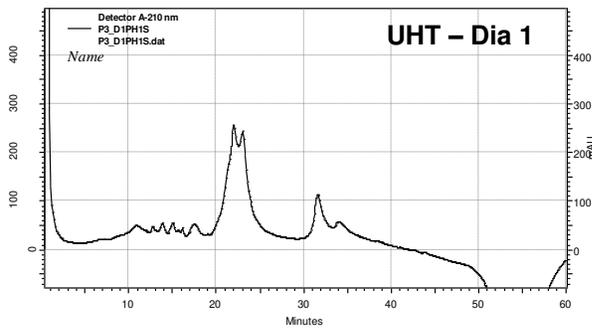
Padrão de peptídeos dos filtrados em pH 4,6: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 2).



Padrão de peptídeos dos filtrados em pH 4,6: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 3).



Padrão de peptídeos dos filtrados de leite precipitado em pH 4,6 do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 2).

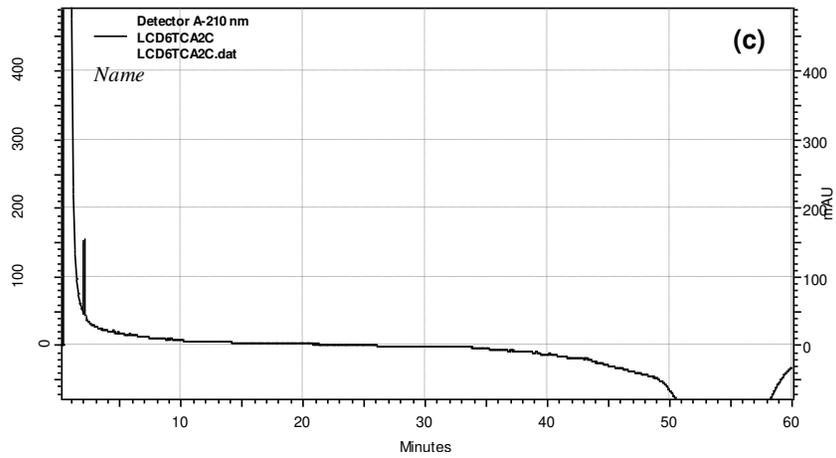
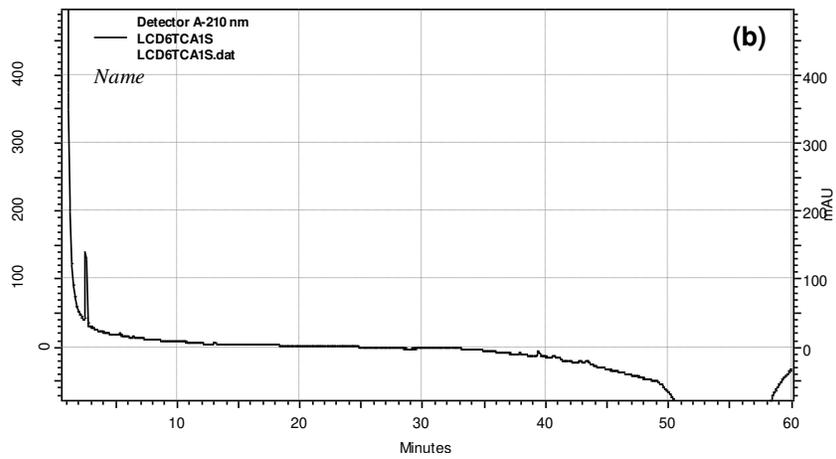
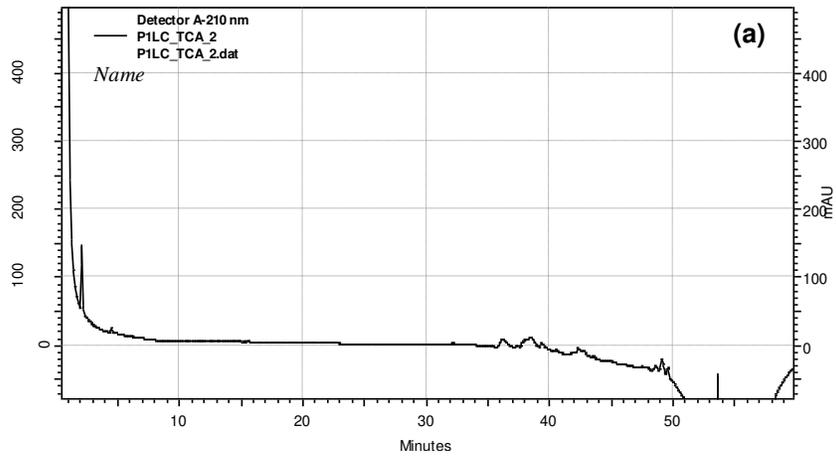


Padrão de peptídeos dos filtrados de leite precipitado em pH 4,6 do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 3).

