

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

**INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA
DE ARMAZENAMENTO DE LEITE CRU NA VIDA DE
PRATELEIRA DE LEITE UHT EM EMBALAGEM
FLEXÍVEL E ESTOCAGEM SOB LUZ**

Milena Olivieri Lisita

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Doutora em Tecnologia de Alimentos

Campinas - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L687i Lisita, Milena Olivieri
Influência da variação da temperatura de armazenamento de leite cru na vida de prateleira de leite UHT em embalagem flexível e estocagem sob luz / Milena Olivieri Lisita. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto
Tese (dourado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Leite UAT. 2. Leite cru. 3. Estocagem. 4. Vida de prateleira. 5. Embalagem flexível. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Influence of raw milk storage temperature on the shelf-life of flexible packaged UHT milk and its storage under light

Palavras-chave em inglês (Keywords): UHT milk, Raw milk, Storage, Shelf-life, Flexible packaged

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto

José de Assis Fonseca Faria

Salvador Massaguer Roig

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Rodrigo Rodrigues Petrus

Data de defesa: 29/07/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

**Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em
29/07/2010 por Milena Olivieri Lisita aprovado pela comissão julgadora
em 29/07/2010**

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Orientadora)

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria
(Membro)

Profa. Dra. Mirna Lucia Gigante
(Membro)

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus
(Membro)

Profa. Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
(Membro)

Prof. Dr. Ernani Porto
(Membro)

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Membro)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro)

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Alexei, meu
esposo e a Ana Maria, minha mãe.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Alexei por todo amor, carinho, apoio, companheirismo, por acreditar na minha capacidade, por toda paz que sempre me transmite e pelas traduções.

À minha mãe Ana, por me compreender tão bem, me incentivar, pelo amparo, confiança, amizade e união.

Ao meu irmão Frederico, que apesar de longe, está sempre no meu coração. Obrigada Fre, por sua alegria contagiante.

Ao meu pai, que mesmo não estando mais neste plano, é o responsável pela minha formação e caráter. Saudades.

À minha orientadora Walkiria, pela orientação e pelos ensinamentos.

Aos membros e suplentes da banca examinadora, Assis, Rodrigo Petrus Patrícia, Mirna, Arnaldo, Ernani e Salvador pelas correções, sugestões e disponibilidade.

Ao Eduardo, não só pela amizade, mas por todo esforço, dedicação na execução deste trabalho. E novamente ao prof. Assis, por conceder a parceria.

Aos amigos Wellington e Claudio, pela grande e exaustiva ajuda nos processamentos.

Às minhas estagiárias, Jaqueline e Verediane, por toda ajuda e disposição.

À minha querida amiga e madrinha de casamento, Dani, por ser sempre companheira e pela boa vontade em me ajudar na parte burocrática. Valeu flor!

Aos amigos pela ótima convivência e por me trazerem tantas alegrias durante o tempo de doutorado, Leilane, Bruno, Adriano, Carol, Sergio, Bárbara, Bebel, Thiago, Noelia, Ana Patrícia, Mari, Atílio, Pri Mamede, Anderson, Luz, Mari Machione, Mari Kikuchi, Camila Lie, Meg, Leandra, Rita, Eliza, Gaby, Camila Baptista, Homero, Márcio, Marcília, Bobby, Alessandra, Vanessa, Paula, Leomar, Lu Esper, Lu Fontes, Pamela, Andréa, Zé Emílson, Larissa, Manú, Ju Perri, Marina e Carlos. E aos de fora da FEA, Dani dos Santos, Wilon, Melissa, Dani Sampaio, Surya, Almas, Moniquita, Rodrigo, Chico, Vitor, Akira, Fabinho, Fabiano, Michele, Ítalo, Letícia, Jacaré, Salvador, Luis, Hugo, Flavinho, Rogério, Paulo, Sérgio e Ana Luiza.

Às amigas do laboratório, Monica, Ligia, Clarice, Pri Vianna, Kizzy, Livia, Renata, e em especial às queridas Renata Perez e Veridiana.

À Bete do laboratório de Leite, pela amizade e ajuda. À valiosa colaboração, nos laboratórios, de Ana Lourdes, Diana e Mariana (Microbiologia), Dirce (Higiene), Renata (Instrumentação), Alice (Embalagem), Zé Roberto (Carnes) e Camila (LER-DEA).

Aos demais funcionários da FEA, especialmente a Marlene, Jaime, Tânia, Luciana, Denir, Leonel, Aauto, Ana Maria, Oscar, Maria José, Cosme e Marcos, por toda atenção.

Aos funcionários do setor de Orteses e Proteses do HC, por salvarem minha coluna.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“There's real poetry in the real world. Science is the poetry of reality.”

Richard Dawkins

RESUMO GERAL

Leite cru foi armazenado por três dias sob três temperaturas (3, 7 e 10°C) para a utilização em processamento de leite longa vida (ou UHT - *ultra high temperature*) em embalagem flexível, de polietileno de baixa densidade (PEBD). Também foi produzido leite UHT com leite cru da ordenha do dia (amostra controle), totalizando, portanto, 4 tratamentos. Os lotes de leite UHT foram estocados no escuro à temperatura ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura de armazenamento do leite cru sobre sua qualidade, e a qualidade e vida de prateleira do leite UHT com ele produzido. Foi verificado maior desenvolvimento bacteriano, de mesófilos e psicrotróficos aeróbios e *Pseudomonas* spp., no leite cru armazenado a 10°C/ 3 dias quando comparados aos armazenados a 3 e 7°C pelo mesmo período de tempo. Da mesma forma, o leite UHT produzido a partir de leite cru que foi armazenado por 3 dias à 10°C, apresentou maiores extensões de lipólise, possivelmente pela maior atividade enzimática das enzimas termorresistentes de psicrotróficos. Não houve aumento de viscosidade. Na oitava semana de estocagem, todos os lotes de leite UHT, inclusive o controle feito com leite fresco, foram rejeitados pelos provadores através dos atributos de sabor e impressão global. Concluiu-se que o leite UHT em embalagem flexível produzido a partir de leite cru refrigerado de boa qualidade e armazenado por três dias antes do processamento, apresentou vida de prateleira máxima de 7 semanas quando estocado no escuro à temperatura ambiente. Em outro experimento, o leite UHT em embalagem flexível (PEBD + 1,5% TiO₂) foi exposto à luz (1920 ± 100 lux) pelo período de 72h com o objetivo de avaliar a qualidade do produto nessas condições de estocagem. Os resultados mostraram um aumento da oxidação lipídica com o tempo e rejeição dos provadores a partir de 24h de exposição, mostrando que o leite UHT nesta embalagem necessita de uma barreira complementar à luz.

ABSTRACT

Raw milk was stored for three days under three different temperatures (3, 7 and 10°C) for use in UHT milk processing, and then stored in flexible low density polyethylene (LDPE) package. UHT milk was also made from raw milk taken from same day milking (control sample), therefore completing a total of 4 different treatments. The milk was later stored in dark, room temperature conditions. The objective of this work was to evaluate the influence of temperature on the quality of the milk, and on the shelf life and quality of UHT milk made from it. A larger bacterial development, of aerobic mesophilic and psychrotrophic and *Pseudomonas* spp was verified. In the same way, the UHT Milk made from raw milk stored for three days showed more lipolysis, possibly due to psychrotrophic thermoresistant enzyme action. No increase in viscosity was detected. On the eighth week of storage, all the UHT milk samples, including the control sample, were rejected by the panellists on the attributes of taste and general impression. This lead to the conclusion that when stored in flexible package under dark room temperature conditions, the UHT milk made from good quality raw milk, even when submitted to a three day refrigeration abuse, presents a maximum shelf life of 7 weeks. In another experiment, the flexible package (LDPE + 1,5% TiO₂) UHT milk was exposed to light (1,920 ± 100 lux) for a 72 hour period with the objective of evaluating the quality of the product under these conditions. The results showed an increase of lipid oxidation through time, and rejection by panelists after 24 hours, indicating that this package needs another complementary layer working as a light barrier.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - Aspectos sobre a produção de leite UHT e fatores determinantes para o fim da vida de prateleira.....	3
1. Aspectos sobre a qualidade e a produção do leite.....	5
2. O mercado de leite fluido no Brasil.....	7
3. Processamento de leite UHT.....	12
4. Embalagens e envase asséptico de leite UHT.....	17
5. Estabilidade oxidativa de leite UHT.....	21
6. O sistema de granelização do leite cru refrigerado.....	22
7. Bactérias psicrótroficas no leite e sua influência sobre o leite UHT.....	25
8. Alterações de sabor em leite UHT.....	36
9. Referências Bibliográficas.....	38
 CAPÍTULO II - Influência da temperatura de armazenamento de leite cru na qualidade de leite UHT em embalagem flexível.....	57
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1. INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1. Captação, recepção e armazenamento do leite cru.....	63
2.2. Processamento de leite UHT.....	64
2.2.1. Sistema UHT.....	64
2.2.2. Higienização da linha de processamento.....	67
2.3. Material de embalagem.....	68
2.4. Estocagem do leite UHT.....	68
2.5. Amostragem e Análises.....	69
2.6. Análise sensorial.....	71

2.7. Determinação do fim da vida de prateleira do leite UHT.....	72
2.8. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados.....	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1. Leite cru.....	73
3.2. Leite UHT.....	78
3.3. Avaliação Sensorial e Intenção de Compra.....	86
CONCLUSÃO.....	91
AGRADECIMENTOS.....	91
REFERÊNCIAS.....	91
CAPÍTULO III - Influência da luz na qualidade e aceitação sensorial do leite UHT acondicionado em embalagem flexível de polietileno de baixa densidade.....	
	101
RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	103
1. INTRODUÇÃO.....	104
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1. Processamento UHT e embalagem.....	106
2.2. Análises microbiológicas no leite cru.....	107
2.3. Análises de caracterização do leite UHT.....	107
2.4. Material da embalagem.....	107
2.5. Transmitância especular.....	108
2.6. Estocagem do produto.....	108
2.7. Oxidação lipídica.....	109
2.8. Lipólise.....	109
2.9. Cor.....	110
2.10. Análise sensorial.....	110
2.11. Análises estatísticas.....	111
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
3.1. Análises microbiológicas no leite cru.....	111
3.2. Caracterização do leite UHT.....	111
3.3. Material da embalagem.....	112

3.4. Transmitância especular.....	112
3.5. Oxidação lipídica.....	114
3.6. Lipólise.....	115
3.7. Cor.....	116
3.8. Análise Sensorial.....	116
4. CONCLUSÃO.....	119
AGRADECIMENTOS.....	119
REFERÊNCIAS.....	119
CONCLUSÃO GERAL.....	127
ANEXOS.....	129

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Ranking dos seis maiores produtores mundiais de leite em 2008....	8
Tabela 2	Quantidade de vacas ordenhadas e produtividade animal em alguns países no ano de 2007.....	10
Tabela 3	Bactérias psicrótróficas produtoras de proteases isoladas em leite cru.....	28

CAPÍTULO II

Tabela 1	Caracterização do leite cru (n=4), controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	75
Tabela 2	Contagens médias de microrganismos (UFC mL ⁻¹) no leite cru (n=4). Controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	76
Tabela 3	Contagens de esporos (máximo e mínimo) do leite cru (n=4). Controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	78
Tabela 4	Caracterização do leite UHT (n=4) com 1 dia de estocagem, produzido com leite cru controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	79
Tabela 5	Quadrados médios e probabilidades para evolução do nitrogênio não-protéico (%) e da Caseína/Proteína (%) dos leites UHT, durante a estocagem (n=4).....	80
Tabela 6	Quadrados médios e probabilidades para evolução dos ácidos graxos livres dos leites UHT, durante a estocagem (n=4).....	85
Tabela 7	Médias e desvios padrão das notas atribuídas no teste de escala hedônica de 9 pontos. Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	87
Tabela 8	Médias e desvios padrão das notas da intenção de compra. Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).....	89

CAPÍTULO III

Tabela 1	Caracterização do leite UHT.....	112
----------	----------------------------------	-----

Tabela 2	Lipólise no leite UHT estocado sob luz em embalagem PEBD....	115
Tabela 3	Valores de cor L-, a- e b- do leite UHT estocado sob diferentes tempos de exposição de luz.	116

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Comportamento de vendas de leite fluido e de leite UHT no Brasil, entre 1994-2008.....	11
Figura 2	Embalagens Tetra Pak Aseptic e Tetra Brick Aseptic.....	17

CAPÍTULO II

Figura 1	Sistema UHT (1.tanques de matéria-prima; 2.homogeneizador; 3.trocador de calor; 4.máquina de embalagem).....	65
Figura 2	Fluxograma de produção e estocagem do leite UHT nas embalagens de PEBD.....	66
Figura 3	Ficha de aceitação apresentada aos provadores.....	72
Figura 4	Evolução do (1) NNP (%) do leite UHT durante a estocagem. Leite cru com contagens de psicotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC ml ⁻¹ (▢); B - $1,10 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC ml ⁻¹ (□).....	81
Figura 5	Evolução da Caseína/ Proteína (%) do leite UHT durante a estocagem. Leite cru com contagens de psicotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC ml ⁻¹ (▢); B - $1,10 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC ml ⁻¹ (□).....	81
Figura 6	Eletroforese Urea-PAGE dos tratamentos A e D. 1- leite cru; 2, 3, 4, 5, 6 - leite UHT com 1, 21, 35, 48 e 56 dias de estocagem, respectivamente.....	83
Figura 7	Evolução da lipólise em ácidos graxos livres (AGL) do leite UHT durante a estocagem. Leites crus com contagens de psicotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC ml ⁻¹ (▲); B - $1,10 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC ml ⁻¹ (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC ml ⁻¹ (□).....	85
Figura 8	Histograma de intenção de compra do leite UHT na 8ª semana de estocagem (5=certamente compraria; 4=provavelmente compraria; 3=talvez compraria/talvez não compraria; 2=provavelmente não compraria; 1=certamente não compraria). Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).	90

CAPÍTULO III

Figura 1	Espectro de transmitância especular nas embalagens: polietileno de baixa densidade pigmentado com dióxido de titânio (PEBD), caixas laminadas cartonadas (CLC), garrafas plásticas comerciais (GPC) e bolsas plásticas comerciais (BPC).	113
Figura 2	Oxidação lipídica usando análise TBARS no leite UHT em embalagem PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux. a,b,c,d - médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).....	115
Figura 3	Notas da avaliação sensorial do leite UHT em embalagem tipo bolsa PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux. a,b,c,d - médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$).	118
Figura 4	Intenção de compra do leite UHT em embalagem tipo bolsa PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux.....	118

INTRODUÇÃO GERAL

A Resolução Instrução Normativa (IN) 51/2002, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), representou um grande avanço para a melhoria da qualidade do leite ao estabelecer a coleta de leite refrigerado a granel em todo o território nacional, o que diminui as perdas causadas pela acidificação em leite não refrigerado. De acordo com essa instrução, o leite deve ser armazenado na propriedade rural em tanques de refrigeração por expansão direta até a temperatura de 4°C e quando for utilizada refrigeração por imersão de latões, o limite permitido é de 7°C. O intervalo entre a ordenha inicial e a recepção no estabelecimento que processará o leite deve ser de 48 h, e o transporte feito em caminhão com tanque isotérmico efetuado à temperatura máxima de até 10°C. O crescimento de bactérias psicotróficas é agravado principalmente pelo uso de tanques de expansão comunitários, e pelo tempo excessivo e temperaturas inadequadas de armazenamento refrigerado do leite cru, na fazenda e na usina beneficiadora. A demora nas entregas do leite dada pelas distâncias e as condições de acesso das propriedades para os tanques, o volume de leite que é colocado no tanque de cada vez e as repetidas vezes em que isso é realizado, dificultam a manutenção do leite à temperatura adequada de refrigeração. Além disso, a situação é agravada pelo armazenamento posterior nas usinas beneficiadoras, como as de leite longa vida ou UHT (*ultra high temperature*). As bactérias psicotróficas são totalmente destruídas durante o processamento UHT, mas as enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por esses microrganismos são termorresistentes, comprometendo a qualidade sensorial e a vida de prateleira do leite UHT.

O leite UHT destaca-se como o principal tipo de produto asséptico comercializado no Brasil, apresentando um mercado estimado em cinco bilhões de litros de leite fluido ao ano ou de embalagens laminadas cartonadas. O

produto acondicionado em embalagens laminadas cartonadas e estáveis a temperatura ambiente, detém aproximadamente 75% do mercado de leite fluido no país. O leite UHT, por apresentar preço competitivo e maior conveniência na periodicidade de compra e estocagem, tem se mostrado a opção preferencial de leite fluido do consumidor brasileiro. Mais recentemente, outros tipos de embalagem, como as bolsas flexíveis, garrafas de polietileno tereftalato (PET) e de polietileno de alta densidade multicamadas (PEAD), vêm sendo utilizadas.

Os objetivos deste trabalho foram obter leite UHT em embalagem de polietileno de baixa densidade pigmentado de branco com dióxido de titânio (tradicionalmente utilizada para leite pasteurizado) para:

- a) Avaliar a influência das temperaturas de armazenamento do leite cru na extensão de lipólise e proteólise e na aceitação sensorial do produto ao longo da estocagem protegida de luz à temperatura ambiente;
- b) avaliar a influência da exposição à luz ao longo da estocagem na qualidade e aceitação sensorial do produto.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - Aspectos sobre a produção de leite UHT e fatores determinantes para o fim da vida de prateleira

1. Aspectos sobre a qualidade e a produção do leite

O leite bovino é um meio adequado para a multiplicação acelerada de ampla variedade de microrganismos. A abundância de carboidratos, proteínas e gorduras combinados com o pH próximo da neutralidade favorecem o desenvolvimento da microbiota diversificada (HAYES & BOOR, 2001).

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que alguns cuidados sejam tomados na fonte de produção. A qualidade deve ser vista como uma soma de esforços que inclui melhoramento genético, bom manejo nutricional, controle sanitário, práticas higiênicas de ordenha, resfriamento do leite nas propriedades a baixas temperaturas e transporte rápido em condições apropriadas até as indústrias (CERQUEIRA *et al.*, 1999).

Brito & Brito (2001) relatam que a síntese e a secreção do leite são processos que ocorrem de maneira praticamente estéril em animais saudáveis. Segundo Burton (1986), o leite cru apresenta, normalmente, uma microflora mista originária de diversas fontes, como a do interior do úbere, da superfície externa do animal e da superfície do equipamento de ordenha (ordenhadeira, tubulações e tanques). Para Vatne & Castberg (1991) o leite cru deverá ter boa qualidade se apresentar uma contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios menor que 10^5 UFC/mL, e para Hays (1993), o leite recém ordenhado, em condições de assepsia deve conter entre 5×10^3 e 5×10^4 UFC/mL.

Dentro do conceito de cadeia de produção, é de suma importância, para a qualidade e segurança do leite oferecido aos consumidores, as práticas utilizadas durante a produção primária. Essas práticas empregadas dentro da fazenda leiteira devem assegurar que o leite seja produzido a partir de animais saudáveis, em boas condições de higiene e dentro de condição ambiental

sustentável. Tais procedimentos devem sempre focar a prevenção dos problemas, visto que a sua correção é, na maioria das vezes, mais cara e menos eficiente (SANTOS, 2007).

De acordo com Furtado (1990), algumas propriedades do leite cru são fundamentais para o seu processamento, podendo-se enumerar:

1. Composição do leite (gordura, proteína, lactose, sais minerais);
2. Mudanças no leite após sua produção (rancificação, oxidação, produção de ácido, desenvolvimento de *off-flavor*, mudanças na micela de caseína);
3. Leite anormal (mastite);
4. Contaminação (bactérias termofílicas, psicrófilas, bacteriófagos);
5. Presença de resíduos (antibióticos, desinfetantes, metais).

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária que em geral tem origem bacteriana. Essa resposta inflamatória da glândula mamária apresenta como consequência direta o aumento no número de leucócitos de origem sanguínea que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Dessa forma, o termo “células somáticas” no leite é utilizado para designar todas as células presentes no leite, que incluem as células de origem do sangue (leucócitos) e células de descamação do epitélio glandular secretor (NATZKE, 1981).

A contagem de células somáticas (CCS) no leite é comumente usada como indicativo de prevalência de mastite subclínica em vacas. Foi comprovado por Ma *et al.* (2000) que a mastite eleva, significativamente, a CCS. Em um animal que não apresenta o quadro de mastite, a CCS é relativamente baixa, sendo inferior a 200.000 cél/mL (KITCHEN, 1981). No caso de animais com mastite, a maioria das células somáticas é de células de defesa, leucócitos, cujo objetivo é o de combater as bactérias causadoras do processo inflamatório (BRITO, 2002).

A proteólise em leite UHT pode estar associada com a alta CCS no leite cru (VERDI & BARBANO, 1991) e aumenta a susceptibilidade do produto à gelificação (DATTA & DEETH, 2001). Entretanto, Auldist *et al.* (1996) verificaram uma fraca associação entre o aumento de CCS e a aceleração de gelificação com o tempo de estocagem do leite UHT.

De qualquer forma, a qualidade do leite UHT é influenciada pela qualidade bacteriológica da matéria-prima na fonte de produção, pela contaminação dos tanques de refrigeração, pelo aumento da temperatura durante o transporte, pelo tempo de transporte, pela contaminação na indústria e pelo tratamento do leite após o processamento. Todos estes fatores estão inter-relacionados, sendo de máxima importância utilizar como matéria-prima leite de alta qualidade bacteriológica (GUINOT-THOMAS *et al.*, 1995; ENEROTH *et al.*, 2000).

2. O mercado de leite fluido no Brasil

Nos últimos 20 anos, a produção de leite no Brasil cresceu cerca de 100%. O país, em 2008, foi o sexto maior produtor de leite, representando em torno de 4,8% da produção mundial, ficando atrás dos EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha (MILKPOINT, 2010), conforme mostra a Tabela 1. Esse grupo de países e o Brasil totalizam quase que 50% da produção mundial de leite. No MERCOSUL, o Brasil foi o responsável por 64,5% do volume total produzido em 2007 (EMBRAPA, 2010).

Em relação ao mercado externo, o Brasil era um tradicional importador de produtos lácteos, chegando em 1999 a importar até 30% do leite consumido no País. A partir de 2000, observa-se uma clara tendência de redução nos gastos com importação de lácteos e, simultaneamente, uma evolução na receita com exportações (MACHADO, 2002). O país encerrou 2008 com o melhor resultado nas exportações de lácteos, fruto de investimentos em produção, qualidade do leite

e ampliação do parque industrial (ALVIM *et al.*, 2009). Entretanto, ainda estamos atrasados com relação à qualidade do leite de países exportadores (Argentina) e países desenvolvidos (Estados Unidos e Canadá). De acordo com dados da Clínica do Leite em Piracicaba-SP, a média das amostras do Brasil está em $4,62 \times 10^5$ UFC/mL (BARROS, 2009).

Tabela 1. Ranking dos seis maiores produtores mundiais de leite em 2008.

	Países	Produção (mil toneladas)	% do total no mundo
1º	Estados Unidos da América	86.179	14,90
2º	Índia	44.100	7,62
3º	China	35.853	6,20
4º	Rússia	32.117	5,55
5º	Alemanha	28.656	4,95
6º	Brasil	27.579	4,77

Fontes: MILKPOINT (2010); EMBRAPA (2010).

O Brasil reúne condições favoráveis para ampliar mais agressivamente sua produção, abastecer o mercado doméstico e tornar-se, nos próximos anos, um dos maiores exportadores de produtos lácteos do mundo (NETTO *et al.*, 2004). Apesar de ocupar a sexta posição entre os maiores produtores de leite no mundo, o Brasil é o país que apresenta o maior potencial de crescimento, pois sendo o décimo maior PIB nominal do mundo, há uma capacidade de aumento de consumo de produtos lácteos latente. Nosso país é o quinto em extensão territorial, o que lhe dá condições de expansão de área para produção, ainda e tem a quinta maior população, o que lhe garante um grande mercado doméstico (ALVIM *et al.*, 2009). Dados de 2003 mostram que o país possuía cerca de um milhão e cem mil propriedades que produziam leite, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas. O agronegócio do leite é responsável por 40% dos postos de trabalho no meio rural (CNA, 2009). A demanda por leite e derivados pode ser

aumentada por diversos fatores, entre eles o aumento de população, crescimento de renda, redução de preços relativos de produtos concorrentes ou substitutos e mudanças nos hábitos alimentares (SOUZA, 2000).

Segundo Barros (2009), em relação às mudanças dentre as quais passou o setor lácteo nos últimos anos, podem-se citar a granelização do leite com o fim da coleta de leite não resfriado, o pagamento pelo leite valorizando sólidos e qualidade, a instituição da Rede Leite em busca da melhoria da qualidade do leite, a rastreabilidade, entre outras. A rastreabilidade total do produto terminado já ocorre em alguns laticínios. Em meados de 2005 entrou em vigor a Instrução Normativa (IN) 51 (criada em 2002) e a Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite (Rede Leite), com o propósito de trazer maior transparência às análises. Com isso, todo o leite passou a ser analisado pelos laboratórios da Rede Leite e a remuneração por sólidos e qualidade passou a ser feita de acordo com esses resultados.

Apesar da magnitude destas informações, destacam-se vários problemas da produção de leite no Brasil, entre eles, a sazonalidade da produção ao longo do ano, o representativo mercado informal de produção e a baixa produtividade do rebanho nacional quando comparado com a de outros países (21ª posição), conforme Tabela 2. Em relação a questão da informalidade, dos 16,5 bilhões de litros de leite produzidos em 1995, pouco mais de 36% era considerado informal, e em 2007, em termos percentuais este valor reduziu-se a 31% (BARROS, 2009).

Tabela 2. Quantidade de vacas ordenhadas e produtividade animal em alguns países no ano de 2007.

*	Países	Vacas ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (kg/vaca/ano)
1º	Estados Unidos	9.132	9.219
2º	Dinamarca	555	8.288
3º	Canadá	1.005	7.960
4º	Japão	1.095	7.434
5º	Países Baixos	1.443	7.450
6º	Reino Unido	2.010	7.189
13º	Argentina	2.200	4.773
17º	China	12.652	3.109
21º	Brasil	20.700	1.224
22º	Índia	38.500	1.109

* ordenação dos países pela produtividade.

Fonte: Embrapa (2010).

O leite longa vida ou UHT (*ultra-high-temperature*) foi introduzido no Brasil em 1972, onze anos depois de ser lançado na Europa, mas até o início dos anos 90 representava, apenas, 4,4% do mercado de leite fluido legalizado. Hoje o mercado mostra uma tendência de aumento cada vez maior de oferta e consumo de leite UHT, que chega a ser em torno de 75% em relação ao leite fluido (ABLV, 2009), ilustrado pela Figura 1. Os fatos que o tornaram um dos líderes no mercado de lácteos seriam seu expressivo volume comercializado e facilidades que oferece na sua manipulação e a organização dos agentes econômicos (GOMES, 2001). Resumindo, o hábito brasileiro de alto consumo de leite UHT está relacionado principalmente a dois fatores: maior vida de prateleira em comparação com o leite pasteurizado, e conveniência no manuseio.

Dentre os motivos para a grande impulsão do comércio de leite UHT, tem-se que para o setor industrial proporcionou a comercialização a longas distâncias, prescindindo de refrigeração (PETRUS, 2004). Além disso, os fatores relacionados à demanda seriam a preferência do consumidor, a grande concorrência entre os laticínios, a instalação de novas indústrias no país e o crescimento no marketing das indústrias de equipamentos (BILZARI *et al.*, 2003).

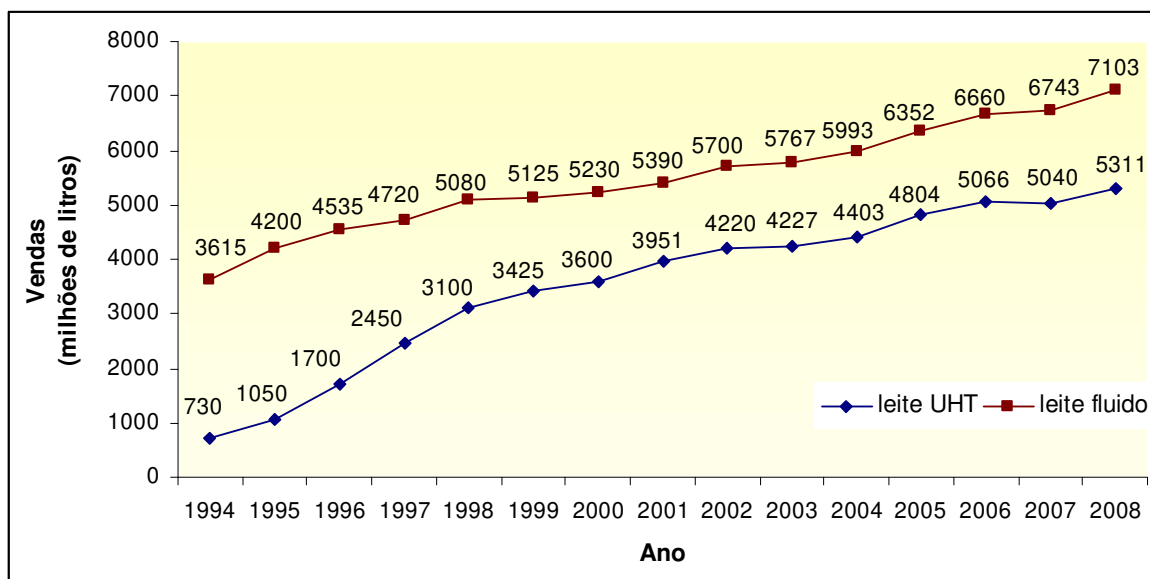


Figura 1: Comportamento de vendas de leite fluido e de leite UHT no Brasil, entre 1994-2008.

Embora se saiba que o leite UHT desenvolve um sabor de cozido, considerado inaceitável por consumidores de muitos países (SARKAR, 1999; MABOUIS, 2002), como os australianos (ELLIOTT *et al.*, 2003), esta rejeição não é verificada no Brasil.

É interessante notar como os perfis de consumo de leite fluido variam muito de país para país. Nos EUA registra-se o maior consumo de leite pasteurizado do mundo. Já em muitos países da África somente o leite em pó é comercializado, não existindo o consumo de leite pasteurizado ou UHT ou tratado termicamente e pronto para beber. Na Europa é incomum o consumo de leite em pó para consumo direto, havendo um equilíbrio entre o consumo de pasteurizado e UHT (DE MARTINO, 2001). No bloco formado por Bélgica, França, Grécia, Espanha e Portugal, o leite UHT representa mais de 90% do consumo de leite fluido. Sua participação é predominante ainda na Alemanha, onde domina cerca de 70% do mercado, e na Itália com cerca de 60% (ABLV, 2009).

3. Processamento de leite UHT

Os processos térmicos mais comumente usados para a obtenção de leite para a distribuição e consumo são: pasteurização, a ultrapasteurização e a esterilização do produto acondicionado.

No Brasil não há uma legislação específica para leite esterilizado, apesar de o RIISPOA (BRASIL, 1952) permitir a produção. Kessler *et al.* (1984) cita processos entre 109 a 115°C por 20-40 minutos necessários para completa inativação enzimática (exceto para lipases e proteases termoresistentes advindas da contaminação por *Pseudomonas*) e microbiológica (exceto esporos termoresistentes como de *Bacillus stearothermophilus*).

O processamento de leite UHT envolve aquecimento a alta temperatura por curto período de tempo com intuito de se obter um produto de longa vida de prateleira a temperatura ambiente.

A tecnologia UHT tem-se expandido surpreendentemente nas últimas décadas e, atualmente, se aplicam a muitos setores da indústria alimentícia, especialmente às indústrias lácteas, para a produção de leite e creme de leite longa vida (EARLY, 1998). Muitos produtos alimentícios são processados pelo método UHT com a intenção de se obter um produto comercialmente estéril (VON BOCKELMANN & VON BOCKELMANN, 1998).

Esterilização comercial significa ausência de microrganismos capazes de se desenvolver no alimento em condições normais, sem refrigeração, em que o produto deve ser manuseado durante a distribuição e estocagem (CODEX ALIMENTARIUS, 1993). De acordo com Silva *et al.* (2001), a esterilidade comercial de alimentos processados termicamente significa a condição atingida por:

- 1) Aplicação de calor suficiente para tornar o alimento isento de microrganismos patogênicos viáveis, inclusive esporos e microrganismos capazes de se reproduzir no produto, em condições de estocagem e distribuição não refrigerada, e;
- 2) Aplicação combinada de calor e redução do pH ou atividade de água, suficientes para tornar o alimento isento de microrganismos

capazes de se desenvolver no produto, sob estocagem não refrigerada.

Os processos de esterilização comercial são delineados para assegurar a destruição de esporos de *Clostridium botulinum*, bactéria patogênica anaeróbia mais resistente ao calor e capaz de se desenvolver nas condições de pH do leite, próximo a 6,7 (KOMOROWSKI & EARLY, 1992; LEWIS, 2003).

O processo UHT favorece a inativação microbiana e de esporos em relação à degradação dos fatores de qualidade e, quando está associada com a aplicação de curtos tempos de residência, promove produtos microbiologicamente seguros com satisfatória qualidade sensorial (HOLDSWORTH, 1992). Isto garante um longo período de vida de prateleira sem refrigeração (BURTON, 1988; DATTA & DEETH, 2003).

A eficiência da ação esporicida requerida para um tratamento de esterilização em sistemas fechados está relacionada ao número de esporos resistentes ao calor existentes no leite cru e ao valor da respectiva resistência térmica, bem como, aos números aceitáveis da população microbiana no produto final (SANCHEZ, 2005).

Para recuperar microrganismos contaminantes em testes de esterilidade comercial, o FDA (1998) recomenda incubação a 35°C por até 14 dias. Conforme Resolução nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), o padrão microbiológico para leite UHT em embalagens herméticas determina que após 7 dias de incubação a 35-37°C de embalagem fechada, o produto não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e sensoriais do produto, em condições normais de armazenamento.

O leite UHT é definido pela legislação brasileira através da Portaria 146 de 11/03/96 (BRASIL, 1996) como “o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4s, a uma temperatura entre 130 e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas”. Esta Portaria preconiza que leite UHT não deve ter

microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição, e após uma incubação na embalagem fechada a 35-37°C, durante 7 dias deve apresentar no máximo 100 microrganismos aeróbios mesófilos /mL.

Outra Portaria, a 370 (BRASIL, 1997), internalizou os padrões estabelecidos pela Resolução MERCOSUL GMC. nº 135/96, que aprovou a inclusão do citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio, separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1g/100ml, como estabilizante, no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UHT.

Quanto ao tratamento térmico, Hill (1988) preconiza para leite UHT uma temperatura de 137,8°C ou acima, durante 2s, sendo que o produto resultante não é comercialmente estéril, mas apresenta vida de prateleira estendida em condição de baixa refrigeração. Em contrapartida, a esterilização em UHT refere-se a um leite aquecido em temperaturas que variam entre 135 a 150°C, durante 1 a 5s, sendo o produto comercialmente estéril, acondicionado assepticamente, podendo ser estocado sem refrigeração.

Existem dois sistemas de obtenção de UHT:

- a) Aquecimento indireto: através do uso de vapor, em trocadores de calor de alto desempenho. O produto é aquecido pela troca indireta de calor com vapor (água de regeneração, vapor ou água pressurizada), mantido por 2 a 8 s na retenção e resfriado pela água de regeneração em *Chiller*. Neste sistema o custo e a complexidade são menores, quando comparados com o sistema de aquecimento direto (KOMOROWSKI & EARLY, 1992). Trocadores de calor a placas ou tubulares são utilizados para fluidos de baixa viscosidade. No entanto, o nível de depósito orgânico no trocador a placas é maior devido aos espaçamentos entre as placas serem pequenos, propiciando entupimento rápido (BURTON, 1977).
- b) Aquecimento direto: por injeção ou infusão de vapor, com resfriamento instantâneo em câmara de vácuo após o tempo de retenção (NEWSTEAD *et al.*, 2006). Isto gera aquecimento rápido com diluição no alimento

(considerado na estimativa do tempo de retenção), mas a água em excesso é removida por um rápido resfriamento em câmara de expansão. O sistema de injeção direta de vapor é feito em duas etapas, normalmente com um pré-aquecimento indireto (até 75°C) usando trocadores de calor antes do aquecimento por injeção direta de vapor. Em algumas plantas tem-se aumentado a severidade do pré-tratamento por muitas razões, incluindo o aumento da vida de prateleira, mas, na maioria dos casos, essas condições são arbitrárias.

Uma comparação da eficiência esporicida de cada sistema indica que o aquecimento direto deve ser 3-4°C maior do indireto para produzir o mesmo efeito. As diferenças relativas ao valor nutricional do leite processado por um ou outro sistema são praticamente desprezíveis (WESTHOFF, 1978).

O *Clostridium botulinum*, apesar de ser o alvo primário na fabricação de um produto comercialmente estéril, é raramente encontrado no leite cru. Podem ser encontrados esporos mais resistentes ao calor, que são deteriorantes, mas não patogênicos, como o *Bacillus stearothermophilus*, e mais recentemente o *B. sporothermodurans* (HAMMER *et al.*, 1995).

Para a inativação do *Clostridium botulinum* é necessária aplicação da temperatura de 141°C pelo período de 1,8s. Já para duas reduções decimais de *Bacillus stearothermophilus*, o período requerido deve ser maior. Nos produtos UHT, um valor aproximado de F_0 deve ser obtido a partir da temperatura ($T, ^\circ\text{C}$) e do tempo (t, s) de retenção (LEWIS, 2003):

$$F_0 = 10^{(T - 121,1)/10} \times t / 60$$

Esporos de *Bacillus sporothermodurans* podem sobreviver ao tratamento UHT, e quando encontrados no produto final podem germinar e crescer no alimento estocado (KESSLER *et al.*, 1994). Segundo Lembke (1998) citado por Sanchez (2005), somente uma temperatura maior ou igual a 150°C inativaria os esporos deste microrganismo. Huemer *et al.* (1998) afirmaram que

seria necessário aplicar tempo de 3,4 a 7,9 minutos, a 140°C, para eliminar 90% da população deste organismo, quando o mesmo apresenta um valor z de 11,3°C.

Dependendo do tipo de calor, direto ou indireto, aplicado ao produto no processo de esterilização e do tipo de embalagem, a deterioração de leite UHT por *B. sporothermodurans* pode ser observada por uma leve alteração na cor (rosa), *off-flavor* e alterações de propriedades físico-químicas no produto (KLIJN *et al.*, 1997). Hammer *et al.* (1995) afirmam que ocorre pouca ou nenhuma mudança sensorial do produto processado contaminado com *B. sporothermodurans* durante a estocagem normal, mas que pode levar o leite à coagulação quando aquecido. Em embalagens com alta permeabilidade ao oxigênio, podem surgir coagulação e coloração rosada. A contagem máxima encontrada dessa bactéria no produto pode chegar a 10⁵ UFC/mL.

Foschino *et al.* (1990) e Kessler *et al.* (1994) reportaram problemas de esterilidade de leite UHT causados pela presença de esporulados ultra-resistentes ao calor, identificados como *B. sporothermodurans*. Zacarchenco *et al.* (2000) analisaram 100 embalagens de leite UHT na região de Campinas-SP, Brasil, distribuídas entre nove empresas processadoras. Como resultado, 45% das embalagens estavam com contagens acima do limite de 100 UFC/ml, sendo que 71% delas eram provenientes de processos térmicos com aquecimento indireto. De um total de 300 culturas isoladas, 24 delas foram identificadas como *B. sporothermodurans*.

Guillaume-gentil *et al.* (2002), a partir da incubação (37°C por 5-7 dias) de 2.113 embalagens de leites UHT e esterilizado advindas de supermercados do Paquistão, Equador, República Dominicana e México, identificaram 13 embalagens contaminadas com *B. sporothermodurans*.

Os programas para assegurar a qualidade de produtos UHT diferem, consideravelmente, daqueles para produtos pasteurizados, pois a maioria dos defeitos que limitam a aceitabilidade de produtos UHT, após longo tempo de estocagem, resulta de alterações físicas, químicas e enzimáticas (DUNKLEY e STEVENSON, 1987; DATTA & DEETH, 2001).

4. Embalagens e envase asséptico de leite UHT

A esterilização se aplica à conservação dos alimentos desde o século XIX, mas a tecnologia necessária para associar o tratamento a um sistema de embalagem asséptica somente foi desenvolvida no final da década de 50, quando surgiram os equipamentos com o uso de ultra-altas temperaturas (UHT) (EARLY, 1998). Os primeiros produtos tratados com UHT em embalagem asséptica foram em latas, e a demonstração foi feita em uma exibição agrícola em Londres no início do século XX (VON BOCKELMANN & VON BOCKELMANN, 1998).

Em 1961, foram introduzidos os processamentos com embalagens assépticas utilizando material flexível (um laminado de cera, papel e polietileno): o sistema Tetra Pak (*"Tetra Pak Aseptic"*), cujas embalagens estão ilustradas na Figura 2. O papel cartonado e colorido de preto promovia proteção contra a entrada de luz, entretanto a barreira contra gases era pobre. Em 1969, foi introduzida a embalagem em formato de tijolo (*"Tetra Brick Aseptic"*), como mostra Figura 2 (a), com uma estrutura mais complexa: de polietileno, papel, polietileno, folha de alumínio e polietileno laminado. Esta promovia proteção contra a entrada de luz e de gases e seu formato oferecia vantagens na estocagem, transporte e manuseio.

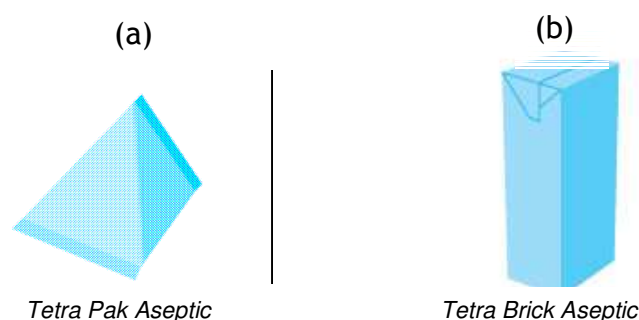


Figura 2: Embalagens *Tetra Pak Aseptic* e *Tetra Brick Aseptic*.

A embalagem cartonada *Tetra Brick* atualmente é composta por sete camadas de materiais. As duas primeiras camadas mais internas são de polietileno, um plástico inerte que evita o contato do alimento com as demais

camadas da embalagem. A terceira camada é de alumínio, cuja função é evitar a passagem de oxigênio, luz e microrganismos. Após esta, segue mais uma camada de polietileno que faz a adesão da camada de alumínio com a quinta camada, de cartão. Esta última confere a resistência à embalagem, além das características gráficas personalizadas; sendo seguida por mais uma camada de polietileno e por fim a impressão é feita na parte externa do cartão duplex.

O envase de leite UHT é uma etapa de fundamental importância, pois não pode comprometer a integridade do produto, por isso, deve ser realizado em ambiente asséptico sendo que os equipamentos de envase, assepsia do material de embalagem e o processamento térmico do produto devem estar conectados, apresentar grau sanitário e poder ser esterilizados antes da produção, bem como, serem capazes de manter sua condição estéril durante todo o período de produção de modo viável sob o ponto de vista econômico e energético (MARCY & NAGY, 2000).

Os sistemas assépticos envolvem as etapas de esterilização do material de embalagem; esterilização comercial do produto; acondicionamento do produto assepticamente; fechamento e manutenção da integridade da embalagem (FARIA, 1993).

A esterilização da embalagem objetiva eliminar ou inativar microrganismos ou quaisquer matérias estranhas que possam contaminar o produto e promover alterações indesejáveis, sob as condições de distribuição e estocagem (PETRUS, 2004). No mercado brasileiro de embalagens assépticas houve um crescimento de 1100% em consumo de embalagens deste segmento, somente entre os anos de 1990 e 2005.

No Brasil, o mercado de sistemas assépticos é praticamente dominado pela Tetra Pak Ltda, a maior empresa mundial em sistemas assépticos. Outra empresa que vem atuando no mercado nacional, mas de forma restrita desde 1997, é a DuPont S.A. cuja embalagem utilizada é uma bolsa plástica parecida com a tradicional almofada do leite pasteurizado, mas formado por um filme flexível multicamadas. A Sig Combibloc S.A., principal concorrente internacional

da Tetra Pak, ampliou a sua atuação no mercado sul-americano em 2005. O Brasil foi priorizado com a implantação de uma fábrica de embalagens no Paraná, já que representa cerca de 70% do mercado sul-americano de embalagens laminadas de alumínio, cartão e plástico. Recentemente, uma empresa finlandesa Elecster, que atua na Colômbia e Costa Rica, anunciou a intenção de expansão para o mercado brasileiro. O sistema de embalagem dessa empresa também é uma bolsa plástica flexível (NA TOCAIA, 2006).

As embalagens plásticas têm algumas vantagens sob as cartonadas, como a possibilidade de várias opções de volume e formatos; possibilidade de ser produzida pelo próprio usuário ou ser adquirida facilmente por fornecedores; ser de fácil reciclagem; ter a possibilidade de ter a esterilização sem o uso de agentes químicos ou com concentrações reduzidas destes e ser de fácil manuseio (CARDOSO, 2007). Já as cartonadas, indiscutivelmente, poderiam apresentar melhor barreira aos gases, aromas e vapor de água se não fosse o aparecimento de problemas de microfuros e trincas na folha de alumínio e defeitos nas regiões de solda, provocados pelas dobras após a termossoldagem. Além disso, pela possibilidade de enchimento a frio, o sistema asséptico permite a utilização de alguns materiais sensíveis ao calor em combinação com outros não sensíveis, como o polietileno de baixa densidade (PEBD) (PADULA *et al.*, 1989; FARIA, 1993).

O PEBD continua com um bom crescimento no mercado de embalagens para alimentos. Segundo dados do Datamark (2009), houve aumento de 38% no volume deste filme consumido pelas indústrias dentre os anos de 2000 e 2007. O mercado onde o PEBD mais cresce é o de leite aromatizado (473%), destacando-se também o de creme pasteurizado (51%).

Uma comparação da atual tecnologia de embalagens de leite comparada com 25 anos atrás sugere que esta área tem passado por grande desenvolvimento (GOFF & GRIFFITHS, 2006). Os referidos autores afirmam que atualmente as áreas de maior desenvolvimento estão em promover embalagens para uso doméstico ou individual. Embalagens cartonadas para volume de um quarto e

metade de um galão e embalagens de PEBD moldadas por sopro (garrafas) para volume de 1 galão são as mais usadas nos Estados Unidos. No Canadá, embalagens de PEBD tipo bolsa de 4L, e embalagens que comportam 3 bolsas de 1,33L envoltas em outra com impressão são as mais comumente usadas.

A esterilização do material de embalagem em máquinas do tipo forma, enche e fecha (FEF) geralmente é realizada por métodos combinados, envolvendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e calor, ou radiação ultravioleta (CELF, 1981).

O uso da radiação ultravioleta é um dos vários processos físicos que podem ser utilizados para a esterilização ou na higienização de superfícies que irão entrar em contato com alimentos (ALEXANDRE *et al.*, 2008). As irradiações ultravioletas na faixa de 210 e 330 nm mostram-se mais eficientes como germicidas por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomo, mutações genéticas e inativação de enzimas e, conseqüentemente, a morte da célula (CARDOSO, 2007).

O H_2O_2 é o agente químico mais empregado na esterilização de embalagens de sistemas assépticos, e é usado em concentrações entre 25 e 35% em processos de assepsia por imersão ou *spray* em embalagens pré-formadas (CHAMBERS & NELSON, 1993). De acordo com os autores, o H_2O_2 se decompõe em água e oxigênio, o qual elimina os microrganismos pelo seu forte potencial oxidativo.

A eficiência do H_2O_2 pode ser potencializada se combinado com calor, radiação infravermelho ou ultravioleta (SHAPTON & SHAPTON, 1991). No sistema Tetra Pak, o material de embalagem é guiado através de um banho de peróxido em concentração de 35% a uma temperatura aproximada de 75°C. Após o banho e ao entrar na câmara estéril, o material de embalagem é submetido à pressão de rolos e a uma faca de ar para diminuir o residual de peróxido (TOLEDO & CHAPMAN, 1973; REUTER, 1993).

5. Estabilidade oxidativa de leite UHT

A oxidação do leite, que pode ocorrer durante o processo e a estocagem, resulta em perda nutricional e surgimento de forte sabor indesejável (HEDEGAARD *et al.*, 2006; SMET *et al.*, 2008). De acordo com Schmidt & Renner (1978), a deterioração devido à oxidação é causada pela reação do oxigênio residual ou do espaço livre da embalagem com os ácidos graxos insaturados. A exposição à luz fluorescente durante a comercialização do leite pode promover mudanças oxidativas (BRADLEY, 1980; CLADMAN *et al.*, 1998). O sabor pela indução da luz no leite é bem conhecido e vem sendo investigado em detalhes (SATTAR & DEMAN, 1975; SHIPE *et al.*, 1978; WHITED *et al.*, 2002; MESTDAGH *et al.*, 2005).

Diversos estudos mostraram que a estocagem do leite em embalagens sem proteção de luz aumenta o desenvolvimento e a detecção de *off-flavors* relativos à oxidação (MOYSSIADI *et al.*, 2004; KARATAPANIS *et al.*, 2006; SMET *et al.*, 2009). A embalagem pode proporcionar proteção tanto de luz, quanto de oxigênio (SCHRÖDER, 1982; SKIBSTED, 2000; VASSILA *et al.*, 2002).

A estabilidade oxidativa é determinada por um balanço de processos pro e antioxidativos, e fatores como a composição de ácidos graxos, a presença de íons metálicos ou a disponibilidade de antioxidantes que podem influenciar a vida de prateleira de leite e derivados (BARREFORS *et al.*, 1995; HAVEMOSE *et al.*, 2004; VAN AARDT *et al.*, 2005). Leite estocado sob luz é objeto de oxidação dada à presença de riboflavina, que atua como um fotossintetizador (WOLD, 2006).

O aumento da propriedade antioxidante durante avançados estágios de aquecimento pode ser causado pela formação de compostos da reação de Maillard, dos quais as propriedades antioxidantes foram bem documentadas (LINGNERT & WALLER, 1983; ELIZALDE *et al.*, 1991; YEN & TSAI, 1993; NICOLI *et al.*, 1997; CALLIGARIS *et al.*, 2004). Aparentemente, a oxidação de grupos SH confere ao produto maior estabilidade frente à oxidação lipídica (FOX & KELLY, 2006). De acordo com Dunkley & Stevenson (1987), o sabor de oxidado não é um

sério problema para o leite UHT, provavelmente devido ao efeito antioxidante da alta temperatura do processamento e da baixa concentração de oxigênio no produto.

Diversos fatores que afetam a evolução de compostos voláteis no leite UHT têm sido investigados, incluindo a exposição à luz fluorescente (MEHTA & BASETTE, 1979) e ao oxigênio (EARLEY & HANSEN, 1982). O leite UHT é, em geral, menos sensível à luz comparado ao leite pasteurizado, devido à redução da disponibilidade ao oxigênio (SAFFERT *et al.*, 2008). Como consequência, a sensibilidade do leite UHT às mudanças induzidas pela luz é diminuída, sendo que as variações sensoriais são percebidas após alguns dias de iluminação em contrapartida de algumas horas de iluminação no leite pasteurizado (SATTAR & DEMAN, 1975).

Smet *et al.* (2009) observaram que ao se usar embalagem protegida de luz, o leite UHT não sofreu oxidação ao longo de 3 meses de estocagem. Os mesmos autores estocaram leite UHT em garrafas escuras de vidro e em embalagem de polietileno de alta densidade, as quais mostraram similar proteção à oxidação, sugerindo assim que a permeabilidade ao oxigênio da embalagem não é um fator importante na proteção do leite UHT contra a oxidação. Mestdagh *et al.* (2005) e Smet *et al.* (2008) também observaram que não houve formação de produtos da oxidação em amostras de leite acondicionadas em garrafas de PET e de PEAD sem barreira adicional ao oxigênio, mas com barreira à luz.

6. O sistema de granelização do leite cru refrigerado

A estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se em 1939, em grandes fazendas nas proximidades de Los Angeles, na Califórnia, expandindo-se posteriormente, de forma gradual, para outras regiões do Estado. Nos Estados Unidos, a grande mudança do sistema ocorreu no final da década de 50; na Inglaterra, no início da década de 70; e na Argentina, no final da década

de 80 e início da década de 90. No Brasil, o início de sua implementação ocorreu na segunda metade da década de 90, sendo regulamentada em 2002 por meio da Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002).

A década de 90 representou para o Brasil um marco de divisão entre um modelo tradicional de produção de leite e a modernização dessa atividade econômica primária, com seus reflexos nos ganhos de produtividade; no início de um processo de competitividade com os produtos lácteos importados e na ampliação substancial da qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores. A modernização do setor produtivo de leite e de seus derivados ocorreu a partir das primeiras regulamentações técnicas elaboradas para atender à uniformização de produtos circulantes entre os países do MERCOSUL, em 1992, e que fixaram padrões de identidade e de qualidade dos produtos lácteos de maior interesse comercial (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Em 1996, por iniciativa do Ministério da Agricultura, e da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, bem como de diversos representantes da comunidade científica, foi criado o “Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite” - PNMQL (OLIVEIRA *et al.*, 2000). A justificativa econômica para a execução do PNMQL foi demonstrada em diagnósticos previamente realizados de perdas econômicas significativas na cadeia produtiva do leite, pela condenação deste em decorrência de sua acidez elevada, ocorrência de mastite no rebanho ou outras zoonoses, perdas de produtividade do rebanho, perdas no transporte, na transformação da matéria-prima, na produtividade industrial, perdas de qualidade do produto acabado em função da má qualidade da matéria-prima, falta de confiança do consumidor no produto brasileiro e o risco de que a sua imagem fosse prejudicada em razão da baixa qualidade. A consequência do diagnóstico feito no PNMQL foi o aperfeiçoamento da legislação federal, datada de 1952, provendo-a dos meios capazes de alavancar, juntamente com outras iniciativas dos setores público e privado, o desenvolvimento e a modernização do setor laticinista nacional.

De acordo com a Resolução Normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002), no sistema de coleta à granel, os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados de forma tal que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4°C, no período máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Os tanques de refrigeração por imersão devem ser dimensionados de modo que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 7°C, também no período máximo de três horas, após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. O uso coletivo de tanques de refrigeração a granel, denominados de tanques comunitários, é admitido, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta. Portanto, não são admitidos tanques de refrigeração comunitários que operem pelo sistema de imersão de latões. A temperatura máxima de conservação do leite é de 7°C na propriedade rural, em tanques comunitários, e de 10°C no estabelecimento processador. A localização do equipamento deve ser otimizada a facilitar a entrega do leite de cada ordenha. Não é permitido acumular, em determinada propriedade rural, a produção de mais de um dia de ordenhas, para que esta seja enviada diariamente ao tanque comunitário.

A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002) estabelece ainda que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial, que irá beneficiá-lo, deve ser de, no máximo, 48 horas, independentemente de seu tipo; recomendando como ideal um período não superior a 24 horas. Posteriormente, o leite refrigerado é recolhido e transportado em caminhões providos de tanques isotérmicos até a indústria (BRASIL, 2002). Entretanto, alguns aspectos do processo de granelização são preocupantes, como a utilização de tanques de refrigeração coletivos, o tempo de refrigeração e a temperatura máxima do leite na propriedade rural.

Para o produtor, a granelização trouxe aumento da produção/produtividade uma vez que facilitou o manejo para segunda ordenha; reduziu custos de transporte para a indústria e facilitou o manuseio do produto

nas fábricas, além de ter sido o primeiro passo para a melhoria da qualidade do leite ao consumidor (BARROS, 2009).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação. Portanto, a adoção da prática de estocagem sob refrigeração na fonte de produção praticamente elimina a deterioração do leite por bactérias mesofílicas (FAIRBAIRN e LAW, 1986). Entretanto, isso levou ao favorecimento da multiplicação da microbiota psicrotrófica presente na matéria-prima, que pode ocasionar outros problemas (COUSIN, 1982).