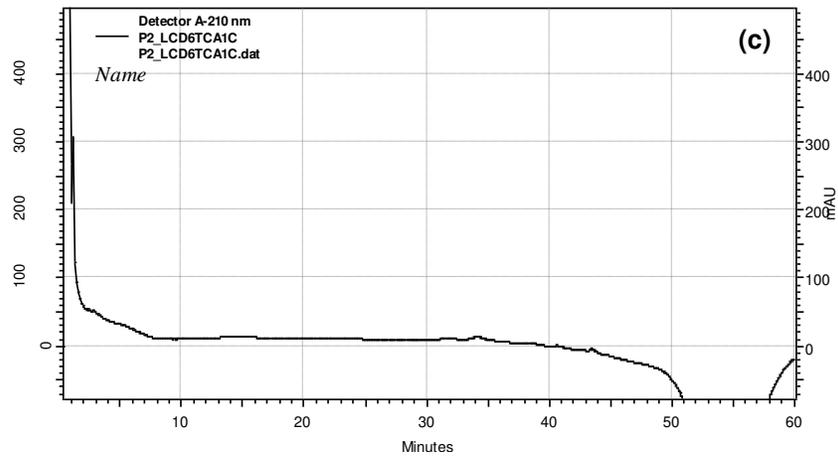
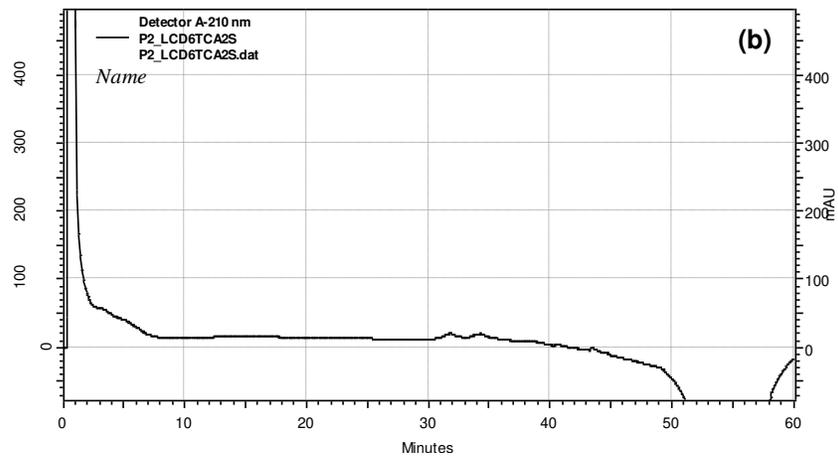
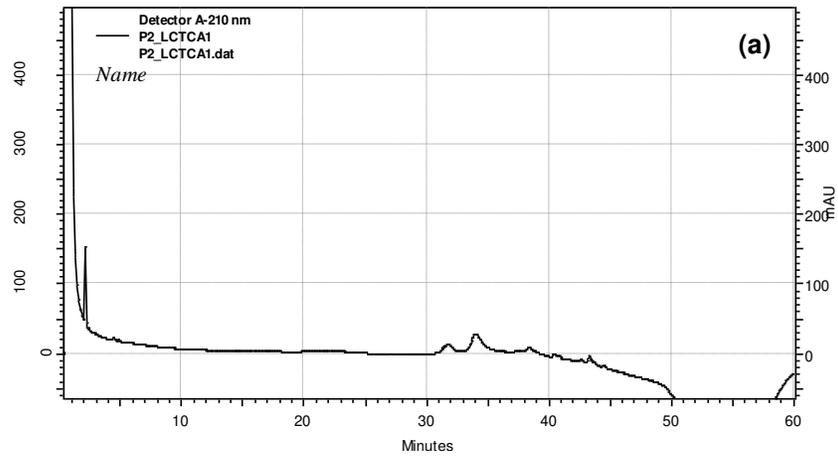
ANEXO 3

Padrão de peptídeos dos filtrados em TCA do leite cru no Dia 0 e após 6 dias de armazenamento refrigerado (Processamentos 1, 2 e 3).