7. Bactérias psicrotróficas no leite e sua influência sobre o leite UHT

Psicrotróficos é um grupo de microrganismos capazes de crescer a baixas temperaturas e deteriorar leite fluido e seus derivados (OLIVERIA & PARMALEE, 1976).

Segundo Gounot citado por Silveira *et al.*, (1998), o termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século XX. Em 1877, Foster citado por Suhren (1989), foi o primeiro a observar o crescimento bacteriano a 0°C. Desde então a terminologia usada para os microrganismos, os quais são capazes de crescer e se multiplicar a temperaturas de refrigeração e congelamento. Termos como psicrotrófilos, psicrotrófilos facultativos, tolerantes ao frio, psicrotolerantes e psicrotróficos foram usados como sinônimos.

Nakae (1970) classificou os microrganismos em três grupos com respeito às temperaturas ótima e máxima de crescimento: verdadeiros psicrotróficos, mesotróficos psicrotróficos e psicrotróficos mesófilos. Posteriormente, através de uma sugestão feita por Eddy (1960), o termo psicrotrófico passou a ser utilizado para aqueles considerados mesófilos com

respeito à sua temperatura ótima de crescimento, mas com capacidade de crescerem bem a temperaturas abaixo de 10°C.

Em 1976, a *International Dairy Federation* (IDF, 1976), definiu microrganismos psicrotróficos como aqueles que podem crescer à temperatura de 7°C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. Crescimento nesse contexto inclui não somente multiplicação, mas também processos metabólicos, os quais precedem à multiplicação. Para isto, eles possuem mecanismos de adaptação a baixas temperaturas que devem ser conhecidos e considerados, o que pode auxiliar no controle do crescimento desses organismos no leite.

A adaptação a baixas temperaturas é dependente de modificações dos lipídios e das proteínas. Segundo Russel (1990), as alterações nos lipídios são importantes no mecanismo de regulação da fluidez e permeabilidade da membrana celular. De acordo com este autor, alterações nas proteínas são de natureza genotípica e são relacionadas às propriedades das enzimas e ao sistema de tradução.

Uma grande parte dos microrganismos psicrotróficos sintetiza lipídios neutros e fosfolipídios com maior proporção de ácidos graxos insaturados, quando crescem em temperaturas baixas (JAY, 1996). As modificações do conteúdo de ácidos graxos na membrana da célula microbiana, induzidas por baixas temperaturas, sugerem que essas alterações estejam associadas aos mecanismos fisiológicos da célula. O aumento do grau de insaturação dos ácidos graxos leva ao decréscimo no ponto de fusão do lipídio. Portanto, o aumento da síntese de ácidos graxos insaturados em baixas temperaturas tem como função manter o lipídio em estado líquido, permitindo que a membrana continue exercendo sua atividade. Este conceito é conhecido como “teoria da solidificação de lipídios” (JAY, 1996). Essa modificação não é observada em espécies do gênero *Pseudomonas*, considerando que espécies psicrotróficas desse gênero já contêm de 59 a 72% de lipídios insaturados em sua membrana, o que lhes confere maior versatilidade em relação à maioria dos microrganismos (JAY, 1996).

A microbiota psicrotrófica contaminante do leite inclui espécies de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (COLLINS, 1981; EWINGS, 1984; WALKER, 1988; MATTA & PUNJ, 1996; GARCÍA-ARMESTO & SUTHERLAND, 1997). Alguns gêneros de bolores e leveduras também apresentam características do grupo dos psicrotróficos e podem causar problemas de qualidade do leite (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

Os psicrotróficos encontrados no leite podem ser originários do solo, da água, da vegetação, dos tetos e da limpeza deficiente dos equipamentos de ordenha (COUSIN, 1982; SOLER *et al.*, 1995).

Variações sazonais exercem papel relevante na frequência e nas espécies de microrganismos psicrotróficos encontrados no leite, com decréscimo na contagem de microrganismos psicrotróficos no leite produzido no verão em relação à produção no inverno (COUSIN, 1982).

Os psicrotróficos vêm se tornando um problema emergente para a indústria de laticínios devido à introdução da estocagem de leite cru refrigerado (MEER *et al.*, 1991; CROMIE, 1992; SHAH, 1994; CHAMPAGNE *et al.*, 2000). No Brasil, o problema vem sendo agravado pela redução da frequência da busca pelo leite cru na propriedade para somente de duas a três vezes por semana, e pela maior permanência do leite cru na indústria até ser processado.

Embora os psicrotróficos presentes no leite recém-ordenhado representem geralmente 10% da flora total, eles podem se tornar dominantes após algum tempo de estocagem sob refrigeração (FAIRBAIN & LAW, 1986), sendo a maioria pertencente ao gênero *Pseudomonas* (COUSIN, 1982; SHUREN, 1989; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; ENEROTH *et al.*, 2000). Entretanto, em leite produzido sob condições sanitárias inadequadas são encontrados mais de 75% de microrganismos psicrotróficos (COUSIN, 1982).

Uma importante característica dos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (MUIR, 1996; CUNHA & BRANDÃO, 2000; SANTOS & FONSECA, 2003). A inativação completa destas enzimas pelos tratamentos térmicos adotados pela indústria de laticínios não é possível, considerando a sua elevada termorresistência (ZALL & CHAN, 1981). A Tabela 3 mostra bactérias psicrotróficas produtoras de proteases isoladas em leite cru.

Estas enzimas, de origem microbiana, podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem excretadas para o meio (extracelulares) (SANTOS & FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite, quando ocorre a quebra celular das bactérias, após o tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN *et al.*, 1991).

Tabela 3. Bactérias psicrotróficas produtoras de proteases isoladas em leite cru.

<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Escherichia freundii</i>	<i>Ps putrefaciens</i>
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Ps fragi</i>
<i>Aeromonas sp.</i>	<i>Proteus sp.</i>	<i>Ps aureofaciens</i>
<i>Cytophaga sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Ps aeruginosa</i>
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	<i>Ps flourescens</i>	<i>Xanthomonas</i>

Fonte: Adaptação de Law (1979).

As proteases extracelulares de origem microbiana têm a capacidade de atuar diretamente sobre a micela de caseína (LAW, 1979) sendo preferencialmente sobre a κ -caseína com formação de para- κ -caseína, seguida da β -caseína, hidrolisada mais rapidamente que a α -caseína (GRIEVE & KITCHEN, 1985). Já as proteínas do soro são relativamente insensíveis à ação das proteases

de psicrotróficos (FAIRBAIN & LAW, 1986). As proteases podem ser um significativo contribuinte para a formação do gosto amargo no produto (SCHIMIDT, 1990) através de sua capacidade de hidrolisar a caseína disponível em peptídeos solúveis. Juntamente com o defeito de gosto amargo, os sabores de sujo e pútrido são classificados como resultantes da degradação de lipídeos e proteínas (AZZARA & CAMPBELL, 1992).

Muir (1996) considerou que se a contagem de psicrotróficos for maior que 5×10^6 UFC/mL no leite cru antes da pasteurização pode acarretar em grande prejuízo na vida de prateleira deste produto. E ainda, que a flora psicrotrófica termodúrica que resiste à temperatura de pasteurização rápida tem capacidade de se desenvolver a temperaturas de refrigeração, constitui em um dos principais problemas limitantes da qualidade do leite pasteurizado e seus derivados.

Cromie (1991) cita como microrganismos termorresistentes espécies de *Bacillus* e sua capacidade de produzir toxinas que causam doença e algumas cepas psicrotróficas que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas, resistentes ao calor. Estas enzimas são produzidas quando a contagem de bactérias psicrotróficas atinge 10^6 UFC/mL ou mais, e a atividade enzimática pode levar a alterações perceptíveis em leite e derivados (PUNCH *et al.*, 1966; SANTANA *et al.*, 2001), além do desenvolvimento nos resíduos ou depósitos de leite presentes em equipamentos e tubulações de laticínios mal-higienizados (SØRHAUG & STEPANIAK, 1997).

O gênero *Pseudomonas* inclui espécies que apresentam um tempo de geração curto, entre 0 e 7°C, e uma temperatura mínima de crescimento baixa, de até -10°C (SØRHAUG & STEPANIAK, 1997). Também são conhecidas por secretar proteases extracelulares resistentes aos tratamentos de pasteurização e UHT (GRIFFITHS *et al.*, 1981; PATEL *et al.*, 1983). Suhren (1989) afirma que, dentre as espécies do gênero *Pseudomonas*, as mais relevantes na diminuição da qualidade do leite fluido e demais derivados lácteos são *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens*. Segundo Eneroth *et al.* (2000), no leite cru

refrigerado a espécie *P. fluorescens* é predominante sobre as demais. Dogan e Boor (2003) encontraram uma considerável diversidade entre bactérias *Pseudomonas spp* no ambiente de plantas processadoras de leite. Os autores relataram que, apesar de trabalhos anteriores demonstrarem que *Pseudomonas* não sobrevivem à pasteurização comercial e que sua presença no leite pasteurizado deve-se à contaminação pós-pasteurização, quando sua carga inicial é muito elevada, parte destas bactérias pode sobreviver ao tratamento térmico de pasteurização.

Swaigood & Bosoglu (1984) e Calstberg (1992) reportaram que as lipases de origem bacteriana sobrevivem ao tratamento UHT, enquanto que a lipase nativa do leite é completamente inativada.

As pseudomonas e flavobactérias são produtoras de lipase, as quais produzem cadeias médias e curtas de ácidos graxos a partir dos triglicerídeos do leite. Esses ácidos graxos conferem ao leite sabor e aroma de ranço (FORSYTHE, 2002). No leite cru bovino, os psicrotróficos lipolíticos são quase que exclusivamente pseudomonas, sendo a predominante *Pseudomonas fluorescens*, ou *Ps. fragi* (DIECKELMANN *et al.*, 1998; SHELLEY *et al.*, 1987).

A lipólise resulta da ação de lipases (naturais e/ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. A lipase natural presente no leite é uma enzima termosensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos aos lipídios de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto, as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes à temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988). Ternstron *et al.* (1993) citam que a atividade lipolítica dos microrganismos psicrotróficos é de grande importância em laticínios.

Pseudomonas fragi é evidenciada como lipolítica, quando cresce em baixas temperaturas.

Cousin (1982) citou a existência de uma fosfolipase, produzida por psicrotróficos, que pode assumir papel importante na deterioração do leite. Seu mecanismo de ação seria sobre a membrana do glóbulo de gordura. Após a degradação dessa membrana, os lipídios ficariam susceptíveis a ação das lipases.

Haryani et al. (2003) avaliaram o crescimento de psicrotróficos, a produção de proteinases e a proteólise no leite estocado por 10 dias em diferentes temperaturas de refrigeração (2, 4 e 7°C). Os resultados demonstraram uma grande variação dos 3 parâmetros. O tempo necessário para que a contagem de microrganismos psicrotróficos atingisse 10^7 UFC/mL foi de 9, 7 e 4 dias, para as temperaturas de armazenamento de 2, 4 e 7°C, respectivamente. A 2°C a proteólise atingiu níveis significantes após 10 dias de armazenamento, entretanto, a atividade das proteinases já era significativa a partir do 8º dia. Quando o leite foi mantido a 7°C, a proteólise significativa foi detectada após 4 dias de armazenamento e a detecção de atividade das proteases após 2 dias. O tempo mínimo para detecção da proteólise também variou, sendo de 6 dias para as amostras mantidas a 2°C, 4 dias para as amostras a 4°C e 2 dias para as amostras a 7°C. De acordo com os dados obtidos no trabalho citado, o leite cru não deve ser estocado por períodos maiores que o mínimo necessário para a detecção da proteólise para cada temperatura.

A atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas promove a degradação das proteínas, principalmente a caseína, formando peptonas, aminoácidos, polipeptídeos ou mesmo amoníaco causando sabor amargo (ZADOW, 1989). E tem sido responsável pela redução do período de estocagem de leite, por também desestabilizar o produto devido à gelificação das proteínas.

Adams et al. (1976) investigaram a atividade proteolítica de *Pseudomonas* isoladas de 9 amostras de leite cru e mostraram que a maioria degradava a κ -caseína mesmo antes da população atingir 10^4 UFC/mL, e que a

degradação da β -caseína foi mais detectável em maiores populações (10^6 - 10^7 UFC/mL).

As enzimas extracelulares de *P. fluorescens* são metaloproteínas de peso molecular variando de 40.000 a 50.000 Da que requerem cátions com Ca^{2+} e Zn^{2+} para ótima atividade (FAIRBAIN & LAW, 1986).

Devido ao fato de que pequena quantidade das proteases pode agir durante um longo período, sua produção durante a estocagem refrigerada do leite cru é de grande relevância (HARYANI *et al.*, 2003). Murrey *et al.* (1983) retrataram atividade de protease em leite cru estocado por 4 dias a 4°C.

Wiedmann *et al.* (2000), ao submeterem isolados de *Pseudomonas spp.* provenientes de leite à caracterização molecular e fenotípica, constataram que, em cinco grupos de *Pseudomonas spp.*, aqueles incluídos nos grupos B (*P. fluorescens*) e E (*P. fluorescens* ou possivelmente *P. fragii*) continham alta frequência de isolados com atividades de protease, de lipase e de lecitinase. De acordo com os autores, o maior representante deteriorador, de particular preocupação para a indústria de laticínios, é especialmente *P. fluorescens*. Estes autores constataram ainda que somente dois, de 22 isolados pertencentes aos grupos A e D (*P. putida*), exibiram atividade proteolítica e, ou, lipolítica. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Swart *et al.* (1990), citados por Wiedmann *et al.* (2000), que observaram que em 44 dos isolados de *P. putida* provenientes de leite cru, 43 foram negativos para atividade proteolítica e lipolítica.

Griffiths *et al.* (1981) pesquisaram proteases de 13 espécies de *Pseudomonas* isoladas de leite cru que permaneceram retidas (cerca de 55-65%) e em atividade após tratamento à 77°C por 17s.

Stevenson *et al.* (2003) avaliaram a importância da carga microbiana inicial sobre a taxa de crescimento dos microrganismos psicrótrópicos e da produção de enzimas no leite UHT desnatado inoculado com culturas de *Pseudomonas fragi* LC64, *P. fluorescens* HC69, *P. fluorescens* LC52, *P. fluorescens* LC56 e *P. fluorescens* B52 durante o armazenamento a 4°C por 25 dias. Foram

avaliadas amostras com contagem inicial baixa ($<10^3$ UFC/mL) e alta ($> 5 \times 10^6$ UFC/mL). Os autores relataram que as amostras com carga inicial mais elevada apresentaram maior taxa de crescimento (fase exponencial), entretanto nenhuma diferença significativa foi observada quanto à fase adaptativa (fase lag). Diferente do esperado, a produção de proteases e lipases foi detectada mais precocemente nas amostras com carga inicial menor, com exceção da produção de lipases pelo *P. fluorescens* LC64. Estas amostras também apresentaram maiores índices destas enzimas. Os autores concluíram que não há relação de causa entre a habilidade de crescimento dos microrganismos e a produção de enzimas.

Espécies do gênero *Bacillus* podem causar problemas sensoriais no leite UHT, interferindo em sua qualidade durante o armazenamento a 22 e a 37°C, principalmente pelo desenvolvimento de rancificação e por secretarem proteases, lipases e fosfolipases extracelulares de termorresistência comparável à resistência térmica das enzimas produzidas por espécies do gênero *Pseudomonas* (SØRHAUG & STEPANIAK, 1997).

Enzimas endógenas bacterianas que resistem às temperaturas do processo UHT podem levar, durante a estocagem, à formação de sabores (*off-flavors*) de amargo, envelhecido e oxidado (BURTON, 1988). Elas também podem levar ao aumento de viscosidade e gelificação do leite UHT, tornando o leite instável ao calor e provocando a coagulação durante o tratamento térmico (HOLDSWORTH, 1992; BIZARI *et al.*, 2003). Harwalkar (1982) e Fox & MacSweeney (1998) afirmam que a estabilidade do UHT é limitada pela gelificação das proteínas ou por desenvolvimento de sabor amargo, ambos devido à proteólise causada pelas proteases de psicrotróficos produzidas durante a estocagem refrigerada do leite cru.

No leite tratado pelo sistema UHT, o problema com enzimas é bem comum. O leite apenas pasteurizado parece ser mais resistente à proteólise do que o leite UHT. O uso de altas temperaturas durante o processamento pode expor novos sítios moleculares das proteínas à ação das proteases (McKELLAR,

1981). Segundo Araújo (1995), a desnaturação das proteínas, causada pela temperatura elevada utilizada durante o processo UHT, altera várias propriedades importantes das proteínas, do ponto de vista da tecnologia de alimentos. A proteína desnaturada é, geralmente, menos solúvel ou até mesmo insolúvel, promovendo aumento na viscosidade do alimento e tem a reatividade de seus grupos laterais intensificada. Segundo o mesmo autor, a proteína desnaturada é mais sensível à hidrólise por enzimas proteolíticas produzidas por psicrótrófos.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por secretar proteases extracelulares resistentes ao tratamento UHT (GRIFFITHS *et al.*, 1981; PATEL *et al.*, 1983). A protease termorresistente da espécie mais comum do gênero, *P. fluorescens*, pode gelificar leite UHT (MITCHELL & EWINGS, 1985).

Em leite UHT, o problema do aumento da viscosidade com o tempo, ou gelificação, pode ser resultante da ação de enzimas proteolíticas de psicrótrófos (LAW, 1979; MITCHELL & EWING, 1985; KOCAK & ZADOW, 1985; DATTA & DEETH, 2003), da ação da plasmina, uma protease alcalina endógena, (BJÖRCK, 1973; DRIESSEN & VAN DER WAALS, 1978), e com menor intensidade, das células somáticas (AULDIST & HUBBLE, 1998).

A gelificação é uma das principais causas de diminuição na vida de prateleira do leite UHT, podendo reduzir para oito semanas ou menos (VON BOCKELMANN & VON BOCKELMANN, 1998). Diversos são os fatores que influenciam a gelificação, incluindo a natureza do tratamento térmico, a proteólise durante o armazenamento, a composição e a qualidade do leite, a sazonalidade da produção e a temperatura de armazenamento (DATTA & DEETH, 2001).

Kohlmann *et al.* (1991) concluíram que a gelificação do leite UHT ocorre mesmo em baixa concentração de plasmina, quando constataram a ocorrência de gelificação do produto adicionado de plasmina na concentração de 0,15 mg L⁻¹, com 90 dias de estocagem, à temperatura ambiente. A gelificação

foi acompanhada de um aumento da viscosidade e a plasmina agiu, preferencialmente, sobre as α e β -caseínas.

Fajardo-Lira & Nielsen (1998) verificaram que o sistema plasmina-plasminogênio do leite pode ser afetado pelo rompimento da micela de caseína por atividade de proteases de *Pseudomonas*. Portanto, as proteases bacterianas atuam tanto diretamente como indiretamente sobre a qualidade do leite e derivados.

A gelificação com o tempo (*age-gelation*) é definida como um defeito estrito da estocagem do qual ocorre em dois estágios (DATTA & DEETH, 2001). De acordo com estes autores, o primeiro estágio consiste na liberação de dentro da micela do complexo formado entre a β -lactoglobulina desnaturada e a κ -caseína durante o processamento UHT. Por outro lado, De Koning *et al.* (1985), Manji & Kakuda (1988) e Venkatachalam *et al.* (1993) sugerem que a gelificação do leite UHT é somente um resultado de ação enzimática. Muitos autores não conseguiram demonstrar nenhuma correlação entre a causa e a extensão da proteólise no início da gelificação (KOCAK & ZADOW, 1985; SAMEL *et al.*, 1971). Eles sustentam a idéia de que o segundo estágio envolve, exclusivamente, mudanças físico-químicas, que levam à agregação e formação de uma rede protéica tridimensional.

Datta & Hilton (2003) avaliaram o efeito das enzimas endógenas do leite (proteínase alcalina e plasmina) e das enzimas termoestáveis de microorganismos psicrótrópicos, sobre proteólise do leite UHT. O leite foi fracionado e submetido a 3 tratamentos: leite UHT controle; leite UHT com a adição de bactericida e plasmina; leite UHT com a adição de bactericida e proteína microbiana. Os autores relataram que a proteólise ocorreu de forma mais severa nas amostras com adição de proteínas microbianas, sugerindo que as enzimas microbianas exercem um papel mais importante na proteólise do leite UHT.

Law *et al.* (1979) demonstraram que cepas de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. cresceram até aproximadamente 10^7 UFC/mL, produzindo

protease suficiente para degradar β - e κ -caseína, em uma extensão detectável por eletroforese de gel de poliacrilamida (PAGE).

Dados publicados por Kroll (1989), mostram a alta estabilidade das enzimas excretadas pelas *Pseudomonas* spp. através dos valores $D_{150^{\circ}\text{C}}$, sendo de 36-55s para as proteases e de 21-25s para as lipases. Já a lipase de *P.fluorencens* 22F apresenta um valor $D_{150^{\circ}\text{C}}$ de 4,5 min (DRIESSEN & STADHOUDERS, 1974).

Law *et al.* (1997) inocularam leite com *P.fluorescens* AR11, com crescimento mantido até contagens de 5×10^7 e 8×10^6 UFC/ml, antes do tratamento UHT e a gelificação ocorreu em 10 a 14 dias e em 8 a 10 semanas, respectivamente, a 20°C . A protease causou extensiva quebra da κ -caseína em para- κ -caseína de forma similar a ação da quimosina, e ainda observaram que a β -caseína também foi quebrada rapidamente, enquanto a α -caseína foi degradada lentamente.

8. Alterações de sabor em leite UHT

A qualidade sensorial e consequentemente a vida de prateleira do leite UHT no estágio de pósprocessamento são governadas pela progressão de diversas mudanças físico-químicas e bioquímicas (SINGH *et al.*, 2009).

Durante o processo UHT, enzimas termorresistentes nativas ou de origem bacteriana podem resistir e causar, durante a estocagem, tanto gelificação quanto desenvolvimento de *off-flavor* (amargo, envelhecido e oxidado) (BURTON, 1988).

As enzimas responsáveis pela proteólise do leite UHT são, portanto, as proteases bacterianas extracelulares termoresistentes (como já explicitada no item anterior deste capítulo) e as proteases alcalinas endógenas do leite (DATTA & DEETH, 2003; KELLY & FOLEY, 1997). Dentre as proteases nativas, a plasmina está associada com as micelas de caseína e degrada β -caseína à γ -caseína e a proteose-peptonas (DATTA & DEETH, 2003; FOX & MCSWEENEY, 1996).

O nível de peptídeos hidrofóbicos é altamente relacionado com a hidrólise de β -caseína, e a extensão dessa hidrólise está correlacionada com a intensidade do sabor amargo (LEMIEUX & SIMARD, 1991; MARCOS & ESTEBAN, 1999). O sabor amargo indesejável em leite UHT tem sido associado aos peptídeos hidrofóbicos (LEMIEUX & SIMARD, 1991).

As atividades plasmínica e do plasminogênio são maiores em leite mastítico (POLITIS, *et al.*, 1989; BASTIAN & BROWN, 1996). Cauvin *et al.* (1999) indicaram que a plasmina é quase que completamente inativada pelo processamento UHT e descreveram atividade proteolítica do plasminogênio sobre a caseína, confirmada pelo aumento do nível de proteose-peptona no leite UHT.

Compostos voláteis como ácidos acético e butírico, que degradam sensorialmente o leite UHT, podem ser originários tanto de reações de lipólise quanto de proteólise (VALERO *et al.*, 2001).

Burton (1988) sugeriu que o aumento de ácidos graxos livres durante a estocagem de leite UHT é consequência de lipólise causada lipases de bactérias psicotróficas durante o armazenamento refrigerado do leite cru. A lipase nativa é inativada pelo aquecimento de 98°C/ 1s, enquanto que a inativação da lipase de *P. fluorescens* só ocorre após 20 min a 138°C (WALSTRA & JENNESS, 1984). O aumento de ácidos graxos livres, basicamente os de cadeia curta, decorrente da lipólise leva ao indesejável sabor de ranço (KWAK *et al.*, 1989; CHOI & JEON, 1993).

O sabor indesejável da rancidez oxidativa em leite UHT é dado pelos aldeídos de baixo peso molecular e cetonas formados na quebra de ácidos graxos insaturados (NAWAR, 1985; SAXBY, 1993). Jenq *et al.* (1988) mostraram após exposição de leite desnatado em luz fluorescente aumento nas concentrações de aldeídos, propanal e hexanal. Os sabores resultantes são descritos como similares ao de óleo vegetal velho, de papelão, “de cabra”, ou metálico (HEER *et al.*, 1995).

A reação de Maillard, que ocorre durante o processamento UHT, envolve reação dos aldeídos dos açúcares reduzidos com os aminoácidos,

continua seu curso mesmo durante a estocagem do produto, resultando no desenvolvimento de *off-flavors* e de descoloração/*browning* (BURTON, 1984).

O leite UHT é conhecido pelo seu sabor de cozido, notado mais fortemente logo após o processamento, qual posteriormente decresce durante a estocagem (MEHTA, 1980; ANDERSSON & ÖSTE, 1995). Outros indesejáveis *off-flavors* podem, depois, se desenvolver (VALERO *et al.*, 2001).

O sabor de cozido é, em parte, formado pelo aumento de grupos sulfidrilas ativos devido ao desdobramento das moléculas de proteínas, que deixa os grupos S-H expostos e/ou pela reação das pontes de dissulfito nas proteínas do leite (HANSEN & MELO, 1977). Ambos, grupos S-H e metil sulfito no leite UHT são associados ao sabor de cozido (PATRICK & SWAISGOOD, 1976).

O leite UHT é bem aceito no Brasil e em outras partes do mundo, entretanto a população norteamericana é relutante em aceitá-lo devido ao sabor de cozido, já que eles estão familiarizados com sabor de leite fresco (DAIRY BIZ ARCHIVE, 2000), e também por causa de seu maior custo no país (KISSEL, 2004).

Essas reações que levam a alterações no sabor formam a base para se prever a perda de qualidade do leite UHT durante sua estocagem.

9. Referências Bibliográficas

ABLV (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA). Estatísticas de leite longa vida. Disponível em: <www.ablv.org.br>. Acesso em: 05 jul. 2009.

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, v. 59, n. 5, p. 823-827, 1976.

ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. A. F.; CARDOSO, C. F. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1524-1530, set./out., 2008.

ALVIM, R. S.; LUCCHI, B. B.; MARTINS, M. C. Cenário para o agronegócio do leite no Brasil - A visão do setor primário. **Panorama do leite *on line***, n. 33, ago/2009. Disponível em: <www.cileite.com.br/panoramadoleite.php>.

ANDERSSON, I.; ÖSTE, R. Sensory quality of UHT milk. In: Fox, P. F. **Heat-induced changes in milk**, Bruxelas: IDF, 1995, p. 318-330.
ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1995. 335 p.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; SUTHERLAND, B. J.; MAYES, J. J.; MCDOWELL, G. H.; ROGERS, G. L. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, v.63 377-386, 1996.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

AZZARA, C.D.; CAMPBELL, L.B. Off-flavours of dairy products. In: CHARAMLABOUS, G. **Off-flavours in foods and beverages**. Ammsterdan: Elsevier Science Publisher B. V., 1992. p. 329-374.

BARREFORS, P.; GRANELLI, K.; APPELQVIST, L.-A., BJÖRCK, L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavour. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2691-2699, 1995.

BARROS, C. S. R. M. Perspectivas para o agronegócio do leite: a visão da indústria. **Anais do Fórum das Américas: Leite e Derivados e 7º Congresso Internacional do Leite**. Juiz de Fora-MG, jul/2009.

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

BIZARI, P. A.; PRATA, L. F.; RABELO, R. N. Eficiência na contagem microscópica a partir do leite UHT processado na retroavaliação da qualidade da matéria-prima. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 8, n. 47, p. 70-78, set./out.,2003.

BJÖRCK, L. Modifications of casein in ultra-high-temperature treated milk during storage. **Milchwissenschaft**, v. 28, p. 495-499, 1973.

BRADLEY, R. L. J. Effect of light on alteration of nutritional value and flavor of milk: A review. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 314-320, 1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Rio de Janeiro, DF. 7 jul. 1952, Seção I.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996. Seção 1, p.3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n.º 370, de 4 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão do Citrato de Sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, 8 set. 1997. Seção I.

BRITO, J. R. F. Células somáticas no leite: uma revisão. **CBQL em Revista**, v. 1, n. 2, 2002. Disponível em: <<http://www.cbql.com.br/revista/n2/leite2.htm>>. Acesso em: 5 jul. 2009.

BURTON, H. An introduction to ultra high temperature processing and plant. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 30, n. 3, p. 135-142, 1977.

BURTON, H. Monograph on pasteurized milk - microbiological aspects. **Bulletin International Dairy Federation**, n. 200, p. 9-14, 1986.

BURTON, H. The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150 °C. **Journal of Dairy Research**, v.51, p. 341-363, 1984.

BURTON, H. **Ultra-high-temperature processing of milk and milk products**. London: Elsevier Applied Science, 1988.

CALLIGARIS, S.; MANZOCCO, L.; ANESE, M.; NICOLI, M. C Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 421-427, 2004.

CALSTBERG, H. B. Lipase activity. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, v. 271, p. 18-20, 1992.

CARDOSO, C. F. **Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CELFF, O. Aseptic packaging. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 133, p. 93-104, 1981.

CERQUEIRA, M. M. O. P; SOUZA, M. R.; SENA, M. J. Fatores determinantes na qualidade do leite - estudo de uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 241-245, 1999.

CHAMBERS, J.V.; NELSON, P.E. **Principles of aseptic processing and packaging**. 2ª ed. Washington, 1993. 257 p.

CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. P.; ROY D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: their effect and their control. **Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 34, p.1-30, 2000.

CHOI, I. W.; JEON, I. J. Patterns of fatty acids released from milk fat by residual lipase during storage of ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 78-85, 1993.

CLADMAN, W.; SCHEFFER, S.; GOODRICH, N.; GRIFFITHS, M. W. Shelf life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 629-636, 1998.

CODEX ALIMENTARIUS. **Code of hygienic practice for aseptically processed and packaged low-acid foods**: CAC/RCP 40-1993. Rome: FAO/WHO, 1993. 34 p.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal Dairy Research**, v. 64, p. 157-160, 1981.

CNA (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL). Previsão de crescimento para agronegócio do leite. **Informativo técnico Revista Gleba**, mar./abr, 2003. Disponível em: < <http://www.cna.org.br/Gleba03/MarAbr/LEITE.htm> >. Acesso em: 11 Agosto 2009.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection** v. 54, n. 2, p. 172-207, 1982.

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

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

DATAMARK. **Consumo de materiais: dados de embalagens**. Disponível em <http://www.datamark.com.br>. Acesso em: 06 Setembro 2009.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Age gelation of UHT milk - a review. **Food and bioproducts processing**, v. 79, p. 197-210, 2001.

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

DATTA, N.; HILTON, C.D. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.

DAIRY BIZ ARCHIVE. 2000. **Electric milk**. http://www.moomilk.com/archive/feature_48.htm. Acesso em: 13 jun. 2010.

DE KONING, P. J.; KAPER, J.; ROLLEMA, H. S.; DRIESSEN, F. M. Age-thinning and gelation in unconcentrated and concentrated UHT sterilized skim milk. Effect of native milk proteinase. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 39, p. 71-87, 1985.

DE MARTINO, D. B. A escalada do leite longa vida. **Engarrafador Moderno**, São Bernardo do Campo, v. 10, n. 86, p. 10-15, jun, 2001.

DIECKELMANN, M.; JOHNSON, L. A.; BEACHMAN, I. R. The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas* : a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 527-536, 1998.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

DRIESSEN, F. M.; STADHOUDERS, J. Thermal activation and inactivation of exocellular lipases of some Gram-negative bacteria common in milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 28, p. 10-24, 1974.

DRIESSEN, F. M.; VAN DER WAALS, C. B. Inactivation of native milk proteinase by heat treatment. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 32, p. 245-254, 1978.

DUNKLEY, W. L.; STEVENSON, K. E. Ultra-high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2192-2202, 1987.

EARLEY, R. R.; HANSEN, A. P. Effect of process and temperature during storage on ultra-high temperature steam-injected milk. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 11-16, 1982.

EARLY, R. **Tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, España, 2 ed., 1998, 459 p.

EDDY, B. P. The use of therm Psychrotrophic. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 189-190, 1960.

ELIZALDE, B. E.; DALLA ROSA, M.; LERICI, C. R. Effect of Maillard reaction volatiles on lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, p. 758-762, 1991.

ELLIOTT, A. J.; DHAKAL, A.; DATTA, N.; DEETH, H. C. Heat-induced changes in UHT milks - Part 1. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 3-10, 2003.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Produção, industrialização e comercialização (consumo)**. Disponível em: <www.cnp.gl.embrapa.br>. Acesso em: 12 jun. 2010.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000.

EWINGS, K. N.; O'CONNOR, R. E.; MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, n. 6, p. 65-68, 1984.

FAIRBAIN, D. J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.

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

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8th edition. Revision A, Chapter 14. 1998.

FARIA, J. A. F. **Estabilidade de alimentos processados assepticamente**. In: II SEMINÁRIO LATINO AMERICANO - AVANÇOS EM TECNOLOGIA PARA O PROCESSAMENTO E ENVASAMENTO ASSÉPTICO DE ALIMENTOS. Campinas: 1993. p. 7-28.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FOSCHINO, R.; GAIL, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. **Annali di Microbiologia Ed Enzymologia**, v. 40, p. 47-59, 1990.

FOX, P. F; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 517-532, 2006.

FOX, P. F; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. 478 p.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2 ed. São Paulo: Editora Globo, 1990. 297 p.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 261-270, 1997.

GOFF, H. D.; GRIFFITHS, M. W. Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1163-1173, 2006.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85 p.

GRIEVE, P. A.; KITCHEN, M. L. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte and natural milk proteinases on caseins. **Journal of Dairy Research**, v. 52, p. 101-112-, 1985.

GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289, 1981.

GUILLAUME-GENTIL, O.; SCHEIDEMAN, P.; MARUGG, J.; HERMAN, L.; JOOSTEN, H.; HEYNDRICKX, M. Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4216-4224, 2002.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M. A.; LAURENT, F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 211-223, 1995.

HAMMER, P.; LEMBKE, F.; SAHREN, G.; HEESCHEN, W. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk - a preliminary report. **Kiel Milchwirtschafts Forschungsber**, v. 47, p. 303-311, 1995.

HANSEM, A. P.; MELO, T. S. Effect of ultra high temperature steam injection upon constituents of skim Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 9, p.1368-1373, 1977.

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.

HARWALKAR, V. R. Age gelation of sterilized milks. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. London: Applied Science, 1982. p. 229-269.

HAVEMOSE, M. S.; WEISBJERG, M. R.; BREDIE, W. L. P.; NIELSEN, J. H. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 563-570, 2004.

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.

HEDEGAARD, R. V.; KRISTENSEN, D.; NIELSEN, J. H.; FRØST, M. B.; ØSTDAL, H.; HERMANSEN, J. E.; KRÖGER-OHLSSEN, M.; SKIBSTED, L. H. Comparison of descriptive sensory analysis and chemical analysis for oxidative changes in milk. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 495-504, 2006.

HEER, A. K.; DUNCAN, S. E.; BROCHETTI, D. Sensory detection of and consumer response to off-flavors in milk. **Dairy Food Environmental Sanitization**, v. 15, p. 488-493, 1995.

HILL, A. R. Quality of ultra-high-temperature processed milk. **Food Technology**, v. 42, p. 92-97, 1988.

HOLDSWORTH, S. D. **Aseptic Processing and Packaging of Food Products**. London: Elsevier Applied Science, 1992. 428 p.

HUEMER, I.; KLIJN, N. ; VOGELSANG, H. ; LANGEVELD, L. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT-milk. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 851-855, 1998.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Psychrotrophs in milk and milk products**. IDF E Doc 68, International Dairy Federation, Brussels, 1976.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661 p.

KARATAPANIS, A. E.; BADEKA, A. V.; RIGANAKOS, K. A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time, **International Dairy Journal**, v.16, p. 750-761, 2006.

KELLY, A. L.; FOLEY, J. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/b-lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 411-420, 1997.

KESSLER, H. G.; PFEIFER J.; SCHWÖPPE, C. Untersuchungen über hitze resistente mesophile *Bacillus*-sporen in UHT-milch. **Deutsche Milchwirtschaft**, v. 13, p. 588-592, 1994.

KISSELL, J. **Milk in a box, losing the bottle** (Interesting thing of the day). <http://itotd.com/articles/220/milk-in-a-box/>. 2004. Acesso em 10 mai. 2010.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 1, p. 167-188, 1981.

KLIJN, N.; HERMAN, L.; LANGEVELD, L.; VAEREWIJK, M.; WAGENDORP, A.; HUEMER, I.; WEERKAMP, A. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 421-428, 1997.

KOCAK, H. R.; ZADOW, J.G. Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 40, p. 14-21, 1985.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LANDISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 3275-3283, 1991.

KOMOROWSKI, E. S.; EARLY, R. Liquid milk and cream. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**. 1st ed. New York: VCH Publishers, Inc, 1992. Cap.1. p. 10-15.

KROLL, S. Thermal stability. In: McKELLAR, R. C., **Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods**, Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, p. 121-152.

KWAK, H. S.; JEON, I.; PERING, J. S. Statistical patterns of lipase activities on the release of short-chain fatty acids in cheddar cheese slurries. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 1559-1563, 1989.

LAW, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A.T.; CLIFFE, A.J.; SHARPE, M. E.E; CHAPMAN, H.R. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on cheddar cheese-making with stored milk. **Journal of Dairy Research**, v. 46, p. 497-509, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A.T.; SHARPE, A. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, n. 1, p. 145-148, 1977.

LEMIEUX, L.; SIMARD, R. E. Bitter flavour in dairy products, II. A review of bitter peptides from caseins: Their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. **Lait**, v. 72, p. 335-382, 1992.

LEWIS, M. J. Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk. In: SMIT, G. **Dairy Processing: Improving Quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2003. Cap.5.

LINGNERT, H.; WALLER, G. R. Stability and antioxidants formed during histidine and glucose by Maillard reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 27-30, 1983.

MA, Y.; RYAN, C; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M.; BOOR, K. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 264-274, 2000.

MACHADO, P. F. **O futuro do agronegócio do leite no Brasil**. Anuário 2001/ 2002 Milkbuzz, 2001. 408 p.

MANJI, B.; KAKUDA, Y. The role of protein denaturation, extent of proteolysis, and storage temperature on the mechanism of age gelation in a model system. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1455-1463, 1988.

MARCOS, A.; ESTEBAN, M. A. (1999). Iberian cheeses. In: FOX, P. F. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, Vol. 2, 2 ed. Maryland, USA: Aspen Publishers, 1999., p. 173-219.

MARCY, J. E.; NAGY, S. Symposium on nutritional, sensory and chemical changes associated with aseptic packaging of foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 13, p. 40-43, 2000.

MAUBOIS, J. L. Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2, p. 92-96, 2002.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of proteolytic psychrotrophic sporeforming bacteria from milk. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 49, p. 695-699, 1996.

McKELLAR, R. C. Development of off-flavours in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 11, p. 2138-2145, 1981.

MEER, R. R.; BAKER, J., BODYFELT, F. W. AND CRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Food Protection**, v. 54, p. 969-979, 1991.

MEHTA, R. S. Milk processed at ultra-high-temperatures. A review. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 212-225, 1980.

MEHTA, R. S.; BASSETTE, R. Effects of carton material and storage temperature on the flavour of UHT-sterilized milk. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 392-394, 1979.

MESTDAGH, F.; DE MEULENAER, B.; DE CLIPPELEER, J.; DEVLIEGHERE, F., HUYGHEBAERT, A. Protective influence of several packaging materials on light oxidation of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 499-510, 2005.

MILKPOINT. Estatísticas da produção mundial de leite. Disponível em <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundial.htm>. Acesso em 13 jun. 2010.

MITCHEL, G. E.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 20, p. 65-76, 1985.

MOYSSIADI, T.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; VAKIRTZI, T.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. G. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: Chemical and sensorial aspects. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 429-436, 2004.

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.

MURRAY, S.K.; KWAN, K.K.H.; SKURA, B.J.; MCKELLER, R.C. Effects of nitrogen flushing on the production of proteases by psychrotrophic bacteria in raw milk. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 395-404, 1983.

NA TOCAIA: Pouch com barreira sonda chances de bulir com a caixa cartonada em leite longa vida. **Plástico em Revista**, n. 516, ano 44, p. 20-22, junho, 2006.

NAKAE, T. Characterization and classification of psychrotrophic bacteria in milk by means of temperature-gradient incubation. **Milchwissenschaft**, v. 25, n. 3, p. 161-167, 1970.

NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**. v. 64, p. 1431-1442. 1981.

NAWAR, W. W. Lipids. In: Fennema, O. R., editor. **Food Chemistry**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p. 176-202, 1985.

NETTO, V. N.; BERNARDES, P. R.; MARTINS, P. C.; NERI, C. B. S. Reflexões sobre políticas para o agronegócio do leite. In: Martins et al. **Tecnologias alternativas para a produção de leite e derivados em bases sustentáveis**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 2004. p.11-18.

NEWSTEAD, D. F.; PATERSON, G.; ANEMA, S. G.; COKER, C. J.; WEWALA, A. R. Plasmin activity in direct-steam-injection UHT-processed reconstituted milk: Effects of preheat treatment. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 573-579, 2006.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C. R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degrees. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, p. 292-297, 1997.

OLIVEIRA L. C.; GOMES, M. F.; VELLOSO, C. R. V. Modernização da Legislação Sanitária Federal sobre Leite e Derivados. In: CASTRO, M. C. D.; PORTUGAL, J. A. B. **Perspectivas e Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000. 278 p.

OLIVERIA, J. S.; PARMALEE, C. E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal Milk of Food Science and Tecchnology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 269-272, 1976.

PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; ARDITO, E. F. G.; GARCIA, E. E. C.; OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V. **Embalagens plásticas: controle de qualidade**. Campinas, ITAL/SBCTA, 1989. 202 p.

PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 90-94, 1983.

PATRICK, P. S.; SWAISGOOD, H. E. Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high-temperature heating and subsequent storage. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 594-600, 1976.

PETRUS, R. R. **Adaptação e avaliação de desempenho de sistema asséptico para leite fluido em garrafa plástica**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

POLITIS, I.; LACHANCE, E.; BLOCK, E.; TURNER, J. D. Plasmin and plasminogen in bovine milk: A relationship with involution. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 900-926, 1989.

PUNCH, J. D.; OLSON, J. C.; THOMAS, E. L. Psychrophilic bacteria: III population levels associated with flavor or physical change in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1178-1183, 1965.

REUTER, H. Processes for packaging materials sterilization and system requirements. In: REUTER, H. **Aseptic Processing of Foods**. 1st ed. Hamburg: Technomic, 1993. Cap. 5, p.155-165.

RUSSEL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B: Biological Science**, v. 326, p. 608-611, 1990.

SAFFERT, A.; PIEPER, G.; JETTEN, J. Effect of package light transmittance on vitamin content of milk. Part 2: UHT whole milk. **Package Technology Science**, v. 21, p. 47-55, 2008.

SAMEL, R.; WEAVER, R. W. V.; GAMMACK, D. B. Changes on storage in milk processed by ultra-high-temperature sterilization. **Journal of Dairy Research**, v. 38, p. 323-332, 1971.

SANCHEZ, C. P. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

SANTOS, M. V. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: **O Brasil e a nova era do mercado do leite - Compreender para competir**. Piracicaba-SP: Agripoint Ltda, 2007, v.1, p. 135-154.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Bactérias psicrotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, v. 19, p. 12-15, 2003.

SARKAR, S. Techniques to extend the shelf life of pasteurized milk. **Indian Food Industry**, v. 18, n. 3, p. 174-177, 1999.

SATTAR, A.; DEMAN, J. M. Photooxidation of milk and milk products: A review. **Indian Journal of Dairy Bioscience**, v. 9, p. 1-7, 1975.

SAXBY, M. J. Food taints and off-flavors. Glasgow, UK: Blackie Academic & Prof. p. 150-163, 1993.

SCHMIDT, R. H. Bitter components in dairy products. In: ROUSSEF, R.L. (Ed). **Bitterness in food and beverages**. Elsevier Science Publishers Ltda. Amsterdam, The Netherlands. 1990, p.182-204.

SCHMIDT R.; RENNER E., Sensorische und chemische Veränderungen während der Lagerung haltbarer Milchsorten. II Chemische Veränderungen. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** v. 11, p. 244-248, 1978.

SCHRÖDER, M. J. A. Effect of oxygen on the keeping quality of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 407-424, 1982.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.

SHAPTON, D. A.; SHAPTON, N. F. **Principles and Practices for the Safe Process of Foods**. Oxford: Heinze, 1991. 457 p.

SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; MCRAE, I. C. A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic storage of raw milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p. 197-207, 1987.

SHIPE, W. F.; BASSETTE, R.; DEANE, D. D.; DUNKLEY, W. L.; HAMMOND, E. G.; HARPER, W. J.; KLEYN, D. H.; MORGAN, M. E.; NELSON, J. H.; SCANLAN, R. A. Off flavors of milk: Nomenclature, standards, and bibliography. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 855-869, 1978.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas em alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado, uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1988.

SINGH, R. R. B.; RUIHIL, A. P.; JAIN, D. K.; B; PATEL, A. A.; PATIL, G. R. Prediction of sensory quality of UHT milk - A comparison of kinetic and neural network approaches. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p.146-151, 2009.

SKIBSTED, L. H. Light induces changes in dairy products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 345, p. 4-9, 2000.

SMET, K.; DE BLOCK, J.; DE CAMPENEERE, S.; DE BRABANDER, D.; HERMAN, L.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; K. Coudijzer, K. Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 372-379, 2009.

SMET, K.; RAES, K.; DE BLOCK, J.; HERMAN, L.; DEWETTINCK, K.; COUDIJZER, K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 520-530, 2008.

SOLER, C. P. A.; DE PAZ, M.; NUÑEZ, M. The microbiological quality of milk produced in the Baleric Islands. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 69-74, 1995.

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

SOUZA, D. P. H. **Análise da estrutura de custo e preço de sobrevivência dos principais sistemas de produção de leite**. Viçosa, UFV, 2000. 85 p.

STEVENSON, R. G.; ROWE, M. T.; WISDOM, G. B.; KILPATRICK, D. Growth kinetics and hydrolytic enzyme production of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 3, p. 293-296, 2003.

SUHREN, G. Producer Microorganisms. In: MCKELLAR, R.C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca-Raton: CRC Press, 1989, p. 3-34.

SWAISGOOD, H. E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC 50. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 32, p. 7, 1984.

TERNSTRON, A.; LINDBERG, A. M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v. 75, p. 25-34, 1993.

TOLEDO, R. T.; CHAPMAN, J. R. Aseptic packaging in rigid plastic containers. **Food Technology**, v. 27, n.11 p. 68-76, 1973.

VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; MIRALLES, B.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. **Food Chemistry**, v. 72, p. 51-58, 2001.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E.; LONG, T. E.; O'KEEFE, S. F.; NIELSEN-SIMS, S. R. Effect of antioxidant (α -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 872-880, 2005.

- VASSILA, E.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. G. Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packaging conditions. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 715-722, 2002.
- VATNE, K. B.; CASTBERG, H. B. Processing and packaging aspects of extended shelf life products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 46, p. 98-100, 1991.
- VENKATACHALAM, N.; MCMAHON, D. J.; SAVELLO, P. A. Role of protein and lactose interactions in the age gelation of ultra-high temperature processed concentrated skim milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1882-1894, 1993.
- VERDI R. J.; BARBANO, D. M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 772-782, 1991.
- VON BOCKELMANN, B.; VON BOCKELMANN, I. **Long-Life Products: Heat-Treated, Aseptically Packed: A Guide to Quality**. Värnamo, Sweden: Fälth & Hässler, 1998. 246 p.
- WALKER, S. J. Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 41, p. 91-92, 1988.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R.; BADINGS, H. T. **Dairy Chemistry and Physics**. Wiley-Interscience, New York, 1984. 467 p.
- WESTHOFF, D. C. Heating milk for microbial destruction: a historical outline and update. **Journal of Food Protection**, v. 41, n. 2, p. 122-130, 1978.
- WHITED, L. J.; HAMMOND, B. H.; CHAPMAN, K. W.; BOOR, K. J. Vitamin A degradation and light-oxidized flavor defects in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 351-354, 2002.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2085-2095, 2000.
- WOLD, J. P. Understanding and measuring photooxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy. **Spectroscopy**, v. 18, p. 8-13, 2006.
- YEN, G. C.; TSAI, L. C. Antimutagenicity of partially fractionated Maillard reaction products. **Food Chemistry**, v. 47, p. 11-15, 1993.

ZACARCHENCO, P. B.; LEITÃO, M. F. F.; DESTRO, M. T. ; ANDRIGUETO, C. Ocorrência de *B. sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 20, n. 3, p. 363-368, 2000.

ZADOW, J. G. Extending the shelf life of dairy products. **Food Australian**, v. 41, n. 9, p. 935-937, 1989.

ZALL, R. R.; CHAN, J. H. Heating and storing milk on dairy farms before pasteurization in milk plants. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 7, p. 1540-1544, 1981.

CAPÍTULO 2

**Influência da temperatura de armazenamento de
leite cru na qualidade de leite UHT em embalagem
flexível**

Influência da temperatura de armazenamento de leite cru na qualidade de leite UHT em embalagem flexível

Influence of raw milk storage temperature on the quality of UHT milk in flexible package

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar a influência da temperatura de armazenamento do leite cru na qualidade de leite UHT em embalagem flexível, estocado no escuro à temperatura ambiente. Leite cru foi armazenado por três dias a 3, 7 e 10°C, processado em sistema UHT (*ultra high temperature*) indireto e embalado em bolsas de polietileno de baixa densidade (PEBD). Também foi produzido leite UHT com leite cru da ordenha do dia (amostra controle). Os lotes de leite UHT foram estocados no escuro à temperatura ambiente. Análises sensoriais e acompanhamento da extensão da proteólise e da lipólise foram realizadas durante 8 semanas de estocagem. Maior desenvolvimento bacteriano foi verificado no leite cru armazenado à 10°C, que apresentou aumento de 3,10 log e 2,58 log nas populações de psicotróficos e de *Pseudomonas*, respectivamente. Da mesma forma, o lote de leite UHT produzido com leite cru que foi armazenado à maior temperatura apresentou maior extensão de proteólise e lipólise, com diminuição da relação caseína/proteína e aumento do teor de ácidos graxos livres ao longo do tempo de estocagem. Na oitava semana de estocagem, todos os lotes de leites UHT, inclusive o controle, foram rejeitados pelos provadores através dos atributos de sabor e impressão global. Os resultados mostram que o leite UHT em embalagem flexível produzido com leite cru de boa qualidade, quando armazenado por 3 dias de refrigeração, apresentou vida de prateleira máxima de 7 semanas quando estocado no escuro à temperatura ambiente.

Palavras-chave: leite cru, leite UHT, estocagem, vida de prateleira.

ABSTRACT

This work has studied the influence of raw milk microbial quality on flexible packaged UHT milk, stored in dark at room temperature. For this, raw milk was stored for 3 days at temperatures of 3, 7 and 10°C to use in UHT processing and package in low density polyethylene (LDPE). It was also produced UHT milk with raw fresh milk (control sample). The UHT milks were storage under light protection at room temperature. Sensory analysis was performed, as well as proteolysis and lipolysis extension. Observations revealed a larger bacterial growth on the higher storage temperatures of raw milk, reaching an increase of 3.10 and 2.58 log of the populations of psychrotrophs and *Pseudomonas*, respectively. In the same way, the UHT milk made from raw milk with higher temperature and storage time showed more proteolysis and lipolysis, with lower casein/TP and higher values of free fatty acids. On the eighth week of storage, all the UHT milk samples, including the control produced with the fresh milk, were rejected by the panelists on the attributes of taste and overall linking. These lead to the conclusion that flexible package UHT milk produced from good quality raw milk, when submitted to 3 days refrigeration, present a maximum of 7 weeks shelf life under room temperature and in the absence of light.

Keywords: raw milk, UHT milk, storage, shelf life.

1. INTRODUÇÃO

A Instrução Normativa (IN) 51/2002, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002), preconiza que os tanques de expansão direta no sistema de coleta a granel, refrigerem o leite à temperatura igual ou inferior a 4°C pelo período máximo de três horas após o término da ordenha. Esta Instrução ainda estabelece que o tempo transcorrido entre a

ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial deve ser de, no máximo, 48 horas, recomendando como ideal não ser superior a 24 horas. A legislação brasileira permite ainda o uso de tanques de expansão comunitários. O tempo transcorrido entre ordenha e chegada do leite ao tanque e as repetidas vezes em que isso é realizado, implica em um tempo excessivo para que o leite alcance uma temperatura de refrigeração adequada. Além disso, as usinas beneficiadoras, como as de leite longa vida, ainda armazenam o leite cru antes do tratamento UHT. Outra prática conhecida é a pasteurização do leite cru e o armazenamento por um período maior de tempo antes do tratamento UHT. A falta de estudos e dados estatísticos sobre essa situação permite apenas supor a gravidade da mesma. Portanto, essa legislação, apesar de representar um grande avanço para a melhoria da qualidade do leite, principalmente para a redução de perdas pela acidificação causada pelas bactérias mesófilas em leite não refrigerado, gerou um novo e emergente problema que é o crescimento de bactérias psicotróficas.

A maioria das bactérias psicotróficas produz enzimas extracelulares, proteolíticas e lipolíticas, que não são inativadas pelo processamento UHT (GRIFFITHS *et al.*, 1981). A atividade residual dessas enzimas compromete a qualidade sensorial e a vida de prateleira de leite UHT (SPECK & ADAMS, 1976; LAW *et al.*, 1977; FOX, 1981; COUSIN, 1982; VALERO *et al.*, 2001; TOPÇU *et al.*, 2006). Proteólise em leite UHT ocasiona aparecimento de gosto amargo e formação de gel (KELLY & FOLLEY, 1997; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; DATTA & DEETH, 2003). Já a hidrólise lipolítica causa liberação de cadeias de ácidos graxos responsáveis pelo sabor de ranço no produto (SINGH & PATIL, 1989; DEETH, 2006).

Embora os psicotróficos presentes no leite recém-ordenhado representem geralmente 10% da flora total, eles podem se tornar dominantes após algum tempo de estocagem sob refrigeração (FAIRBAIN & LAW, 1986), sendo que as pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são as mais presentes (COUSIN *et al.*, 1982; SØRHAUG & STEPANIAK, 1997; ENEROTH *et al.*, 1998; WIEDMANN *et*

al., 2000). Esse gênero inclui espécies que apresentam tempo de geração curto, entre 0 °C e 7 °C, e temperatura mínima de crescimento baixa, de até -10 °C (CHANDLER & McMEEKIN, 1985). *Pseudomonas* spp está dentre os principais gêneros bacterianos de cepas psicrotróficas produtoras de enzimas termoresistentes que causam alterações no leite e derivados (COX, 1993). Foi descrito que proteases de 13 espécies de *Pseudomonas* psicrotróficas retiveram entre 55 e 65% de sua atividade após tratamento de 77°C por 17s, e ao redor de 20 a 40% após tratamento de 140°C por 5s (GRIFFITHS, 1989). *Pseudomonas fluorescens* é descrita como a espécie predominante da flora do leite refrigerado e é enzimaticamente ativa, retendo uma atividade residual após tratamento térmico entre 14% e 51% (MUIR, 1996).

Reinheimer *et al.* (1990) constataram que todas as cepas de *Pseudomonas*, do leite submetido ao período de armazenamento refrigerado, apresentaram atividades psicrotrófica, proteolítica e lipolítica, enquanto que sem o armazenamento somente 74% era psicrotrófica, apenas 7% apresentaram atividade lipolítica, 66% baixa atividade proteolítica e nenhuma apresentaram alta atividade proteolítica. Outros autores observaram maior produção de proteinase (FAIRBAIN & LAW, 1986; McKELLAR, 1982) ou lipase (BUCKY *et al.*, 1986) em baixas temperaturas, comparativamente com a temperatura ótima de crescimento, em cepas de psicrotróficos que cresceram em diferentes ambientes.