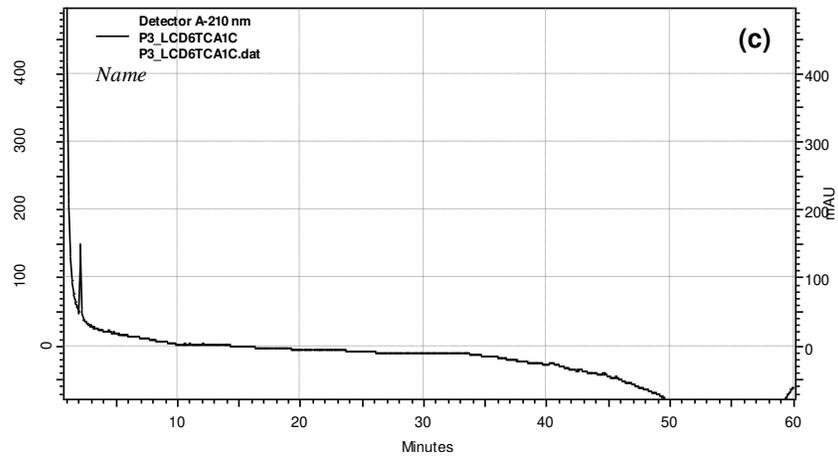
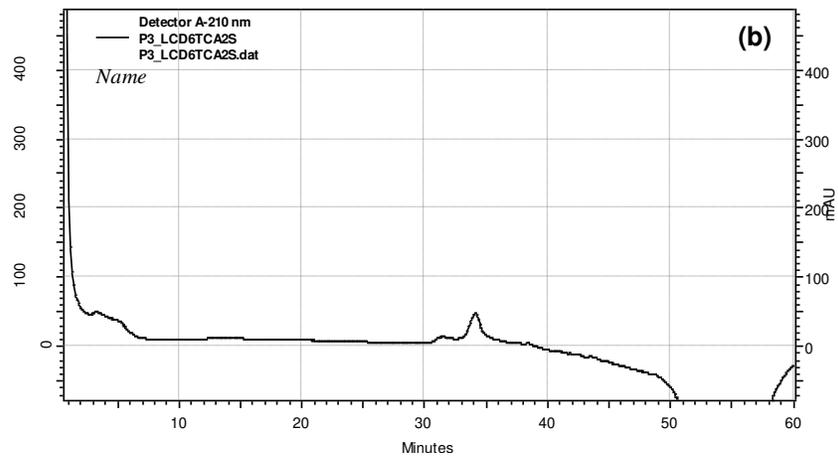
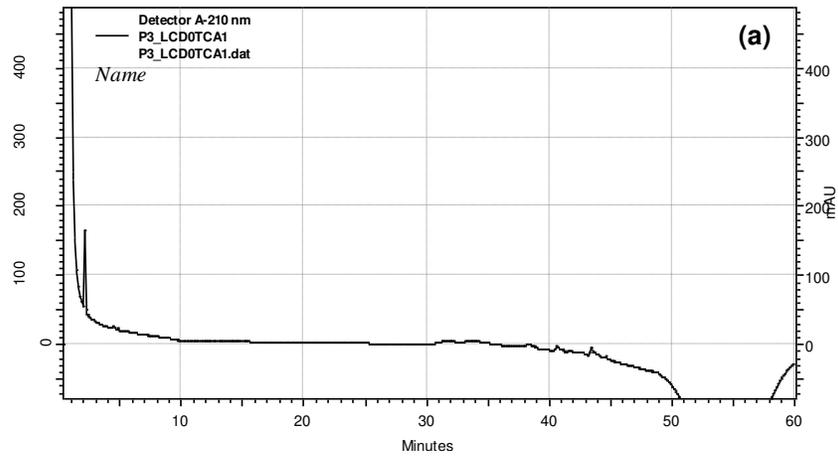
Padrão de peptídeos dos filtrados em TCA do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamentos 2 e 3).