O leite tratado à ultra-alta temperatura (UHT) tornou-se um produto de fácil comercialização e consumo (BASTOS, 1999). Hoje ele é destacado por apresentar grande preferência nacional, representando ao redor de 75% das vendas de todo leite fluido no país (EMBRAPA, 2009).

No início dos anos 70, o Canadá seguido pelos Estados Unidos e mais recentemente pela Noruega e México, introduziu no mercado leite UHT em embalagens de polietileno tipo bolsa. A embalagem flexível, em oposição às rígidas, pode resultar em economia de 60-70% pela redução de peso de 70-90% da embalagem, reduções no volume de estocagem de 20-30% e nos custos de

distribuição de mais de 60% (PIRA, 1994). Os problemas relativos a todas as embalagens plásticas, entretanto, incluem transmissão de luz e permeabilidade ao oxigênio. A estocagem de leite em embalagens sem proteção de luz aumenta o desenvolvimento e a detecção de *off-flavors* relativos à oxidação (MOYSSIADI et al., 2004; KARATAPANIS et al., 2006; SMET et al., 2009). Esses sabores são provenientes da formação de aldeídos de baixo peso molecular e de cetonas da quebra de ácidos graxos insaturados (NAWAR, 1985; SAXBY, 1993). Smet *et al.* (2009) observaram que ao se usar embalagem protegida de luz, o leite UHT não sofria oxidação ao longo de 3 meses de estocagem.

Este trabalho objetivou investigar como o armazenamento de leite cru refrigerado por três dias a três diferentes temperaturas (3, 7 e 10°C), influenciou na sua qualidade microbiológica e nas características físico-químicas e vida de prateleira de leite UHT com ele produzido, acondicionado em embalagem flexível de PEBD e estocado à temperatura ambiente na ausência de luz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Captação, recepção e armazenamento do leite cru

A matéria-prima foi leite cru refrigerado tipo A, Atilatte, Fazenda Atibainha, Itatiba - SP e Agrindus S/A, Fazenda Santa Rita, Descalvado - SP. Após a ordenha o leite foi resfriado (4°C) em tanque de expansão e transportado, em latões de polietileno de 50 L, para o Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP para o desenvolvimento da pesquisa. Foram utilizados 400 L de leite em cada ensaio.

O leite cru recepcionado, da ordenha do dia, foi dividido em 4 partes de 100 L cada, sendo submetido aos seguintes tratamentos: A) sem armazenamento refrigerado - controle; B) armazenamento a 3° C ($\pm 0,5$) por três dias; C) armazenamento a 7,3°C ($\pm 0,9$) por três dias; D) armazenamento a 10,3°C

($\pm 0,7$) por três dias. O armazenamento foi efetuado em latões dentro de câmaras de refrigeração e as temperaturas foram medidas diariamente.

2.2. Processamento de leite UHT

2.2.1. Sistema UHT

O sistema usado era composto basicamente pelos seguintes elementos: tanques de matéria-prima (Osmec Industrial Ltda., Campinas - SP); válvulas borboleta; bomba centrífuga (Fabo Bombas e Equipamentos Ltda., Curitiba - PR); homogeneizador de pistão com dois estágios (Alitec Comércio e Indústria Ltda., Pindamonhangaba - SP), trocador de calor a placas (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas - SP) com tubo de retenção, sensor de temperatura tipo termorresistência PT100 e válvula êmbolo de desvio de fluxo (para o tanque de matéria-prima ou para a linha asséptica); manômetro; placa de orifício e máquina de embalagem tipo forma, enche e fecha (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas - SP). A configuração, desenvolvida por Walter (2010) está descrita na Figura 1.

A esterilização das embalagens foi efetuada por imersão em solução de peróxido de hidrogênio 35% (marca Asepticer, Peróxido do Brasil Ltda., Curitiba - PA) a 35 ± 2 °C por 13 s e exposição à radiação ultravioleta de $260 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ em 254 nm por pelo menos 1,0 s, emitida por lâmpada TUV 15W T5 (Philips do Brasil Ltda., São Paulo - SP) 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. O residual de H_2O_2 imediatamente após a produção das embalagens com água ou com leite UHT ficou na faixa de 8,7 e 12,5 mg/L. Esse residual foi decomposto em algumas horas, não sendo detectado após 1 dia de estocagem. A legislação brasileira (BRASIL, 1996) não especifica padrões legais para os teores residuais de H_2O_2 nas embalagens. O USFDA (2009) estabeleceu um limite máximo de 0,5 mg/L para esterilização de embalagens. O Ministério da Saúde em Informe Técnico, não considera concentrações na faixa de 300 a 800 mg/L como um risco à saúde (BRASIL, 2007). Desse modo, os

residuais de H_2O_2 verificados foram considerados aceitáveis ao envase de leite UHT.

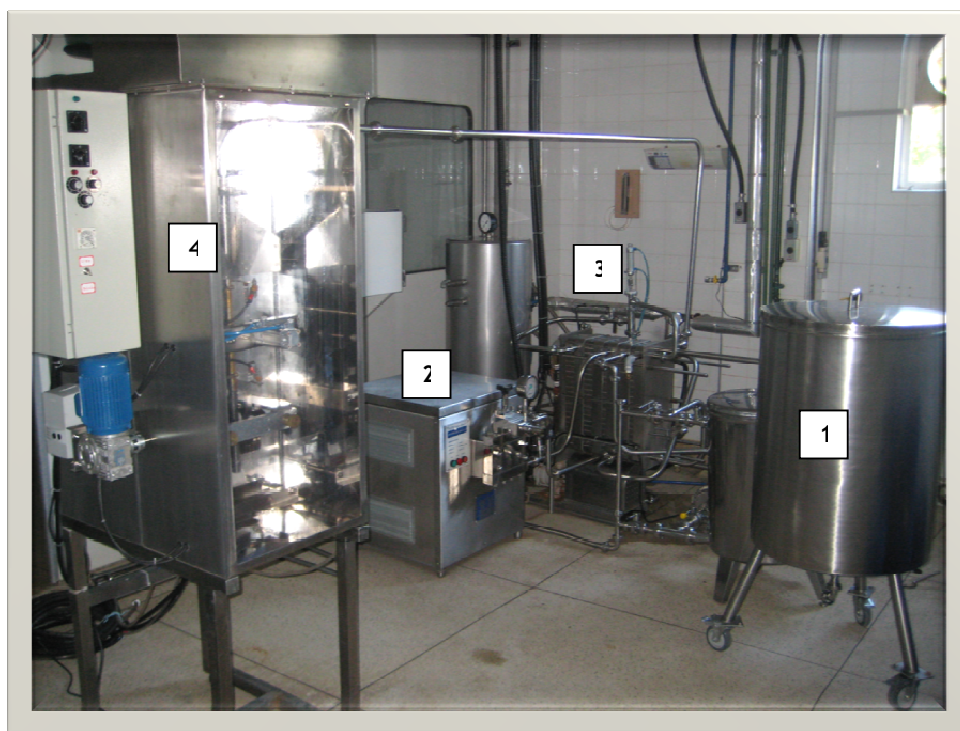


Figura 1: Sistema UHT (1. tanques de matéria-prima; 2. homogeneizador; 3. trocador de calor; 4. máquina de embalagem).

A filtração do ar foi efetuada através de sistema composto por pré-filtro plano plissado em manta de fibras sintéticas classe G3 (Filtracom Ltda., Valinhos - SP), exaustor centrifugo tipo EC1-AR (Metalúrgica Ventisilva Ltda., São Paulo - SP) com conversor de frequência e filtro absoluto plano em papel de microfibras de vidro classe A3 (Filtracom Ltda., Valinhos - SP), tipo *high efficacy particle air* (HEPA), conforme classificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (1980). Esse sistema era localizado na parte superior da máquina de embalagem, com sucção de ar da parte traseira e insuflamento na parte dianteira, onde era realizada a formação, o enchimento e o fechamento das

embalagens. A filtração do ar era iniciada pelo menos 1 h antes da operação de envase.

As produções de leite UHT foram realizadas conforme o esquema da Figura 2. O processamento foi realizado em triplicata a partir de quatro diferentes amostras, resultando assim em doze ensaios.

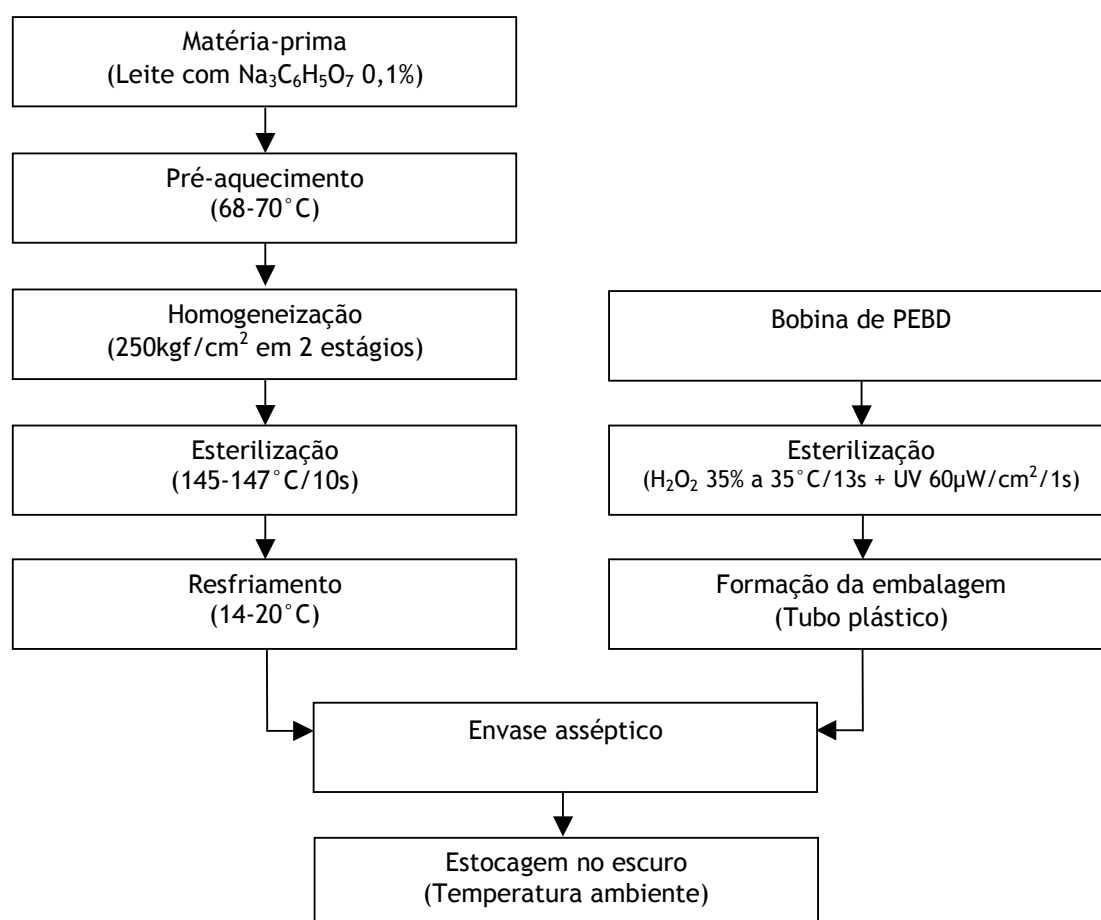


Figura 2: Fluxograma de produção e estocagem do leite UHT nas embalagens de PEBD.

O binômio tempo e temperatura utilizado no processo (145-147°/ 10 segundos) é mais drástico que o estipulado pela Portaria 146 do MAPA (BRASIL, 1996) através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT

que define uso de 130 a 150°C por de 2 a 4s. O tratamento com $F_{145^{\circ}\text{C}}$ de 10 s foi projetado para atingir nove reduções decimais de esporos de *Bacillus cereus* ou uma probabilidade de unidades não estéreis de 1:1.000 (WALTER, 2010).

2.2.2. Higienização da linha de processamento

Antes de cada processamento, a limpeza em circuito fechado da linha (*Cleaning in place* - CIP) foi realizada de acordo com as seguintes etapas: pré-enxágue à temperatura ambiente até que a água ficasse límpida; lavagem com solução detergente alcalino (marca Avoid BR 55, Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ), à base de hidróxido de sódio, agentes quelantes e tensoativos não-iônicos, na concentração de 2% (p/v) a 95°C por 40 min; enxágue intermediário a 55°C por 10 min; lavagem com solução detergente ácida (marca Acid 2100, Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ), à base de ácido fosfórico e tensoativos não-iônicos, na concentração de 2% (p/v) a 55°C por 40 min, na mesma sequência do ciclo alcalino, e enxágue final por 20 min a 55°C. A concentração das soluções detergentes foi monitorada por titulometria e medida de condutividade, conforme recomendações dos fabricantes.

A esterilização em circuito fechado (*Sterilization in place* - SIP) foi efetuada pela recirculação da solução Vortexx ES (Ecolab Química Ltda., Rio de Janeiro - RJ) contendo ácido peracético, ácido peroctanóico, peróxido de hidrogênio, ácido acético e tensoativos aniônicos, ou Pluron 461 A/1 (Mustang Pluron Química Ltda., Catanduva - SP), contendo ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e estabilizante. Em ambas, utilizou-se concentração de 0,3% (v/v) de ácido peracético a 30 °C por 30 min, com fluxo turbulento a 0,2 m/s e Re de 4.901. No tanque de produto a esterilização foi realizada pela recirculação da solução com auxílio da bomba da máquina de embalagem. O enxágue da solução esterilizante foi conduzido pela recirculação de água à temperatura ambiente pela seção de retorno do trocador de calor por 5 min, seguido pela recirculação pela linha de envase quando a temperatura da água no final do tubo de retenção era maior que 140°C, por um período de 15 min. A

concentração da solução de ácido peracético foi monitorada por reflectometria (RQflex plus, Merck KGaA, Darmstadt - Alemanha).

A máquina de embalagem foi lavada com detergente alcalino em pó 2% (p/v) marca Det Limp S32 (Farquil Comércio e Indústria Ltda., Piracicaba - SP), e escovação manual, seguida de enxágue. A sanitização foi realizada pela aspersão de solução de hipoclorito de sódio marca Super Cândida (Indústria Anhembí S.A., Osasco - SP) 200 mg/L de cloro ativo, com picetas manuais em intervalos sucessivos de 15 min por um período total de 60 min. Essa sanitização foi efetuada em dois momentos antes do envase: com 1 dia de antecedência; e 1 h antes do início da filtração do ar da máquina. A concentração da solução clorada foi monitorada por reflectometria (RQflex plus, Merck KGaA, Darmstadt - Alemanha).

2.3. Material de embalagem

As embalagens foram produzidas com filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) pigmentados de branco com dióxido de titânio 1,5% (Plastunion Indústria de Plásticos Ltda., Caieiras - SP). O filme de PEBD foi fornecido na forma de bobina de 15 kg, apresentando largura de 300 mm e espessura de 58 ± 4 µm. Esse material é o tradicionalmente utilizado como embalagem para o acondicionamento de leite pasteurizado.

As embalagens foram produzidas de modo a simular a superfície interna de uma bolsa flexível com termossoldagem tipo almofada, onde uma das bordas do material ficava voltada para o interior da embalagem, em contato com o produto.

2.4. Estocagem do leite UHT

O leite UHT nas embalagens PEBD foi estocado à temperatura ambiente na ausência de luz, dentro de caixas de papelão.

2.5. Amostragem e Análises

Amostras do leite cru, antes de serem submetidas ao armazenamento refrigerado, foram encaminhadas à Clínica do Leite (ESALQ -USP, Piracicaba - SP) para realização da contagem de células somáticas pelo método de citometria de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments Inc., Chaska - EUA). As demais análises foram realizadas no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

No leite cru foram determinados: a presença de antibióticos inibidores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (SP-NT/SP MINI-NT, DSM food Specialities, Delft - Nova Zelândia); acidez titulável (AOAC 947.05, 1995); pH pelo método potenciométrico (pHmetro Digimed modelo DM-22, Digicrom Analítica Ltda.); Extrato Seco Total (EST) (AOAC, 1995).

As análises microbiológicas realizadas no leite cru foram: contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios (SWANSON et al., 2001); contagem total de microrganismos psicrótróficos aeróbios (SWANSON et al., 2001); contagem total de *Pseudomonas* spp através de plaqueamento em superfície utilizando ágar isolamento de *Pseudomonas* (Oxoid) e incubação a 30°C/24 horas (JASPE et al., 1995; HAYES & NIELSEN, 2000); esporos de mesófilos aeróbios (FRANK et al., 1992); e esporos de termófilos aeróbios (DENNY & PARKINSON, 2001).

No leite cru e no leite UHT foi determinado teor de gordura pelo método de Gerber (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 1989). No leite UHT, com 1 dia de estocagem, foi verificada estabilidade ao etanol 68% (v/v) (BRASIL, 2006), e determinados: acidez titulável (AOAC 947.05, 1995); pH pelo método potenciométrico (pHmetro Digimed modelo DM-22, Digicrom Analítica Ltda.); Extrato Seco Total (EST) (AOAC, 1995).

No leite cru e no leite UHT, semanalmente, aos dias de estocagem de 1, 7, 14,... e assim por diante até o fim da vida de prateleira, foram realizadas análises de: nitrogênio total (NT) e nitrogênio não-protéico (NNP) pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995); nitrogênio não-caseico (NNC) pela metodologia

desenvolvida por Rowland (1938), seguida de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995); a caseína expressa como porcentagem de proteína foi calculada dividindo o conteúdo de caseína $[(NT - NNC) \times 6,38]$ pelo conteúdo de proteína $[(NT - NNP) \times 6,38]$ e o resultado multiplicado por 100; a lipólise foi estimada determinando o conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) expressos em $\mu\text{equiv mL}^{-1}$ (DEETH *et al.*, 1975); a viscosidade aparente foi determinada à 25°C em viscosímetro (Brookfield modelo DV II, Stoughton, USA) a 100 r.p.m. equipado com adaptador UL para *spindle* cilíndrico nº00. As medidas foram feitas em duplicatas após 30s e os resultados foram expressos em MPa.

O perfil eletroforético em gel Urea poliacrilamida (Urea-PAGE) foi realizado de acordo com Andrews (1983) e a migração foi efetuada em uma unidade vertical Mini Protean III xi (Bio-Rad) sob tensão elétrica de 120V. As revelações das bandas foram feitas por imersão do gel em Brilliant Blue Coloidal G, seguindo metodologia descrita por Blakesley & Boezi (1977).

Pelo menos 5 amostras do leite UHT de cada tratamento foram incubadas a 35 °C por 14 dias e submetidas à análise microbiológica de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis, com exceção de *Bacillus sporothermodurans*. Essa contagem foi determinada pelo plaqueamento em profundidade de 1 mL da amostra e das diluições sucessivas em ágar nutriente isento de extrato de levedura e ágar infusão cérebro-coração com incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 h. Quando *B. sporothermodurans* estão presentes nas amostras ocorre um abundante crescimento de colônias lisas, de forma regular, com coloração entre branco e bege, com diâmetro máximo de 3 mm em ágar infusão cérebro-coração. As colônias presuntivas de *B. sporothermodurans* no ágar infusão cérebro-coração são identificadas por meio de testes morfológicos e bioquímicos. No ágar nutriente isento de extrato de levedura, *B. sporothermodurans* comumente não formam colônias visíveis, porém poderão desenvolver colônias puntiformes, de coloração entre branco e bege. Essa diferenciação é necessária porque as colônias de *B. sporothermodurans* não

devem ser contabilizadas no cálculo de mesófilos aeróbios viáveis capazes de causar alteração no produto (BRASIL, 2003).

2.6. Análise sensorial

As quatro diferentes amostras de leite UHT foram avaliadas nos mesmos dias, por uma equipe de 50 provadores não treinados, através de teste de aceitação. Foi utilizada escala hedônica estruturada mista de 9 pontos. Os atributos avaliados sequencialmente foram aparência, aroma, sabor e impressão global. Também foi realizado teste de intenção de compra com escala hedônica de 5 pontos. A ficha de avaliação utilizada pelos provadores é apresentada na Figura 3. As sessões foram conduzidas em cabines individuais com ar condicionado a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminadas com lâmpadas fluorescentes “branca fria”. As amostras foram apresentadas monadicamente à temperatura ambiente em copos plástico de 50 mL codificados com 3 dígitos. Os provadores foram orientados a consumir biscoitos tipo água e sal e água mineral entre as degustações, de modo a prevenir o efeito da fadiga sensorial. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, parecer número 153/2009 (Anexo I).

Os resultados foram analisados através de análise de variância para verificar diferenças significativas entre as amostras e entre o tempo. O teste de Tukey foi usado para comparar e verificar diferença entre médias ($p < 0,05$).

Nome: _____ Data: _____ E-mail: _____

Você está recebendo amostras de **leite integral UHT**. Por favor, avalie, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra em relação:

9 - gostei muitíssimo
 8 - gostei muito
 7 - gostei moderadamente
 6 - gostei ligeiramente
 5 - nem gostei / nem desgostei
 4 - desgostei ligeiramente
 3 - desgostei moderadamente
 2 - desgostei muito
 1 - desgostei muitíssimo

	Notas			
AMOSTRA	APARÊNCIA	AROMA	SABOR	IMPRESSÃO GLOBAL

Se estes leites estivessem **À VENDA**, você:

	Amostra	Nota
5 - certamente compraria	_____	_____
4 - provavelmente compraria	_____	_____
3 - talvez compraria / talvez não compraria	_____	_____
2 - provavelmente não compraria	_____	_____
1 - certamente não compraria	_____	_____

Comentários: _____

Figura 3: Ficha de aceitação apresentada aos provadores.

2.7. Determinação do fim da vida de prateleira do leite UHT

Os testes de aceitação sensorial ocorreram semanalmente até a determinação da vida de prateleira do leite UHT. Conforme proposto pela *American Society for Testing and Materials* (1993), foi adotado o seguinte critério no teste sensorial: quando as médias das notas foram inferior a 6,

(correspondente a “gostei ligeiramente” na escala hedônica) para qualquer um dos atributos; e/ou, quando médias da intenção de compra média foram inferior a 3 (“talvez compraria / talvez não compraria”) considerou-se o fim da vida de prateleira das amostras em questão. E, visualmente, considerou-se o fim da vida de prateleira se aumentada a viscosidade do leite que levasse à gelificação.

2.8. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

O delineamento experimental utilizado foi do tipo aleatorizado em blocos. O fator estudado foi a temperatura e o tempo de armazenamento do leite cru (T), com quatro níveis de variação [controle (processamento no dia da ordenha) e armazenado por 3 dias a 3, 7 e 10,3°C antes do processamento]. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados das análises dos leites crus foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre as médias ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Assistat, versão 7.5 beta (SILVA, 2009). Para a avaliação do NNP, da caseína/proteína, da lipólise e da viscosidade foi adotado o delineamento do tipo *splitplot*, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo (t) de estocagem do leite UHT aos dias 1, 7, 14,... e assim por diante. O teste F-ANOVA foi usado para testar as diferenças entre tratamentos, entre tempos de estocagem do leite UHT e a interação tratamento *versus* tempo, utilizando o procedimento PROC GLM, do programa SAS®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Leite cru

O leite cru apresentou contagens de células somáticas que variaram de $3,80 \times 10^4$ a $9,83 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ com média de $5,06 (\pm 2,92) \times 10^5 \text{ céls mL}^{-1}$. Apesar de esta média estar em acordo com o padrão de qualidade para o leite cru refrigerado tipo A (BRASIL, 2002), que tem como limite máximo $6 \times 10^5 \text{ céls mL}^{-1}$,

3 das amostras analisadas encontraram-se acima deste limite. A média aqui encontrada mostrou-se próximas das encontradas por Alves (2006) em 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores da região de Belo Horizonte, por Machado *et al.* (1999) e por Fonseca (2005) ao analisarem amostras de leite de tanques de expansão em diversas regiões de Minas Gerais. Resultados semelhantes foram encontrados por Lorenzetti (2006) em amostras de leite cru captado nas regiões metropolitana de Curitiba e do Alto Vale de Santa Catarina, respectivamente, e por Bueno *et al.* (2004) e Silva (2004) no estado de Goiás. Dentro do Mercado Comum Europeu, a União Européia estabeleceu em 1992, limite de $4,0 \times 10^5$ céls mL⁻¹. Países como a Suécia têm caminhado para a exigência que todos os rebanhos apresentem CCS inferior a $2,5 \times 10^5$ céls mL⁻¹. O Canadá possui limite exigido de $5,0 \times 10^5$ céls mL⁻¹. O atual limite estabelecido pela *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos é de $7,5 \times 10^5$ céls mL⁻¹, embora haja discussão sobre a possibilidade de redução destes limites para $4,0 \times 10^5$ céls mL⁻¹. No Brasil, só a partir de 2002, é que se estabeleceu o limite de CCS de 1×10^6 céls mL⁻¹ para o leite cru refrigerado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste até a data de 01/07/2008, e diminuindo-se esse limite para $7,5 \times 10^5$ céls mL⁻¹ até 01/07/2011 (BRASIL, 2002).

Não foi detectada a presença de antibióticos em nenhuma das amostras de leite cru.

Os resultados da caracterização das amostras de leite cru são mostrados na Tabela 1. O armazenamento por 3 dias sob as temperaturas de refrigeração não alteraram significativamente ($p>0,05$) os valores de pH, acidez, EST, proteína total, NNP, caseína e viscosidade. Esses valores encontram-se dentro da normalidade, com exceção do EST que se mostrou um pouco abaixo na amostra A, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado (BRASIL, 2002). Houve aumento significativo somente nos AGL, demonstrando que ocorreu lipólise no leite cru após o armazenamento refrigerado por 3 dias.

Tabela 1. Caracterização do leite cru (n=4), controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Componente	Tratamentos			
	A	B	C	D
Gordura (%)	3,76 ± 0,26			
pH	6,76 ^a ± 0,03	6,78 ^a ± 0,06	6,84 ^a ± 0,12	6,79 ^a ± 0,08
Acidez (°D)	15,42 ^a ± 1,36	15,32 ^a ± 1,15	15,03 ^a ± 0,60	15,53 ^a ± 0,12
EST (%)	11,59 ^a ± 0,60	12,11 ^a ± 0,21	12,07 ^a ± 0,58	12,16 ^a ± 0,31
Proteína total (%)	3,07 ^a ± 0,39	3,10 ^a ± 0,32	3,09 ^a ± 0,20	3,13 ^a ± 0,41
NNP ¹ (%)	0,03 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a	0,02 ^a
Caseína (%)	2,36 ^a ± 0,40	2,37 ^a ± 0,34	2,35 ^a ± 0,23	2,41 ^a ± 0,46
AGL ² (µequiv/mL)	1,50 ^a ± 0,33	1,92 ^{ab} ± 0,20	2,33 ^b ± 0,08	2,35 ^b ± 0,58
Viscosidade (MPa ± 0,06)	1,82 ^a ± 0,22	1,68 ^a ± 0,34	1,61 ^a ± 0,38	1,64 ^a ± 0,38

¹ nitrogênio não-protéico; ² ácidos graxos livres.

a,b - médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

O crescimento microbiano (Tabela 2) constatado através das contagens médias de bactérias mesofílicas nas amostras de leite cru após 3 dias de refrigeração foi de 0,23 log a 3°C, de 0,57 log a 7,3°C, e de 1,39 log a 10,3°C.

Jaspe *et al.* (1995) reportaram crescimento de 0,99 log na contagem de bactérias viáveis quando o leite cru foi submetido ao armazenamento por 3 dias a 7°C. De acordo com Law (1979), amostras de leite cru com populações iniciais de 10⁴ UFC mL⁻¹ podem aumentar em mais de 2 ciclos log ,quando armazenada a 7°C por dois dias, ou a 5°C por três dias.

A contagem média encontrada de mesófilos aeróbios no leite cru, submetido ao armazenamento por 3 dias a 10,3°C foi de 3,09 x 10⁵ UFC mL⁻¹ (Tabela 2), e dentre os 3 ensaios, o maior valor encontrado foi de 6,9 x 10⁵ UFC mL⁻¹. Estes valores mostram-se inferiores ao requisito microbiológico para o leite cru refrigerado proposto pelo Ministério da Agricultura na Instrução Normativa (IN) 51, que é de 7,5 x 10⁵ UFC mL⁻¹, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a partir de 01/07/2008 (BRASIL, 2002). As contagens encontram-se abaixo dos valores constatados por Silva (2003), em amostras de leite cru coletadas em silos

industriais de laticínios localizados nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, destinadas ao processamento de leite UHT. Este autor constatou contagem média de microrganismos mesófilos de $1,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, $4,9 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Pinto *et al.* (2006) encontraram em amostras de leite cru de tanques individuais e coletivos na região da Zona da Mata de Minas Gerais, também destinadas ao processamento de leite UHT, contagem de até $3,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

O resultado (Tabela 2) demonstra que mesmo após 3 dias de armazenamento sob uma temperatura de abuso, de 10,3°C, o leite cru apresentou contagem de mesófilos aceitável, mesmo porque a matéria-prima era de boa qualidade, leite cru tipo A.

Tabela 2. Contagens médias de microrganismos (UFC mL⁻¹) no leite cru (n=4). Controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Microrganismos (UFC mL ⁻¹)	Tratamentos*			
	A	B	C	D
Mesófilos aeróbios	$1,26 \times 10^4$ a	$2,14 \times 10^4$ ab	$4,68 \times 10^4$ ab	$3,09 \times 10^5$ b
Psicrotróficos aeróbios	$1,07 \times 10^3$ a	$1,10 \times 10^5$ ab	$5,01 \times 10^5$ b	$1,35 \times 10^6$ b
<i>Pseudomonas</i> spp.	$4,68 \times 10^2$ a	$6,02 \times 10^4$ ab	$1,26 \times 10^5$ b	$1,78 \times 10^5$ b

* a,b - médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

O desenvolvimento de psicrotróficos aeróbios foi maior que o de mesófilos, devido ao armazenamento refrigerado, com aumento significativo ($p<0,05$) após os três dias de refrigeração (Tabela 2). Houve crescimento após 72h de refrigeração em ciclos log de 2,01 a 3°C, de 2,40 a 7,3°C, e de 3,10 a 10,3°C.

Pesquisadores ao armazenar o leite cru por 3 dias observaram aumento na população de psicrotróficos de 1,40 log a 4°C (RAVANIS & LEWIS, 1995) e de 1,92 log quando armazenado a 7°C (JASPE *et al.*, 1995). Guinot-Thomas *et al.* (1995a) ao armazenarem por 2 dias a 4°C descreveram aumento de 0,35 log₁₀

quando a contagem inicial era de 4×10^3 UFC mL⁻¹ e de 2,26 log, quando a contagem inicial era de $2,8 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Eles mostraram que essa refrigeração, quando aplicada ao leite cru de baixa contagem de psicotróficos, não resulta em aumento populacional expressivo e indicaram a importância da qualidade microbiológica do leite cru para sua preservação. Guinot-Thomas *et al.* (1995b) reportaram aumento de psicotróficos no leite cru a 4°C por 6 dias de 2×10^4 UFC mL⁻¹ para $10^6 - 10^7$ UFC mL⁻¹.

As amostras de leite cru submetidas ao armazenamento refrigerado por 72h (Tabela 2) apresentaram aumento nas contagens de psicotróficos em relação às contagens de mesófilos de 14,09%, 18,07% e 10,44%. Portanto estas não atenderiam ao padrão estabelecido pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1980), que determina o controle da contaminação da microbiota psicotrófica, de tal forma que sua contagem não exceda a 10% do número total de mesófilos aeróbios.

O desenvolvimento de psicotróficos ao longo dos 3 dias de armazenamento pode ter influenciado o aumento de AGL (Tabela 1) devido à ação das lipases microbianas, juntamente com a lipase endógena do leite. De acordo com Sørhaug & Stepaniak (1997), contagens de psicotróficos a partir de 1×10^5 a 5×10^5 UFC mL⁻¹ são suficientes para a promoção de alterações significativas em derivados de leite. Uma população de 10^4 UFC mL⁻¹ de psicotróficos já foi suficiente para a produção de proteases no leite (RENNER, 1988).

O aumento populacional de *Pseudomonas* spp. com o tempo de refrigeração também se mostrou significativo (Tabela 2). A partir da amostra controle, constatou-se crescimento após 72h de refrigeração de 2,11 log a 3°C, de 2,43 log a 7,3°C, e de 2,58 log a 10,3°C, comportamento semelhante ao apresentado pelos psicotróficos.

Reinheimer *et al.* (1990), em estudos na Europa e Estados Unidos, observaram que das 321 espécies de psicotróficos, 51,1% eram *Pseudomonas*. E

Jaspe *et al.* (1995) reportaram de 98,48% de *Pseudomonas* na amostra sem armazenamento e de 84,76% na amostra submetida a 7°C por 3 dias.

Tabela 3. Contagens de esporos (máximo e mínimo) do leite cru (n=4). Controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

	Tratamentos							
	A		B		C		D	
	mín	máx	mín	máx	mín	máx	mín	máx
Esporos de mesófilos (UFC mL ⁻¹)	9	16	6	35	< 1	10	15	20
Esporos de termófilos (UFC mL ⁻¹)	< 1	10	< 1	5	< 1	6	< 1	11

As contagens de esporos apresentaram-se baixas e em conformidade com as especificações de processo térmico, já que o tratamento com F_{145°C} de 10 s foi projetado para atingir nove reduções decimais de esporos de *Bacillus cereus* ou uma probabilidade de unidades não estéreis de 1:1.000, considerando-se produção de leite UHT em embalagens de 1.000 mL a partir de matéria-prima com contagem de esporos de 10³ UFC mL⁻¹ e resistência térmica com valor z de 22,1 °C e D_{145°C} de 1,1 s (PACHECO-SANCHEZ, 2005). O tratamento térmico convencional com F_{140°C} de 5 s, para nove reduções decimais de esporos de mesófilos e termófilos, foi desenhado conforme o valor z de 10,4 e 10,3°C e D_{140°C} de 0,16 e 0,36 s, respectivamente (KESLLER, 1981).

3.2. Leite UHT

Nas amostras submetidas à contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis e de *B. sporothermodurans* não foram detectadas colônias microbianas.

O leite UHT mostrou-se estável ao etanol 68%. A caracterização do produto com 1 dia de estocagem é mostrada na Tabela 4, e o leite apresentou conformidade em todos os parâmetros preconizados no Regulamento Técnico (BRASIL, 1996).

Tabela 4. Caracterização do leite UHT (n=4) com 1 dia de estocagem, produzido com leite cru controle (A) e armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Componente	Tratamentos			
	A	B	C	D
Gordura (%)	3,68 ^a ± 0,25	3,65 ^a ± 0,21	3,70 ^a ± 0,28	3,60 ^a ± 0,28
pH	6,90 ^a ± 0,03	6,82 ^a ± 0,08	6,83 ^a ± 0,15	6,92 ^a ± 0,05
Acidez (°D)	15,05 ^a ± 1,71	15,12 ^a ± 0,99	15,49 ^a ± 0,78	16,28 ^a ± 0,60
EST (%)	12,25 ^a ± 0,36	12,21 ^a ± 0,06	11,96 ^a ± 0,38	12,29 ^a ± 0,06
Proteína total (%)	3,11 ^a ± 0,04	2,91 ^a ± 0,12	2,88 ^a ± 0,15	3,05 ^a ± 0,25
NNP ¹ (%)	0,02 ^a	0,03 ^a	0,02 ^a	0,03 ^a
Caseína (%)	2,88 ^a ± 0,06	2,57 ^a ± 0,16	2,64 ^a ± 0,25	2,82 ^a ± 0,13
AGL ² (µequiv/mL)	1,67 ^a ± 0,58	2,30 ^{ab} ± 0,23	2,78 ^b ± 0,51	2,56 ^{ab} ± 0,20
Viscosidade (MPa ± 0,06)	2,44 ^a ± 0,47	2,29 ^a ± 0,63	2,00 ^a ± 0,23	2,00 ^a ± 0,20

¹ nitrogênio não-protéico; ² ácidos graxos livres.

a,b - médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

A única diferença significativa ($p<0,05$) encontrada no primeiro dia de estocagem do leite UHT foi no teor de AGL do leite controle (A) e do leite proveniente de leite cru estocado a 10,3°C (D), mostrando a ocorrência de lipólise no leite D.

Após o processamento UHT, em comparação com os resultados do leite cru, ocorreu um aumento médio de AGL nas amostras de 0,17 µeq mL⁻¹ em A, de 0,38 µeq mL⁻¹ em B, de 0,45 µeq mL⁻¹ em C e de 0,21 µeq mL⁻¹ em D. O aumento encontrado nas amostras são inferiores aos encontrados por Panfil-Kuncewicz *et al.* (2005), que processaram leite fresco por métodos UHT direto e indireto e verificaram aumento de 0,688 µeq mL⁻¹ e 0,540 µeq mL⁻¹, respectivamente. É pressuposto que o alto conteúdo de AGL no leite UHT fresco é o resultado da lipólise induzida causada por fatores físicos no leite durante o bombeamento e homogeneização (STANIEWSKI, 1998), assim como o aquecimento favorece mudanças hidrolíticas na gordura através das lipases termoestáveis remanescentes (PANFIL-KUNCEWICZ *et al.*, 2005).

Os valores de NNP não foram afetados pelos tratamentos do leite cru ($p=0,1777$) (Tabela 5). Entretanto, a análise da Figura 4 mostra uma tendência de aumento maior de NNP com o tempo de estocagem no leite D, C e B, nesta ordem, em relação à amostra controle, A.

Houve diferença significativa ($p<0,0001$) de NNP ao longo de 56 dias de estocagem dos leites UHT, observando-se elevação de NNP com o tempo de estocagem. Essas elevações nas taxas de NNP sugerem proteólise ao longo da estocagem como reportado por Mottar *et al.* (1979), Mitchell & Ewings (1985), Renner (1988), Celestino *et al.* (1997), Rattray *et al.* (1997) e Gaucher *et al.* (2008).

Os resultados da Caseína/Proteína (CN/P) (Tabela 5) também refletem uma evolução proteolítica com a diminuição das porcentagens com o tempo de estocagem dos leites UHT ($p=0,0078$), mas os tratamentos não diferiram entre si ($p=0,3563$). Apesar de não ser estatisticamente significativa, a mesma tendência de maiores taxas de proteólise para leites com maiores contagens de psicrotóxicos e *Pseudomonas*, pode ser observada na Figura 5, que mostra maior queda de CN/P em D e C, nesta ordem, em relação a A e B.

Tabela 5. Quadrados médios e probabilidades para evolução do nitrogênio não-protéico (NNP) (%) e da Caseína/Proteína (CN/P) (%) dos leites UHT, durante a estocagem (n=4).

	NNP (%)			CN/P (%)		
	GL	QM	p	GL	QM	P
Tratamento (T)	3	0,0001	0,1777	3	0,0017	0,3563
Erro (a)	6	0,00007	-	6	0,0013	-
Tempo (t)	8	0,00011	< 0,0001	8	0,0009	0,0078
Interação (T * t)	24	0,00002	0,3084	24	0,0003	0,5244
Erro (b)	63	0,00001	-	64	0,0003	-
R ²	-	0,6976	-	-	0,5772	-

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p = probabilidade

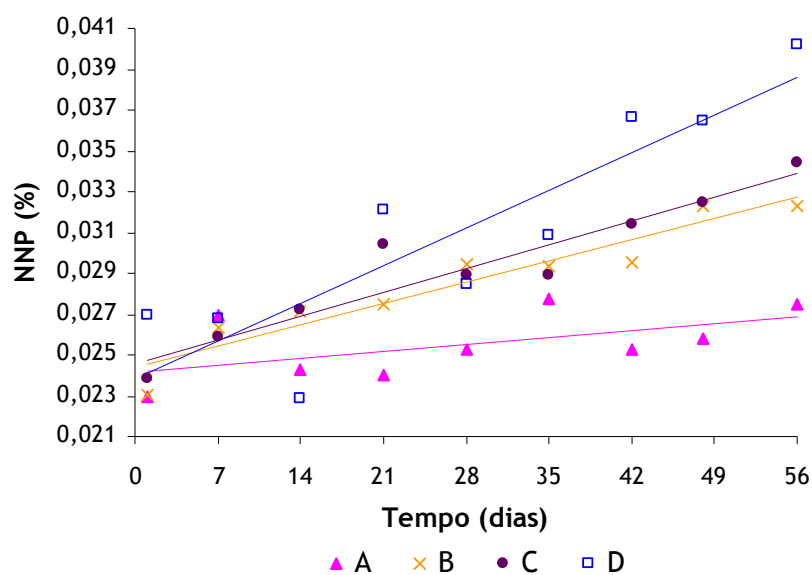


Figura 4. Evolução do (1) NNP (%) do leite UHT durante a estocagem. Leites crus com contagens de psicotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ (▲); B - $1,10 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ (□).

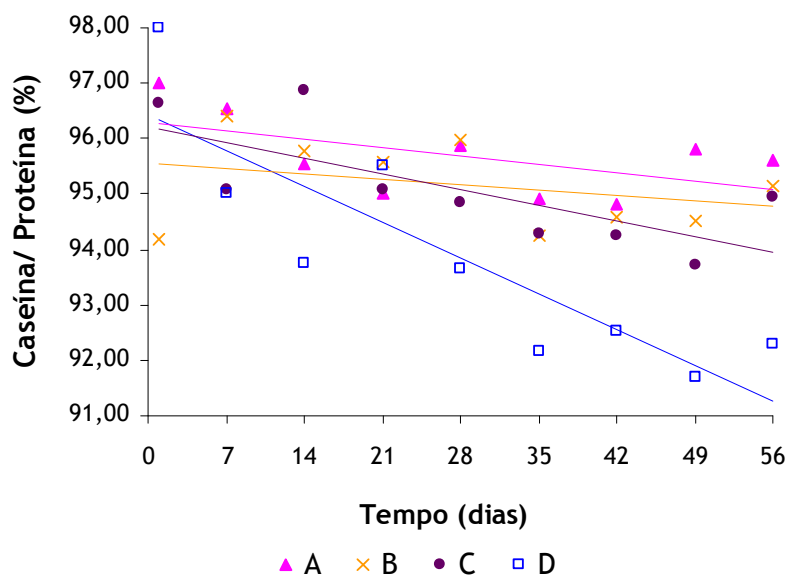


Figura 5. Evolução da Caseína/ Proteína (%) do leite UHT durante a estocagem. Leites crus com contagens de psicotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ (▲); B - $1,10 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ (□).

Analizando os valores de CN/P (%) ao longo dos 56 dias de estocagem dos leites UHT, constatou-se que em C houve decréscimo de 1,67%, e em D um decréscimo de 5,70%. Muitos autores utilizam como parâmetro de fim da vida de prateleira, um decréscimo de CN/P (%) maior que 4,76%. Este limite foi estabelecido por Santos *et al.* (2003) em pesquisa na qual a detecção de defeito de sabor devido à proteólise foi encontrada por 50% dos julgadores de um painel treinado.

Na Figura 6, observa-se maior degradação da β -caseína na amostra D em comparação com a A, tanto no leite cru, quanto ao longo da estocagem do leite UHT, sugerindo ação da plasmina. A plasmina, uma protease alcalina que é a principal enzima do leite, pode promover proteólise durante estocagem de leite UHT (GRUFFERTY & FOX, 1988). Sua principal atividade é sobre a β -caseína, resultando na produção de γ -caseína e proteose-peptonas (BASTIAN *et al.*, 1991).

Snoeren *et al.* (1979) mostraram degradação da β e α_s -caseína sem considerar a atividade das proteinases bacterianas, como se a quebra destas proteínas tivesse ocorrido primeiramente pela plasmina. Autores confirmaram, através de Urea-PAGE, a maior preferência de quebra da β -caseína em relação às α_s -caseínas em leite inoculado com espécies de *Pseudomonas* sp. (KIURU *et al.*, 1971; DE BEUKELAR *et al.*, 1977). Estas observações sugerem que algumas das proteinases bacterianas altamente estáveis ao calor atacam a β -caseína. Entretanto, Adams *et al.* (1976) investigaram a atividade proteolítica de *Pseudomonas* isoladas de 9 leites cru e mostraram que a maioria degradava a κ -caseína, mesmo antes da população atingir 10^4 UFC mL⁻¹, e que a degradação da β -caseína somente fora mais detectável em maiores populações (10^6 - 10^7 UFC mL⁻¹).

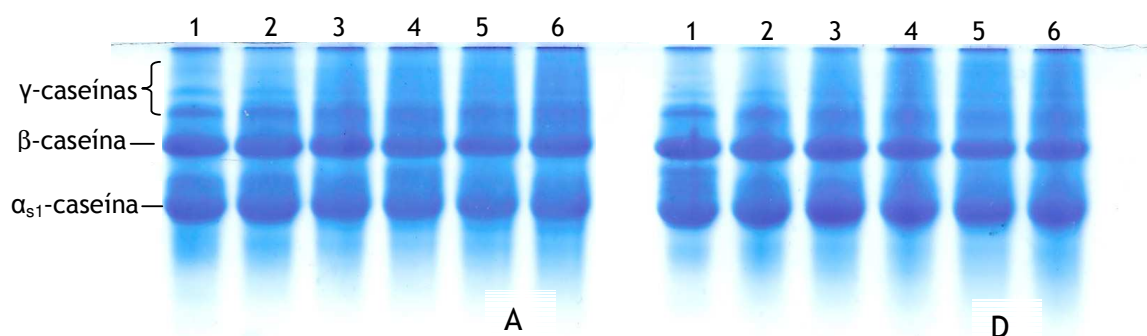


Figura 6. Eletroforese Urea-PAGE dos tratamentos A e D. 1- leite cru; 2, 3, 4, 5, 6 - leite UHT com 1, 21, 35, 48 e 56 dias de estocagem, respectivamente.

Não foi observada gelificação, sedimentação e nem houve aumento da viscosidade (resultados não mostrados, Anexo II) nos leites UHT, indicando que as populações de psicotróficos de $1,35 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e *Pseudomonas* de $1,78 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, aqui reportadas, não contribuíram para tais efeitos no leite UHT estocado por 56 dias. Sørhaug and Stepaniak (1997) reportaram que uma população de psicotróficos de 6,9-7,2 log UFC mL⁻¹, no leite cru causou gelificação e desenvolvimento de sabor amargo em leite UHT. Law *et al.* (1977) inocularam leite com *Pseudomonas fluorescens* AR11, com crescimento mantido até contagens de 5×10^7 e 8×10^6 UFC mL⁻¹, antes do tratamento UHT, e a gelificação ocorreu em 10 a 14 dias e em 8 a 10 semanas, respectivamente, a 20°C.

Um fator que pode acelerar a gelificação no leite UHT é o tipo tratamento térmico do processamento UHT. Em estudo de McKellar *et al.* (1984), gelificação não foi observada no leite UHT produzido por aquecimento indireto, na qual a viscosidade manteve-se constante até a 30ª semana de estocagem, enquanto que a gelificação foi constatada entre a 6ª e a 10ª semana em leite UHT obtido pelo sistema direto. As proteases no leite UHT do método indireto podem ser mais efetivamente inativadas (SNOEREN *et al.*, 1979; CORRADINI &

PECCHINI, 1981) devido aos maiores períodos de retenção envolvidos no aquecimento pelo método indireto (NANGPAL & REUTER, 1990).

A hidrólise lipolítica ou lipólise resulta na liberação de ácidos graxos de cadeias curtas e médias, responsáveis pelo desenvolvimento de sabor de ranço no leite UHT estocado à temperatura ambiente (SINGH & PATIL, 1989; DEETH, 2006). A relação entre o sabor do leite e conteúdo de AGL foi estudados por vários pesquisadores (RENNER, 1985; DEETH & FITZ-GERALD, 1995).

A temperatura de estocagem do leite cru afetou significativamente o teor de AGL do leite UHT ($p=0,0266$) (Tabela 6). Como já discutido anteriormente, houve aumento significativo do teor de AGL do leite UHT produzido a partir de leite cru armazenado a $10,3^{\circ}\text{C}$ e que apresentou maior população de psicrótrófos.

A Tabela 6 mostra que o tempo de estocagem do leite UHT também influenciou significativamente a lipólise ($p<0,0001$). Houve um aumento significativo da lipólise com o aumento do tempo de estocagem dos leites UHT, o que pode também ser observado na Figura 7. Leites UHT processados a partir de leite cru armazenado a $7,3^{\circ}\text{C}$ (C) e $10,3^{\circ}\text{C}$ (D) apresentaram maiores taxas de lipólise com o tempo do que os produzidos a partir do leite controle(A) e do leite cru armazenado a 3°C (B).

Tabela 6. Quadrados médios e probabilidades para evolução dos ácidos graxos livres dos leites UHT, durante a estocagem (n=4).

	GL	Ácidos Graxos Livres ($\mu\text{eq mL}^{-1}$)	
		QM	P
Tratamento (T)	3	4,8004	0,0266
Erro (a)	6	0,7475	-
Tempo (t)	8	2,3504	< 0,0001
Interação (T * t)	24	0,0627	0,9729
Erro (b)	60	0,1287	-
R ²	-	0,8648	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p = probabilidade

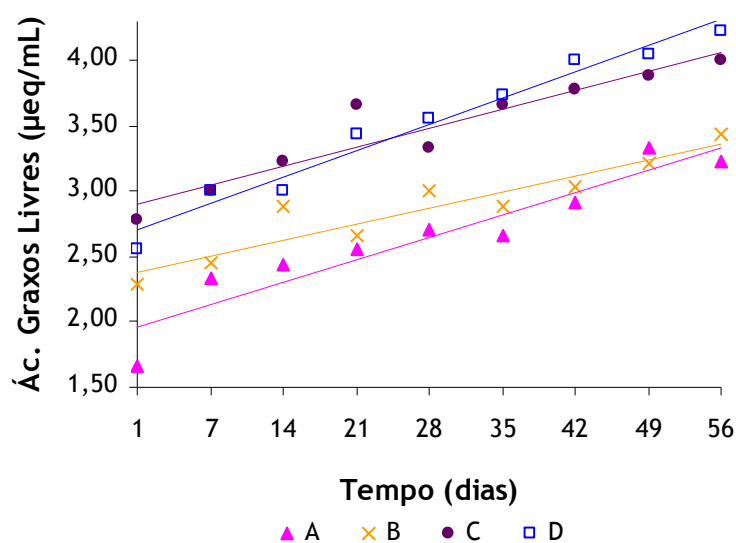


Figura 7. Evolução da lipólise em ácidos graxos livres (AGL) do leite UHT durante a estocagem. Leites crus com contagens de psicrotróficos aeróbios de: A - $1,07 \times 10^3$ UFC mL^{-1} (▲); B - $1,10 \times 10^5$ UFC mL^{-1} (x); C - $5,01 \times 10^5$ UFC mL^{-1} (●); D - $1,35 \times 10^6$ UFC mL^{-1} (□).

No leite UHT da amostra controle A, foi observado (Figura 7) que após 8 semanas sob temperatura ambiente, não controlada, o valor de AGL foi de 1,67 para 3,22 $\mu\text{eq mL}^{-1}$; portanto, um aumento de 1,55 $\mu\text{eq mL}^{-1}$ de AGL. Resultados do estudo de Collin & Bester (1993) e Singh *et al.* (2004) provaram que o aumento do AGL no leite UHT é dependente da temperatura de estocagem, sendo maior em temperaturas mais altas. Singh *et al.* (2004) reportaram que após 8 semanas de estocagem do leite UHT a 25°C e a 35°C houve crescimento de 0,63 e 0,93 $\mu\text{eq mL}^{-1}$ de AGL, respectivamente.

Renner (1998) também mostrou um crescimento linear no conteúdo de AGL em leite UHT.

Bactérias psicrotróficas produtores de lipase são importantes para a qualidade sensorial do leite integral, pois essas enzimas permanecem ativas em baixas e intermediárias temperaturas (ALFORD & PIERCE, 1961). Collin & Bester (1993) confirmaram a relação entre o aumento de AGL e a quantidade de bactérias psicrotróficas no leite cru, mas sem uma dependência linear. Dados publicados por Kroll (1989) mostram a alta estabilidade das lipases excretadas pelas *Pseudomonas* spp. que apresentam valor $D_{150^{\circ}\text{C}}$ de 21-25s. Já a publicação de Driessen & Stadhouders (1974), mostram lipase de *P.fluorencens* 22F com valor $D_{150^{\circ}\text{C}}$ de 4,5 min.

3.3. Avaliação Sensorial e Intenção de Compra

Como as quatro amostras foram avaliadas sensorialmente juntas, nos mesmos dias, os dias de estocagem da amostra A (controle), que foi processada 3 dias antes, diferiram das amostras B, C e D (Tabelas 7 e 8). Os resultados das médias dos atributos de aparência e aroma (não mostrados) não resultaram em diferença significativa ($p>0,05$) entre as amostras e nem entre os dias nos quais foram avaliados.

As médias dos resultados sensoriais para os atributos de sabor e impressão global são apresentadas na Tabela 7. Em todos os dias em que as

análises foram realizadas, as médias dos tratamentos para o atributo sabor não diferiram entre si ($p>0,05$). Também não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as amostras A e D, com relação à impressão global.

Tabela 7. Médias e desvios padrão das notas atribuídas no teste de escala hedônica de 9 pontos. Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Sabor					
Tempo estocagem (dias)	A (controle)	Tempo estocagem (dias)	B	C	D
9	7,34 ^{a A} ± 1,10	6	7,16 ^{a A} ± 1,48	7,20 ^{a A} ± 1,44	7,16 ^{a A} ± 1,61
23	6,91 ^{a AB} ± 1,18	20	6,88 ^{a A} ± 1,89	7,12 ^{a AB} ± 1,67	6,86 ^{a AB} ± 1,78
30	6,72 ^{a AB} ± 1,14	27	6,86 ^{a A} ± 1,64	6,68 ^{a AB} ± 1,89	6,40 ^{a ABC} ± 2,14
36	6,90 ^{a AB} ± 1,25	33	6,44 ^{a A} ± 1,59	6,70 ^{a AB} ± 1,97	6,78 ^{a AB} ± 1,79
44	6,34 ^{a AB} ± 1,32	41	6,16 ^{a AB} ± 1,86	6,36 ^{a AB} ± 1,89	6,50 ^{a AB} ± 2,14
51	6,30 ^{a AB} ± 1,21	48	6,20 ^{a AB} ± 1,97	6,28 ^{a AB} ± 1,95	5,84 ^{a BC} ± 2,21
58	5,96 ^{a B} ± 1,29	55	5,36 ^{a B} ± 1,87	6,04 ^{a B} ± 2,32	5,30 ^{a C} ± 2,38
Impressão Global					
Tempo estocagem (dias)	A (controle)	Tempo estocagem (dias)	B	C	D
9	7,38 ^{a A} ± 0,88	6	7,24 ^{a A} ± 1,22	7,28 ^{a A} ± 1,23	7,24 ^{a A} ± 1,39
23	7,25 ^{a AB} ± 1,25	20	6,78 ^{a A} ± 1,69	7,12 ^{a A} ± 1,57	7,02 ^{a AB} ± 1,76
30	6,76 ^{a AB} ± 1,08	27	6,98 ^{a A} ± 1,41	6,64 ^{a AB} ± 1,61	6,72 ^{a AB} ± 1,84
36	6,90 ^{a AB} ± 1,25	33	6,44 ^{a A} ± 1,59	6,70 ^{a AB} ± 1,97	6,90 ^{a AB} ± 1,79
44	6,38 ^{a B} ± 1,28	41	6,30 ^{a AB} ± 1,61	6,54 ^{a AB} ± 1,75	6,54 ^{a ABC} ± 1,84
51	6,66 ^{a AB} ± 1,47	48	6,32 ^{a A} ± 1,86	6,54 ^{a AB} ± 1,74	6,10 ^{a BC} ± 2,01
58	5,90 ^{ab B} ± 1,33	55	5,36 ^{a B} ± 1,79	6,10 ^{b B} ± 2,16	5,46 ^{ab C} ± 2,30

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$). Médias seguidas na mesma letra MAIÚSCULA, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

As amostras A, B e D receberam médias inferiores a 6 na 8ª semana de estocagem para os atributos de sabor e de impressão global, culminando assim no fim da vida de prateleira. Já a amostra C apresentou média um pouco acima de 6, mas sem diferenciar significativamente ($p>0,05$) das demais amostras para o atributo de sabor, e sem diferenciar das amostras A e D na impressão global.