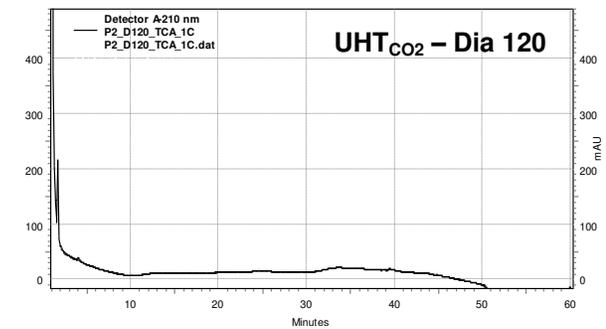
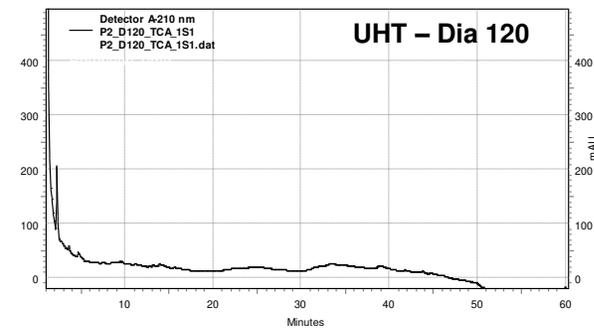
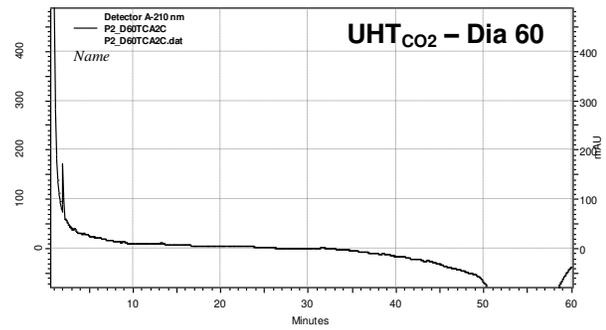
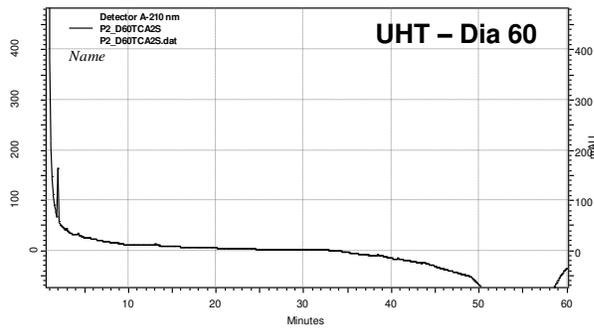
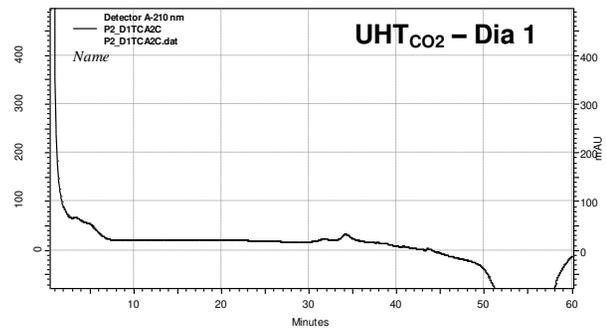
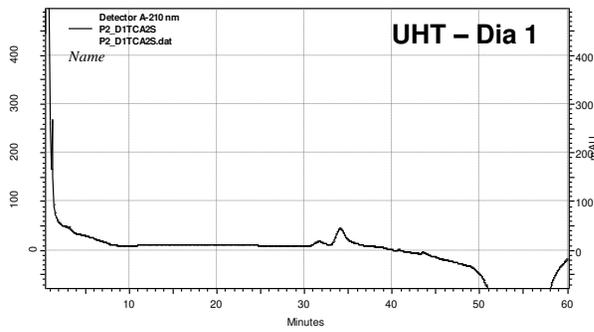
Padrão de peptídeos dos filtrados de TCA: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 1).