Em contrapartida, as médias das notas da intenção de compra (Tabela 8) das amostras A, C e D não atingiram até a 8ª semana valores menores que 3, preconizado pela ASTM (1993) para o fim da vida de prateleira. O leite UHT B recebeu média 2,92 em seu 55º dia de estocagem, não diferindo significativamente ($p>0,05$) das amostras A e D. Conforme pode ser observado na Figura 8, 38%, 32%, 56% e 40% dos provadores certamente ou provavelmente comprariam os leites A, B, C e D, respectivamente.

Não se pôde afirmar qual o motivo da rejeição dos provadores ao sabor do leite na 8ª semana de estocagem do leite UHT, uma vez que só foi verificada a aceitação do produto, utilizando-se, portanto, provadores não treinados.

Os resultados mostram que o valor máximo de NNP, atingido aos 56 dias de estocagem, foi 0,04% no leite UHT “D”. Mitchell & Ewings (1985) reportaram que amostras de leite UHT que exibiram sabor amargo, antes que a gelificação ocorresse, apresentaram aumento de NNP de 0,03 para 0,06%, mas não houve consenso do nível de NNP que se relacionasse ao aparecimento inaceitável do sabor. Os resultados de CN/P apresentaram decréscimo de 5,82% na amostra D e 2,06% na C, após 56 dias de estocagem. O limite estabelecido por Santos *et al.* (2003) para detecção de sabor amargo é um decréscimo de CN/P (%) maior que 4,76%. Kumaresan *et al.* (2007) publicaram que apenas um decréscimo de 4,04% de CN/P causou aparecimento de gosto amargo em leite pasteurizado.

Em relação ao sabor de ranço causado pelo aumento de AGL, Schmidt & Renner (1978) relataram que um aumento no conteúdo de AGL de 20 a 25% foi perceptível sensorialmente. Neste trabalho, aumento no teor de AGL que variaram de 44% em A até 93% em D após os 56 dias de estocagem dos leites UHT

foram observados, sugerindo que o defeito de sabor rançoso seria uma causa provável da rejeição dos provadores.

Os atributos de sabor e impressão global foram fundamentais para a determinação do fim da vida de prateleira do leite UHT, diferentemente da intenção de compra e dos atributos de aparência e aroma.

Tabela 8. Médias e desvios padrão das notas da intenção de compra. Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Intenção de Compra					
Tempo estocagem (dias)	A (controle)	Tempo estocagem (dias)	B	C	D
9	4,28 ^{a A} ± 0,73	6	4,04 ^{a A} ± 0,90	4,04 ^{a A} ± 0,95	4,16 ^{a A} ± 0,93
23	4,05 ^{a AB} ± 1,21	20	3,60 ^{a A} ± 1,12	3,94 ^{a A} ± 1,17	3,88 ^{a AB} ± 1,10
30	3,86 ^{a AB} ± 0,88	27	4,02 ^{a A} ± 0,98	3,66 ^{a A} ± 1,32	3,66 ^{a ABC} ± 1,22
36	3,88 ^{a AB} ± 0,90	33	3,52 ^{a AB} ± 1,15	3,80 ^{a A} ± 1,23	3,80 ^{a AB} ± 1,18
44	3,66 ^{a B} ± 0,96	41	3,56 ^{a AB} ± 1,11	3,52 ^{a A} ± 1,20	3,68 ^{a ABC} ± 1,22
51	3,68 ^{a AB} ± 1,05	48	3,42 ^{a AB} ± 1,25	3,62 ^{a A} ± 1,23	3,40 ^{a BC} ± 1,32
58	3,16 ^{ab B} ± 1,28	55	2,92 ^{a B} ± 1,18	3,46 ^{b A} ± 1,45	3,06 ^{ab C} ± 1,35

Médias seguidas na mesma letra minúscula na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$). Médias seguidas na mesma letra MAIÚSCULA na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Não se pode descartar a ação oxidativa favorecida pela embalagem do produto e que promove alteração de sabor. A estocagem prolongada do alimento pode levar à oxidação, principalmente em produtos onde a embalagem favorece a troca gasosa, o que resulta em aparecimento de *off-flavors* e em perdas nutricionais (SMET *et al.*, 2009). A oxidação dos lipídios, que é catalisada pela exposição à luz, resulta na formação de hidroperóxidos que facilmente reagem com ácidos graxos, levando à formação de compostos secundários, essencialmente aldeídos (SERRA *et al.*, 2008). Contudo, deve-se considerar que o

leite UHT acondicionado em PEBD foi armazenado no escuro. Entretanto, Smet *et al.* (2009) observaram que ao se usar embalagem protegida de luz, o leite UHT não sofreu oxidação ao longo de 3 meses de estocagem. De acordo com Dunkley & Stevenson (1987), o sabor de oxidado não é um problema sério para o leite UHT, provavelmente devido ao efeito antioxidante da alta temperatura do processamento e da baixa concentração de oxigênio no produto.

O leite UHT embalado em PEBD e estocado no escuro, produzido com leite cru de boa qualidade, foi rejeitado pelos provadores na 8ª semana de estocagem. É seguro, portanto, se estabelecer uma vida de prateleira de 7 semanas para esse produto.

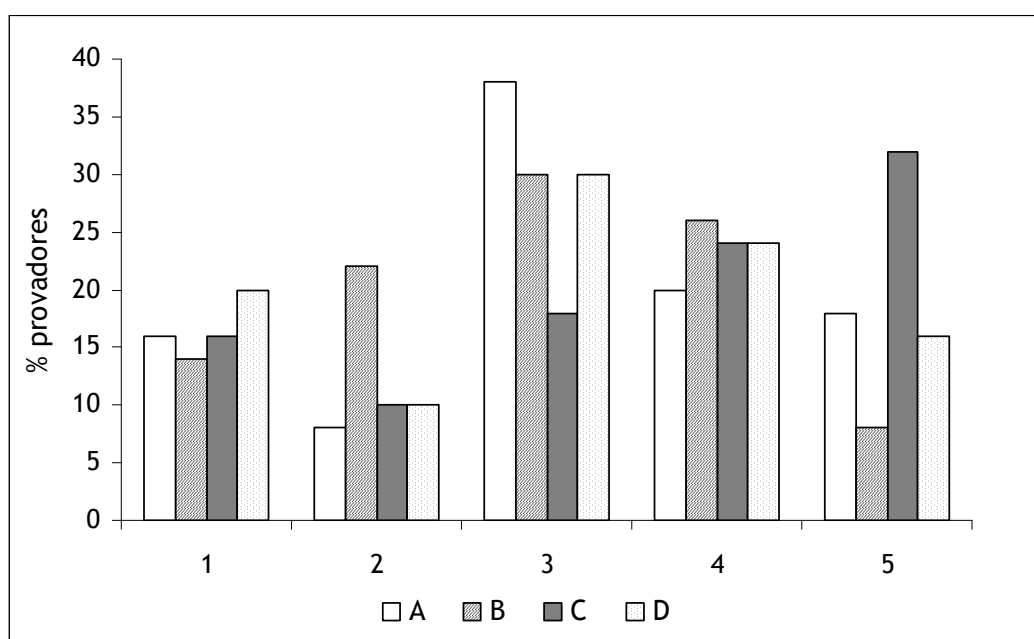


Figura 8. Histograma de intenção de compra do leite UHT na 8ª semana de estocagem (5=certamente compraria; 4=provavelmente compraria; 3=talvez compraria/talvez não compraria; 2=provavelmente não compraria; 1=certamente não compraria). Amostras de leite UHT - controle (A) e produzidos com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

CONCLUSÃO

O armazenamento refrigerado do leite cru por 3 dias a 3 , 7,3 e 10,3°C, promoveu maior desenvolvimento microbiano de psicrotróficos e *Pseudomonas* spp., que foi maior quanto mais elevada a temperatura de armazenamento. Em consequência disso, o leite UHT produzido com leite cru que foi armazenado a 10,3°C por 3 dias apresentou maior extensão de proteólise e lipólise, resultado da ação das enzimas termoresistentes de bactérias psicrotróficas ao longo de 56 dias de estocagem. Independente da temperatura de armazenamento do leite cru, o leite UHT, acondicionado em embalagem PEBD e armazenado na ausência de luz, apresentou vida de prateleira de 7 semanas.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPQ pelas concessões de bolsa, e à FAPESP pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, v. 59, n. 6, p. 823-827, 1976.

ALFORD, J. A.; PIERCE, D. A. 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *Journal of Food Science*, v. 26, p. 518-524, 1961.

ALVES, C. **Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. 64p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E 18.06.07. **Standard guide for the shelf life determination of consumer products by sensory evaluation**. Philadelphia, ASTM, 1993.

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 45-55, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16^a Ed., Washington, 1995.

BASTOS, M. S. R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 66/67, p. 32-36, 1999.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J.; ERNSTROM, C. A. Plamin activity and milk coagulation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3677-3685, 1991.

BLAKESLEY, R. W.; BOEZI, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 82, n.2, p. 580-582, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, 18 ago. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de dezembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 20 ago. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 10 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA**. Brasília: 1980. 116 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996. Seção 1, p.3977.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico** - nº 34 de 31 de outubro de 2007. Uma análise dos achados laboratoriais sobre ocorrências de fraudes em Leite UHT (UAT) - Polícia Federal, Operação “Ouro Branco”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/34_311007.htm> Acesso em: 05/07/2009.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods**. London: British Standard Institution, 1989. 12p.

BUCKY, A. R.; HAYES, P. R.; ROBINSON, D. S. Lipase production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in whole and skimmed milk. **Food Microbiology**, v3, p.37-44, 1986.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; OLIVEIRA, J. P. Contagem celular somática, contagem bacteriana total e composição centesimal do leite cru, refrigerado em tanques de expansão de uso individual, no estado de Goiás. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, 2004. p. 417-420.

BURTON, H. Reviews of the progress of dairy science: The bacteriological, chemical, biochemical and physical changes that occur in milk at temperatures of 100-150°C. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 341-363, 1984.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. **International Dairy Journal**, v.7, p. 129-140, 1997.

CHANDLER, R. E.; McMEEKIN, T. A. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. **Australian Dairy Technology**, v. 40, p.37-41, 1985

CORRADINI, C.; PECCHINI, G. Effect on proteinases of different UHT treatments. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 35, p. 393-395, 1981.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection** v. 54, n. 2, p. 172-207, 1982.

COX, J. M. The significance of psychrotrophic *Pseudomonas* in dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, n.2, p.108-113, 1993.

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

DE BEUKELAR, N. J.; COUSIN, M. A.; BRADLEY, R. L.; MARTH, E. H. Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 857-861, 1977.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v.16, p. 552-562, 2006.

DEETH H. C., FITZGERALD C. H. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products, in: Fox, P. F. (Ed.), **Advanced Dairy Chemistry**, Vol. 2: Lipids. 2. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995, p. 247-308.

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C.H.; WOOD, A.F. A convenient method to determine the extent of lipolysis in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 30, p. 109-111, 1975.

DENNY, C.B.; PARKINSON, N.G. Canned foods - Tests for cause of spoilage. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. Chap.62, p. 583-600.

DRIESSEN, F. M.; STADHOUDERS, J. Thermal activation and inactivation of exocellular lipases of some Gram-negative bacteria common in milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 28, p. 10-24, 1974.

DUNKLEY, W. L.; STEVENSON, K. E. Ultra-high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2192-2202, 1987.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Vendas de leite fluido e leite longa vida no Brasil - 1990/2006. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0701.php>. Acesso em 03/11/2009.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 829-834, 1998.

FAIRBAIN, D. J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.

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

FOX, P. F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation. **Journal Dairy Science**, v. 64, p. 2127-2137, 1981.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B.; RICHARDSON, G.H. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. Chap.8, p. 271-286.

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, p. 130-143, 2008.

GRIFFITHS, M. W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v. 44, n. 9, p.539-542, 1989.

GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 50, p. 289, 1981.

GRUFFERTY, M. B.; FOX, P. F. Milk alkaline proteinase. **Journal of Dairy Research**, V. 55, p. 609-630, 1988.

GUINOT-THOMAS, P.; AL AMMOURY, M.; LAURENT, F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 211-223, 1995a.

GUINOT-THOMAS, P.; AL AMMOURY, M.; LE ROUX, Y.; LAURENT, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: Effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 685-697, 1995b.

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

HAYES, M.C.; NIELSEN, S.S. Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.3, p.387-394, 2000.

JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; C. SANJOSE, C. Cooling raw milk: change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 915-921, 1995.

KARATAPANIS, A. E.; BADEKA, A. V.; RIGANAKOS, K. A.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time, **International Dairy Journal**, v.16, p. 750-761, 2006.

KELLY, A. L.; FOLEY, J. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/b-lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 411-420, 1997.

KESLLER, H. G. Pasteurization - sterilization - heating methods. In: **Food engineering and dairy technology**. Freising: Verlag A. Kessler, 1981. Chap.6, p.139-207.

KIURU, K; EKLUND, E.; GYLLENBERG, H.; ANTILLA, M. Die proteolytische aktivität der psychrotrophen mikroorganismen in der hofbehältermilch. **Milchwissenschaft**, v. 26, p. 138-143, 1971.

KROLL, S. Thermal stability. In: McKELLAR, R. C. (Ed), **Enzymes of Psychrotrophs in Raw Foods**, Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, p. 121-152.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.

LAW, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, p. 145-148, 1977.

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

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIÉS, G. A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 10-16, ago. 1999.

MCKELLAR, R. C. Factors influencing the production of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.53, p. 305-316, 1982.

MCKELLAR, R. C.; FROELICH, D. A.; BUTLER, G.; CHOLETTE, H.; CAMPBELL, C. The effect of uncooled storage on proteolysis, bitterness and apparent viscosity in ultra-high temperature milk. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 17, p.14-17-, 1984.

MITCHEL, G. E.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, v. 20, p. 65-76, 1985.

MOTTAR, J.; WAES, G.; MOERMANS, R.; NAUDTS, M. Sensoric changes in UHT milk during uncooled storage. **Milchwissenschaft**, v. 34, p. 257-262, 1979.

MOYSSIADI, T.; BADEKA, A.; KONDYLI, E.; VAKIRTZI, T.; SAVVAIDIS, I.; KONTOMINAS, M. G. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: Chemical and sensorial aspects. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 429-436, 2004.

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

NANGPAL, A. & REUTER, H. Reference diagram for furosine content in UHT milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 42, p. 77-86, 1990.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R., editor. **Food Chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker. p. 176-202, 1985.

PACHECO-SANCHEZ, C. P. **Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT**. 2007. 231p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

PANFIL-KUNCEWICZ, H.; KUNCEWICZ, A.; JUSKIEWICZ, M. Influence of storage conditions on changes in the fat fraction of UHT milk. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 14/55, n. 4, p. 341-348, 2005.

PETRUS, R. R.; FARIA, J. A. F. Testing a small scale aseptic system for milk in plastic bottles. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 18-22, 2007.

PETRUS, R. R.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; ABREU, L. F. Sensory stability of ultra high temperature milk in polyethylene bottles. **Journal of Food Science**, v. 74, n.1, p. 53-56, 2009.

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

PIRA Ltd International. Paper and Packaging Analyst, v. 17, 42-44, 1994.

RATTRAY, W.; GALLMANN, P.; JELEN, P. Nutritional, sensory and physico-chemical characterization of protein-standardized UHT milk. **Lait**, v. 77, p. 279-296, 1997.

RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 164-167, 1995.

RENNER, E. Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra-high-temperature products at high ambient temperatures. **Journal Dairy Research**, v. 55, p. 125-142, 1988.

REINHEIMER, J. A.; DEMKOW, M. R. Comparison of rapid tests for assessing UHT milk sterility. **Journal Dairy Research**, v. 57, p. 239-243, 1990.

ROWLAND, S. J. The determination of nitrogen distribution in milk. **Journal of Dairy Research**, v.9, p.42-46, 1938.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D. M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p.1601-1607, 2003.

SAXBY, M. J. **Food taints and off-flavors**. Glasgow, UK: Blackie Academic & Prof. p. 150-163, 1993.

SCHMIDT R.; RENNER E., Sensorische und chemische Veränderungen während der Lagerung haltbarer Milchsorten. II Chemische Veränderungen. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** v. 11, p. 244-248, 1978.

SILVA, F. A. S. **Assistat - Statistical Assistance**. Disponível em: <<http://www.assistat.com/>>. Acesso em: 06 ago. 2009.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. 147p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1. ed. Juiz de Fora, 2004. 127p.

SINGH, R. R. B.; PATIL, G. R. Storage stability of UHT buffalo milk II: Sensory changes and their relationship with physico chemical properties. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 384, 1989.

SINGH, R. R. B.; PATIL, G. R.; BALACHANDRAN, R. Kinetics of lipid hydrolysis during storage of UHT milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p.139-142, 2004.

SMET, K; DE BLOCK, J; DE CAMPENEERE, S; DE BRABANDER, D.; HERMAN, L.; K. RAES, K.; DEWETTINCK, K.; COUDIJZER, K. Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 372-379, 2009.

SNOEREN, T. H. M.; VAN RIEL, J. A. M.; BOTH, P. Proteolysis during the storage of UHT-sterilized whole milk 1. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 33, p. 31-39, 1979.

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

SPECK, M. L.; ADAMS, D. M. Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. In: Symposium: impact of heat stable microbial enzymes in food processing. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 786-789, 1976.

STANIEWSKI, B. Lipolysis in raw milk. **Przegląd Mleczarnia**, v.3, p. 75-80, 1998.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. Chap.6, p.53-62.

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

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations Title 21**. 21CFR178.1005. 2009. Hydrogen peroxide solution. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; MIRALLES, B.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. **Food Chemistry**, v. 72, p. 51-58, 2001.

WALTER, E. H. M. **Adequações técnicas de um sistema asséptico para leite e bebidas de alta acidez em embalagens flexíveis**. 2010. 187p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas spp.* isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2085-2095, 2000.

CAPÍTULO 3

**Influência da luz na qualidade e aceitação sensorial
do leite UHT acondicionado em embalagem flexível
de polietileno de baixa densidade**

Influência da luz na qualidade e aceitação sensorial do leite UHT acondicionado em embalagem flexível de polietileno de baixa densidade

RESUMO

Mudanças químicas e sensorias do leite UHT integral, acondicionado em embalagens flexíveis, sob exposição de luz flurescente, foram monitoradas durante 72h. O material de embalagem utilizado foi polietileno de baixa densidade (PEBD), pigmentado com TiO_2 . Foram feitas análises de lipoxidação, ácidos graxos livres e cor, e avaliação sensorial para a avaliação da qualidade do leite. Os resultados mostraram que ocorreu extensa lipoxidação levando à rejeição dos provadores, após 24h de exposição.

Palavras-chave: leite UHT, embalagem flexível, permeabilidade ao oxigênio, lipoxidação.

ABSTRACT

Chemical and sensory changes in whole fat UHT milk stored under fluorescent light in 400mL pouches made of a monolayer TiO_2 pigmented (LDPE - low density polyethylene) were monitored for a period of 72 hours. Changes in lipid oxidation, free fatty acid content and color were measured, while sensory analyses were used to assess milk quality. Results showed extensive lipid oxidation during light exposure leading to rejection by the panellists after 24 h.

Keywords: UHT milk, flexible package, oxygen permeability, lipid oxidation.

1. INTRODUÇÃO

Processos de oxidação no leite levam à formação de *off-flavors* e à deterioração de sua qualidade nutricional (Smet et al., 2008). A estabilidade oxidativa em leite e derivados é o resultado do balanço entre processos pró e antioxidantes influenciados por fatores como o teor de ácidos graxos insaturados, a presença de metais iônicos e a presença de antioxidantes como tocoferóis e carotenóides (Barrefors et al., 1995). A exposição do leite, sob luz flurescente, nas prateleiras de supermercados, pode promover alterações oxidativas (Bradley, 1980; Cladman et al., 1998). O sabor induzido pela luz é bem conhecido e vem sendo investigado em detalhes (Sattar and deMan, 1975; Shipe et al., 1978; Whited et al., 2002; Mestdagh et al., 2005). A embalagem pode prevenir diretamente o desenvolvimento desse sabor através de proteção contra luz e oxigênio (Schroder, 1982; Skibsted, 2000; Vassila et al., 2002).

Em geral, o leite UHT é menos sensível que o leite pasteurizado a sofrer mudanças causadas pela exposição da luz, devido à sua menor disponibilidade de oxigênio (Saffert et al., 2008) e liberação de compostos sulfurados. Esses compostos são resultantes da desnaturação de proteínas durante o tratamento térmico e alguns, como as sulfidrilas, possuem ação antioxidante, e outros são compostos voláteis, responsáveis pelo sabor a cozido (Hansen et al., 1982).

Como consequência, a sensibilidade do leite UHT às mudanças nutricionais e sensoriais causadas pela exposição à luz é menor, sendo que no leite UHT em embalagem transparente as mudanças sensoriais podem ser percebidas após alguns dias de iluminação, enquanto que no leite pasteurizado após somente algumas horas (Sattar and deMan, 1975).

No início dos anos 1970, o Canadá seguido dos EUA e mais recentemente do México, introduziu no mercado tanto leite UHT em embalagens tipo bolsa de polietileno. Estas embalagens flexíveis, em oposição às rígidas, podem reduzir os custos em até 60-70% pela diminuição de peso (70 a 90%),

volume de estocagem (20 a 30%) e custos de distribuição (mais de 60%) (Vassila et al., 2002).

Os problemas das embalagens plásticas incluem a transmissão da luz e a permeabilidade ao oxigênio. Os produtos lácteos são sensíveis à luz devido à presença da riboflavina (vitamina B₂), caracterizada por ser um forte sensibilizador, capaz de absorver a energia luminosa e transferi-la para moléculas de oxigênio altamente reativas, desencadeando uma série de reações de oxidação nos componentes do leite (proteína, lipídeos e vitaminas) que resultam em perdas nutricionais e alterações sensoriais (*off-flavors*) (Wold, 2006). A interação entre a luz, oxigênio e riboflavina (Aurand et al., 1977) causa foto-oxidação, através da produção de radicais livres e oxigênio molecular singlete que podem oxidar os constituintes do leite (Borle et al, 2001).

Ácidos graxos insaturados geralmente são alvos do ataque de radicais livres, seguido pela formação de peróxidos ou hidroperóxidos. Leite embalado em embalagem transparente e armazenado sob luz fluorescente apresenta altos níveis de hexanal e ácido tiobarbitúrico (TBA) resultante da foto-oxidação lipídica, comparado com o leite armazenado em embalagem opaca ou cartonada (Erickson, 1997).

A oxidação lipídica sensibilizada pela riboflavina é um importante fator no desenvolvimento de *off-flavor*, embora a taxa de degradação lipídica pela riboflavina seja relativamente baixa quando comparada com a oxidação da proteína. O *off-flavor* de ranço é causado pela oxidação de lipídios insaturados devido à ação do oxigênio singlete com formação de hidroperóxidos. Esses produtos são instáveis e originam compostos voláteis como aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis pelo *off-flavor* (Aurand et al., 1966; Dimick, 1982).

A decomposição dos peróxidos e as reações subsequente dos radicais livres com componentes dos alimentos, além de ocasionar alterações sensoriais e perdas de valor nutritivo, podem levar a formação de substâncias potencialmente tóxicas (Bradley & Min, 1992; Skibsted, 2000). Em experimento desenvolvido por

Smet et al. (2009), amostras de leite UHT estocadas em garrafas escuras de vidro e em embalagem de polietileno de alta densidade (PEAD) mostraram comportamento similar contra a oxidação, sugerindo que a permeabilidade ao oxigênio dos materiais das embalagens não é um importante fator de proteção à oxidação no leite UHT. O mesmo foi observado por Mestdagh et al. (2005) e Smet et al. (2008), sem formação de compostos da oxidação em leite estocado em garrafas PET e de PEAD sem barreira adicional ao oxigênio, mas com barreira contra a luz.

O estabelecimento de parâmetros que afetam a aceitação do consumidor de leite fluido é essencial para garantir a máxima qualidade do produto no mercado (Chapman et al., 2002). O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do tempo de exposição de luz fluorescente na qualidade e aceitação sensorial o leite UHT embalado em PEBD flexível pigmentado com 1,5% de TiO_2 .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Processamento UHT e embalagem

Leite UHT homogeneizado e integral com 3,5% de gordura foi produzido na planta de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Para tanto, foi adicionado ao leite cru 0,1% de citrato de sódio antes do processamento UHT pelo método indireto em trocador de calor a placas (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas - SP - Brazil). O leite foi pré-aquecido a 68-70°C, homogeneizado em 2 estágios (210 kgf cm^{-2} e 40 kgf cm^{-2} , respectivamente) em homogeneizador a pistão (Alitec Comércio e Indústria Ltda., Pindamonhangaba - SP - Brazil), tratado térmicamente a 145°C por 10s e resfriado a 14-20°C. O produto foi bombeado à máquina de embalagem tipo forma, enche e fecha (Sumá Indústria e Comércio Ltda., Campinas - SP). A esterilização das embalagens foi efetuada por imersão em solução de peróxido de hidrogênio 35% (marca Asepticer, Peróxido do Brasil

Ltda., Curitiba - PA) a 35 ± 2 °C por 13 s e exposição à radiação ultravioleta de $260 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ em 254 nm por pelo menos 1,0 s, emitida por lâmpada TUV 15W T5 (Philips do Brasil Ltda., São Paulo - SP) 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.

2.2. Análises microbiológicas no leite cru

A contagem de mesófilos aeróbios (Swanson et al., 2001) no leite cru foi feita para o monitoramento da qualidade microbiológica antes do processamento UHT. Também foi efetuada a contagem de psicrótróficos aeróbios (Swanson et al., 2001).

2.3. Análises de caracterização do leite UHT

No leite UHT foram efetuadas as seguintes análises: teor de gordura pelo método de Gerber (British Standard Institution, 1989); acidez titulável (AOAC 947.05, 1995); pH pelo método potenciométrico (pHmetro Digimed modelo DM-22, Digicrom Analítica Ltda.); Extrato Seco Total (EST) (AOAC, 1995); nitrogênio total (NT) pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995), multiplicado pelo fator de 6,38 para o cálculo de proteína; estabilidade ao etanol 68% (v/v) (Brasil, 2006).

2.4. Material da embalagem

O material da embalagem, constituído de PEBD pigmentado com 1,5% de dióxido de titânio, foi obtido da Plastunion Indústria de Plásticos Ltda. (Caieiras - SP - Brazil). A espessura do filme foi determinada em micrômetro Absolute ID-C112B, (Mitutoyo Corp., Utsunomiya-shi - Japan), de acordo com a metodologia da *American Society for Testing and Materials* (2008). A permeabilidade ao oxigênio foi medida utilizando MOCON OX-TRAN 2/20 (Modern Controls, Inc., Minneapolis - USA) a RH = 100%, T = 23 ± 2 °C e os resultados expressos em $\text{mL}/\text{m}^2 \cdot \text{dia} \cdot \text{atm}$.

2.5. Transmitância especular

A transmitância especular do material da embalagem à radiação ultravioleta (UV) e luz foi determinada utilizando espectrofotômetro Agilent 8453 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn - Germany) com faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm, a uma velocidade de varredura de 120 nm/min (ASTM, 2007a; 2009; Sarantópoulos, 2002). O equipamento foi calibrado ao ar, sem corpo-de-prova, para definir a leitura de transmitância de 100% ao longo do espectro UV-visível. Adicionalmente foram medidas transmitância para comparação em outros materiais de embalagens como caixa laminada cartonada, garrafa plástica e bolsa plástica comercial.

Como o processo de decomposição dos peróxidos e as reações subsequente dos radicais livres com componentes dos alimentos são iniciadas pelas radiações absorvidas. A comparação do espectro em que o produto é exposto com o espectro de absorção dos fotossensores é fundamental na predição das alterações ao longo da estocagem (Sattar & Deman, 1975; Skibsted, 2000), possibilitando estabelecer e avaliar os requisitos de proteção dos sistemas de embalagens.