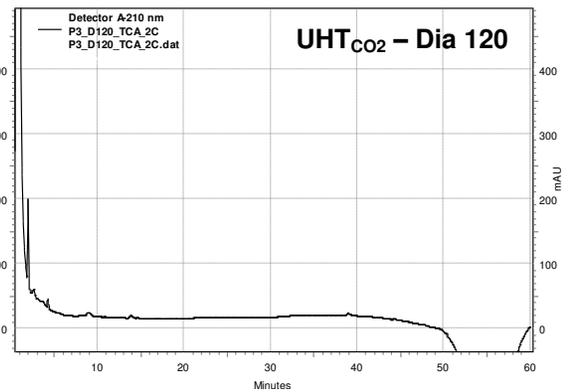
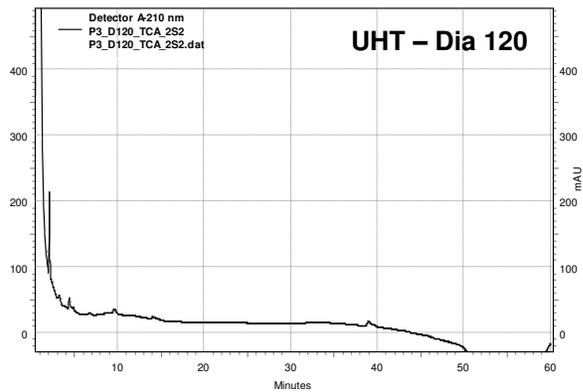
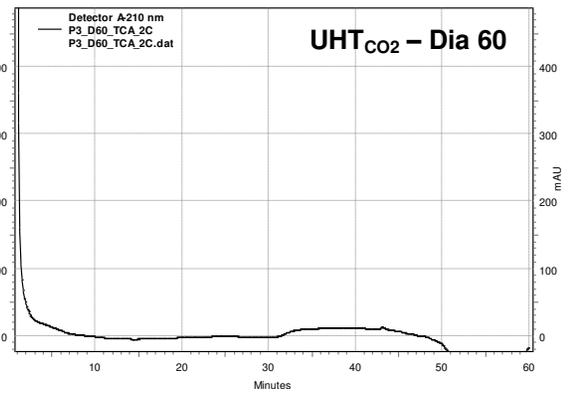
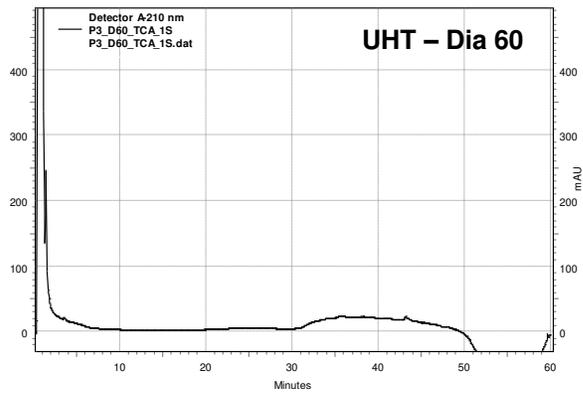
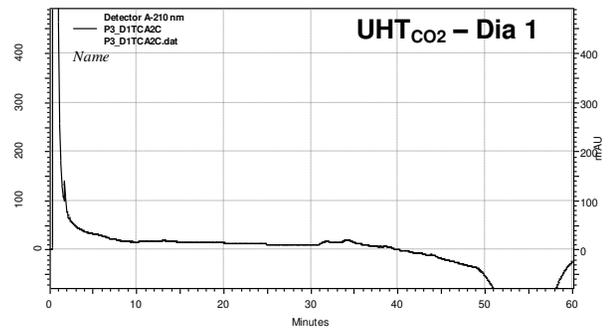
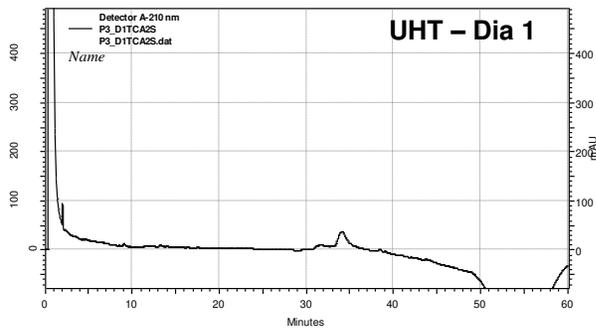
Padrão de peptídeos dos filtrados de TCA: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 2).



Padrão de peptídeos dos filtrados de TCA: (a) leite cru no dia da recepção; (b) leite cru sem adição de CO₂ e (c) leite cru adicionado de CO₂ após 6 dias de armazenamento a 4°C (Processamento 3).



Padrão de peptídeos dos filtrados em TCA do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 2).



Padrão de peptídeos dos filtrados em TCA do leite UHT e UHT_{CO2} após 1, 60 e 120 dias de armazenamento (Processamento 3).