2.6. Estocagem do produto

O produto foi estocado sob duas condições: no escuro (amostra controle); e sob exposição à luz fluorescente numa intensidade de 1920 ± 100 lux. A exposição da luz foi feita após duas semanas do processamento UHT pelo período de 12, 24, 48 e 72 horas. A intensidade de luz foi medida com luxímetro Extech modelo LX-102 (Extech Instruments Corporation, Waltham - EUA). As câmaras de luz apresentavam superfícies internas brancas com dimensões de 50 x 90 x 80 cm e eram iluminadas por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Tipo “Luz do dia plus” com bulbo T8, potência 30 W, eficiência luminosa 67 lm/W, temperatura de cor 5.200 K e índice de reprodução de cores 72, Havells Sylvania Brasil Iluminação Ltda., Santo Amaro - SP).

2.7. Oxidação lipídica

Foram realizadas análises de reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo a metodologia descrita por King (1962). Ao leite (17,6 mL) aquecido a 30°C foram adicionados 1 mL de solução de ácido tricloroacético (1 g mL⁻¹) e 2 mL de etanol 95%, sob agitação vagarosa. Após 5 min em repouso, a solução foi filtrada em papel Whatman nº 42, e 4 mL do filtrado foram retirados e misturados a 1 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (1,4 g de ácido 2-tiobarbitúrico, dissolvido em 100 mL de etanol 95%). A nova solução foi colocada em banho-maria por 60 min a 60°C e, após resfriamento completo, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SP 2000 UV, Bel Photonics, Italy) a 532 nm, com água destilada como padrão.

2.8. Lipólise

A atividade lipolítica foi estimada pela determinação da concentração dos ácidos graxos livres (AGL) através metodologia de titulação descrita por Deeth et al. (1975). Em um tubo, 3 mL de leite foram misturados com 10 mL da solução de extração, composta de álcool isopropílico (isopropanol), éter de petróleo e H₂SO₄ 4N (proporção 40:10:1). Foram também adicionados ao tubo 6 mL de éter de petróleo e 4 mL de água destilada. O tubo foi agitado por 15s e após 10 min de descanso foram visualizadas duas camadas distintas. Uma alíquota da camada superior foi transferida a um erlenmeyer, e a ela adicionadas 6 gotas de solução de fenolftaleína 1% em metanol. A amostra foi titulada com solução KOH 0,02 N em álcool metílico. A atividade lipolítica foi expressa com µeq/mL AGL no leite, utilizando-se a seguinte equação:

$$\mu\text{equiv AGL mL}^{-1} = (\text{TN}/\text{PV}) \times 10^3$$

Onde T, o volume titulado; N a normalidade of KOH; P a proporção da alíquota retirada da camada superior (volume retirado / volume total da camada superior); V o volume do leite.

Foi feito um branco sem o leite.

2.9. Cor

Aproximadamente 30 mL de amostra foram colocadas em um tubo teste para a determinação da cor em colorímetro (Color Quest II, HunterLab, USA) utilizando reflectância especular, com medição dos valores de 'L' (luminosidade), 'a' (componente verde-vermelho) e 'b' (componente azul-amarelo).

2.10. Análise sensorial

As amostras foram avaliadas por uma equipe de 42 julgadores não-treinados através de teste de aceitação e intenção de compra (ASTM, 2005b) no Laboratório de Análise Sensorial do DTA, FEA, UNICAMP. Os provadores aceitaram e assinaram o consentimento para a participação da pesquisa. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, parecer número 153/2009 (Anexo I).

As amostras de leite UHT em embalagem PEBD pigmentada com 1,5% TiO₂, estocada no escuro (controle), e sob luz (1920 ± 100 lux) pelos períodos de 12h, 24h, 48h e 72h foram apresentadas monodicamente à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em copinhos de plástico de 50 mL. Foi utilizada escala hedônica estruturada mista de 9 pontos, sendo 1 = desgostei extremamente; 2 = desgostei muito; 3 = desgostei moderadamente; 4 = desgostei ligeiramente; 5 = não gostei/nem desgostei; 6 = gostei ligeiramente; 7 = gostei moderadamente; 8 = gostei muito; 9 = gostei extremamente). Na intenção de compra, os provadores responderam se comprariam ou não o produto. O critério para o final da vida de prateleira das amostras foi uma média das notas no teste de aceitação inferior a 6, correspondente ao termo hedônico "gostei ligeiramente", e um índice de intenção de compra inferior a 60% (ASTM, 1993).

Os dados dos testes de aceitação foram tratados estatisticamente, através da Análise de Variância, para verificar diferença significativa ($p < 0,05$)

entre as amostras. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, para comparação entre os tratamentos em cada período de análise.

2.11. Análises estatísticas

Os resultados das análises de transmitância, lipoxidação, lipólise e cor nos leites UHT foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre as médias ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Assistat, versão 7.5 beta (Silva, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises microbiológicas no leite cru

As populações de mesófilos e psicrotróficos aeróbios do leite cru foram de $1,1 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,9 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, respectivamente. O resultado da contagem de mesófilos indicou um leite de boa qualidade, entretanto a alta contagem de psicrotróficos indica práticas de refrigeração inadequadas, como uso de temperaturas maiores que 5°C e/ou tempo prolongado de estocagem refrigerada do leite cru.

3.2. Caracterização do leite UHT

Os resultados das análises de caracterização do leite UHT são mostrados na Tabela 1. Os parâmetros encontram-se dentro da normalidade, apresentando conformidade com os preconizados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (Brasil, 1996).

Tabela 1. Caracterização do leite UHT.

Gordura (%)	pH	Acidez (°D)	EST	Proteína (%)	Estabilidade ao etanol 68%
3,5	6,73	16,07	12,26	2,79	estável

3.3. Material da embalagem

O filme de PEBD pigmetado com 1,5% de dióxido de titânio apresentou espessura de $58 \pm 4 \mu\text{m}$ ($n=5$), e permeabilidade ao oxigênio de $16000 \text{ cm}^3/\text{m}^2.\text{dia.atm}$ ($n=2$).

3.4. Transmitância especular

A transmitância especular dos filmes de PEBD, das embalagens de leite longa vida comerciais, tipo caixas laminadas cartonadas (CLC), garrafas plásticas comerciais (GPC) e bolsas plásticas comerciais (BPC) são apresentadas na Figura 1. A análise estatística dos dados de transmitância especular indicou que PEBD diferiu significativamente ($p<0,05$) das demais ao longo do espectro UV-visível. A transmitância das BPC diferiu significativamente ($p<0,05$) das outras embalagens numa faixa de comprimento de onda maior que 520 nm, fora do espectro principal de absorção da riboflavina (200 - 520 nm) (Bosset et al., 1995). O CLC e a GPC não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si, sendo consideradas estruturas opacas. A Figura 1-B apresenta os espectros de transmitância especular desses materiais, em menor escala decimal, possibilitando visualizar a similaridade entre os mesmos. O principal elemento de barreira à radiação UV e à luz da GPC é um pigmento de coloração preta incorporado a uma das camadas das estruturas desses materiais. No caso da CLC, a proteção do alimento contra a fotoxidação é exercida por uma folha de alumínio, bem como pelo papel cartão e a tinta de impressão. A menor transmitância especular da BPC, em relação ao PEBD, pode ser atribuída à maior espessura do material de embalagem, bem como ao maior conteúdo de dióxido de titânio incorporado ao polímero plástico.

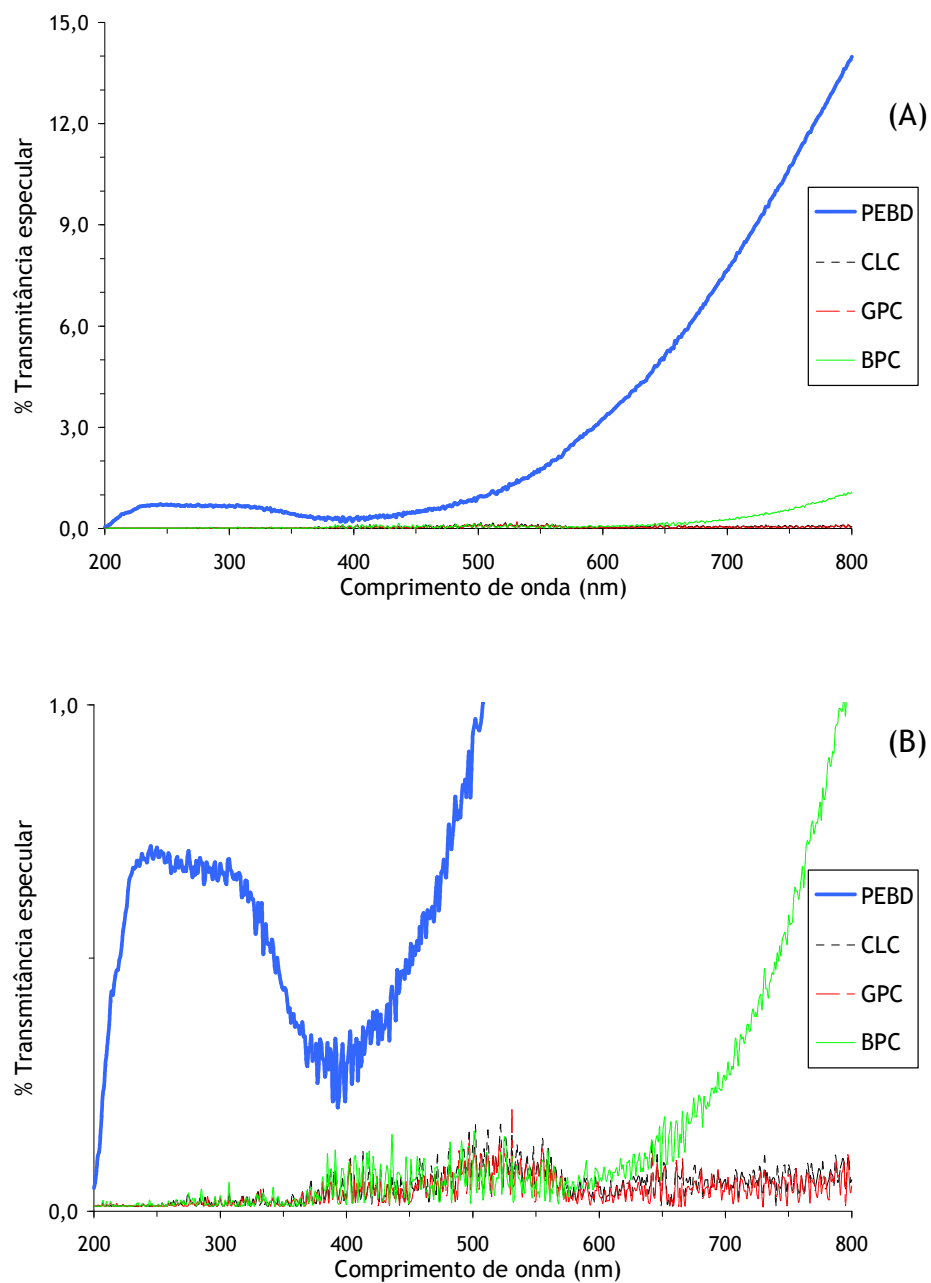


Figura 1. Espectro de transmitância especular nas embalagens: polietileno de baixa densidade pigmentado com dióxido de titânio (PEBD), caixas laminadas cartonadas (CLC), garrafas plásticas comerciais (GPC) e bolsas plásticas comerciais (BPC).

3.5. Oxidação lipídica

A oxidação lipídica se elevou gradualmente com o tempo de exposição do leite à luz (Figura 2). Entre o período de 0 e 12h, de 12 e 24h e de 24 e 48h não foi observado diferença significativa ($p>0.05$). Quanto maior o período de estocagem, maior o efeito da luz na oxidação lipídica, provavelmente devido à alta permeabilidade ao oxigênio e transmissão de luz da embalagem. Os valores encontrados de 0,088 a 0,157 após 72h estão de acordo com os de Vassila et al. (2002), que encontraram a uma absorbância de 532 nm por volta de 0,04 to 0,15 após 3 dias de estocagem de leite pasteurizado. Estes resultados foram observados em embalagens de PEBD, transparentes e com pigmentação de TiO_2 , com 60 μm de espessura, porém sob exposição menos drástica de luz fluorescente (825 ± 50 lux).

O fato da oxidação lipídica do leite UHT ter sido similar ao observado em leite pasteurizado exposto à luz de menor intensidade pode ser explicado pelo aumento das propriedades antioxidantes do leite, causados pelo tratamento UHT. Durante os estágios avançados de aquecimento, a formação de produtos da reação de Maillard promove um aumento na capacidade antioxidante do leite UHT (Lingnert & Waller, 1983; Elizalde *et al.*, 1991; Yen & Tsai, 1993; Nicoli *et al.*, 1997; Calligaris *et al.*, 2004). A eficácia de grupos sulfidrilas na atuação antioxidante e na prevenção do aparecimento de *off-flavor* (Rollema & Poll, 1986), durante a estocagem depende do grau de oxidação do leite UHT. Em análise sensorial, oxidação do leite UHT foi percebida mais rapidamente a uma temperatura de estocagem de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Celestino et al., 1997).

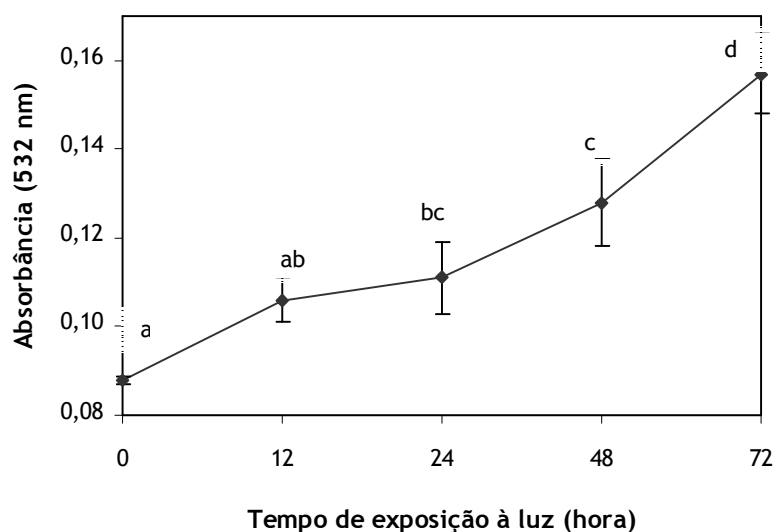


Figura 2. Oxidação lipídica usando análise TBARS no leite UHT em embalagem PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux. a,b,c,d - médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

3.6. Lipólise

A concentração de AGL foi determinada para se excluir a possibilidade de *off-flavor* decorrente de lipólise. Aumento na concentração de AGL também interessa devido aos AGL serem mais favoráveis à oxidação que os ácidos graxos esterificados (Larsson et al., 1983).

O teor de AGL não variou ao longo do tempo de exposição à luz (Tabela 2). Em geral, as lipases microbianas termoresistentes atuam na gordura do leite processado quando a contagem de psicrotóxicos do leite cru excede 10^7 cels mL^{-1} (Law, 1979), o que não ocorreu neste trabalho.

Tabela 2. Lipólise no leite UHT estocado sob luz em embalagem PEBD.

Tempo de exposição à luz (horas)	(controle) 0	12	24	48	72
AGL ($\mu\text{equiv mL}^{-1}$) *	$3,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$

*Não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$).

3.7. Cor

A cor do leite muda com a ação da luz (Toba et al., 1980). O valor b- aumentou, diferindo significativamente ($p < 0,05$) com o tempo de exposição de luz (Tabela 3). O decréscimo de b- com o aumento do tempo de exposição à luz indica diminuição da cor amarela. Isso provavelmente é causado pela fotodestruição de certos componentes de cor, como a degradação simultânea do amarelo esverdeado da riboflavina, β -caroteno, e moléculas de vitamina A, como já descrito por Toba et al. (1980), Bosset et al. (1993) e Lee et al. (1998).

Os valores L- e a- não diferiram significativamente ($p > 0,05$) ao longo da exposição, como mostrado na Tabela 3. A reação de Maillard faz decrescer a intensidade de luminosidade (valor L-) e aumentar a concentração da pigmentação marrom (Reddy et al., 1991). Vários autores (Burton, 1954; Zadow, 1954; Mittal et al., 1990; Reddy et al., 1991) reportaram reduções em L- devido à reação de escurecimento não enzimático.

Tabela 3. Valores de cor L-, a- e b- do leite UHT estocado sob diferentes tempos de exposição de luz.

Tempo de exposição à luz (horas)	Cor L-*	Cor a-*	Cor b-
0 (controle)	86,90 $\pm$ 0.05	-1,05 $\pm$ 0.01	8,44 ^A $\pm$ 0.01
12	86,89 $\pm$ 0.26	-0,94 $\pm$ 0.02	7,81 ^B $\pm$ 0.04
24	86,55 $\pm$ 0.35	-1,01 $\pm$ 0.01	7,58 ^C $\pm$ 0.03
48	86,75 $\pm$ 0.62	-0,90 $\pm$ 0.01	7,12 ^D $\pm$ 0.08
72	86,60 $\pm$ 0.30	-0,99 $\pm$ 0.02	6,81 ^E $\pm$ 0.05

A, B, C, D, E - Médias seguidas na mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

*Sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

3.8. Análise sensorial

Os resultados das notas do teste hedônico do leite UHT são apresentados na Figura 1. Houve diminuição da aceitação sensorial do leite quanto maior foi o tempo de exposição à luz. Leites com 0h (controle) e 12h de exposição à luz foram aceitos sensorialmente e apresentaram notas médias de

7,31 e 6,64, respectivamente. Os provadores rejeitaram as os leites UHT expostos à luz por tempo igual ou maior que 24, atribuindo notas que variaram de 5,67 (24h) a 3,43 (72h). Entretanto, 69% dos provadores responderam que comprariam a amostra com 24h de exposição (Figura 4).

O tempo de exposição à luz afetou significativamente ($p<0,05$) o desenvolvimento e o aparecimento de sabor indesejável no leite, provavelmente causado pela oxidação da gordura, como sugerem os dados de aceitação sensorial (Figura3) e oxidação lipídica (Figura 2), que mostram ter havido diferença com o leite controle, após 24 h de exposição à luz. A partir de 24 h de exposição à luz, a oxidação da gordura foi cada vez mais pronunciada e o produto recebeu notas cada vez mais inferiores.

Como observado por alguns autores (Moyssiadi et al., 2004; Karatapanis et al., 2006; Smet et al., 2009), o *off-flavor* pela oxidação aumenta mais rapidamente no leite de embalagem exposta a luz. Chapman et al. (2002) comprovou que um painel de provadores treinados poderia detectar sabor alterado devido à oxidação lipídica pela luz em leite pasteurizado em embalagem PEAD e exposto à 2000 lux à 6°C imediatamente após de 15 a 30 min. Na oxidação pela luz, especialmente na presença de riboflavina, os radicais livres produzidos podem reagir com os ácidos graxos insaturados. Na quebra dos ácidos graxos, aldeídos de baixo peso molecular e cetonas são formados (Nawar, 1985; Saxby, 1993). Os sabores resultantes tipicamente percebidos são similares ao de óleo vegetal velho, de papelão, “de cabra”, ou metálico (Heer et al., 1995).

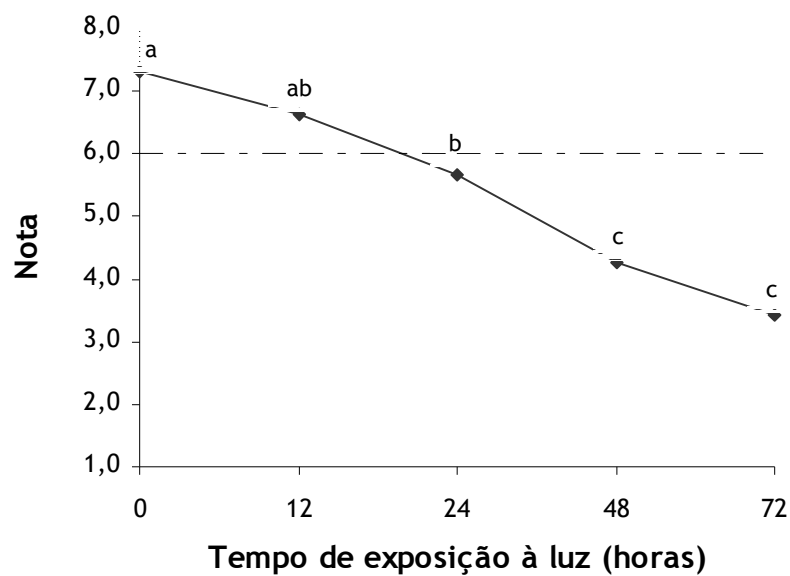


Figura 3. Notas da avaliação sensorial do leite UHT em embalagem tipo bolsa PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux. a,b,c,d - médias com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

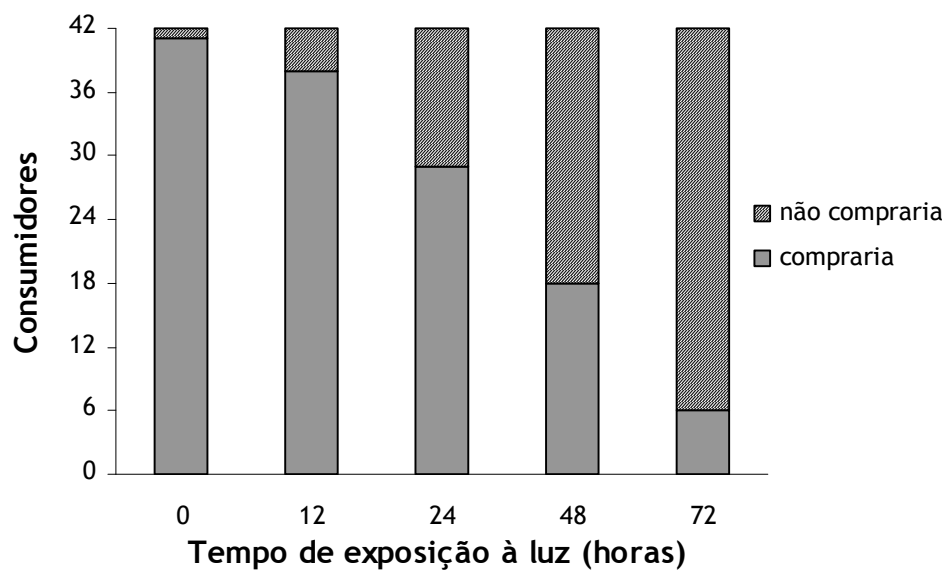


Figura 4. Intenção de compra do leite UHT em embalagem tipo bolsa PEBD sob exposição de 1920 ± 100 lux.

4. CONCLUSÃO

O embalagem testada (PEBD + 1,5% TiO₂) não promoveu proteção suficiente contra oxidação lipídica no leite UHT, detectada sensorialmente pelos consumidores a partir de 24h de exposição à luz (1920 ± 100 lux). Esta embalagem é uma proposta mais econômica e uma alternativa conveniente à embalagem de papel laminado cartonado multicamadas, predominante no mercado brasileiro. Entretanto, uma forma de cobertura para a embalagem, feita, por exemplo, de papel cartão, é necessária como forma de proteger o produto da exposição à luz.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa teve o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

- American Society for Testing and Materials. **ASTM D3985-05: Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor**. West Conshohocken: ASTM International, 2005a.
- American Society for Testing and Materials. **ASTM E 18.06.07. Standard guide for the shelf life determination of consumer products by sensory evaluation**. Philadelphia, ASTM, 1993.
- American Society for Testing and Materials. **ASTM D1003-07: Standard test method for haze and luminous transmittance of transparent plastics**. West Conshohocken: ASTM International, 2007a. 7p.
- American Society for Testing and Materials. **ASTM E104-02(2007): Standard practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions**. West Conshohocken: ASTM International, 2007b. 5p.
- American Society for Testing and Materials. **ASTM E171-94(2007): Standard specification for standard atmospheres for conditioning and testing flexible barrier materials**. West Conshohocken: ASTM International, 2007c. 1p.

American Society for Testing and Materials. **ASTM E1164-09: Standard practice for obtaining spectrometric data for object-color evaluation.** West Conshohocken: ASTM International, 2009. 8p.

American Society for Testing and Materials. **ASTM E2454-05: Standard guide for sensory evaluation methods to determine the sensory shelf life of consumer products.** West Conshohocken: ASTM International, 2005b. 9p.

American Society for Testing and Materials. **ASTM F2251-03(2008): Standard test method for thickness measurement of flexible packaging material.** West Conshohocken: ASTM International, 2008. 4p.

Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International.** 16^a Ed., Washington, 1995.

Aurand, L. W.; Boone, N. H.; Giddings, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 363-369, 1977.

Aurand, L. W.; Singleton, J. A.; Noble, B. W. Photooxidation reaction in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 49, p.138 - 142, 1966.

Barrefors, P.; Granelli, K.; Appelqvist, L.-A., Björck, L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavour. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2691-2699, 1995.

Borle, F.; Sieber, R.; Bosset, J. O. Photo-oxidation and photoprotection of foods, with particular reference to dairy products: An update, of a review article (1993-2000). **Sciences des Aliments**, v. 21, p. 571-590, 2001.

Bosset, J. O.; Gallmann, P. U.; Sieber, R. Influence de la translucidité de l'emballage sur la conservation du lait et des produits laitiers. **Lait**, v. 73, p. 3-49, 1993.

Bosset, J. O.; Sieber, R.; Gallmann, P. U. Light transmittance: Influence on the shelf life of milk and milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 300, p.19-39, 1995.

Bradley, R. L. J. Effect of light on alteration of nutritional value and flavor of milk: A review. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 314-320, 1980.

Bradley, D.G.; Min, D.B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, n.3, p.211-236, 1992.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 10 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.

Brasil. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 11 mar. 1996. Seção 1, p.3977.

British Standards Institution. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods**. London: British Standard Institution, 1989. 12p.

Burton, H. Colour changes in heated and unheated mil. 1,. The browning of milk on heating. **Journal of Dairy Research**, v. 21, p. 194-204, 1954.

Calligaris, S.; Manzocco, L.; Anese, M.; Nicoli, M. C Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 421-427, 2004.

Celestino, E. L.; Iyer, M.; Roginski, H. Reconstituted UHTtreated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. **International Dairy Journal**, v.7, p.129-140, 1997.

Chapman, K. W.; Whited, L. J.; Boor, K. J. Sensory threshold of light-oxidized flavor defects in milk. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2770-2773, 2002.

Cladman, W.; Scheffer, S.; Goodrich, N.; Griffiths, M. W. Shelf life of milk packaged in plastic containers with and without treatment to reduce light transmission. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 629-636, 1998.

Deeth, H. C.; Fitz-Gerald, C.H.; Wood, A.F. A convenient method to determine the extent of lipolysis in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 30, p. 109-111, 1975.

Dimick, P.S. Photochemical effects on flavor and nutrients of fluid milk. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v.15, n.4, p.247-256, 1982.

Earley, R. R.; Hansen, A. P. Effect of process and temperature during storage on ultra-high temperature steam-injected milk. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 11-16, 1982.

Elizalde, B. E.; Dalla Rosa, M.; Lerici, C. R. Effect of Maillard reaction volatiles on lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, p. 758-762, 1991.

Erickson, M. C. Chemical and microbial stability of fluid milk in response to packaging and dispensing. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 107-11, 1997.

Hansen, A. P.; Swartzet, K. R.; Giesbrecht FG. Taste panel tasting of UHT fluid dairy products. **Journal of Food Quality**, v. 4, p. 203-216, 1982.

Heer, A. K.; Duncan, S. E.; Brochetti, D. Sensory detection of and consumer response to off-flavors in milk. **Dairy Food Environmental Sanitization**, v. 15, p. 488-493, 1995.

Karatapanis, A. E.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time, **International Dairy Journal**, v.16, p. 750-761, 2006.

King, R. L. Oxidation of milk fat globule membrane material. Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 1165-1171, 1962.

Larsson, L. L.; Wallen, S. E.; Owen, F. G.; Lowry, S. R. Relation of age, season, production and health indices to iodine and β -carotene concentration in cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2557-2562, 1983.

Law, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.

Lee, K. H.; Jung, M. Y.; Kim, S. Y. Effects of ascorbic acid on the light-induced riboflavin degradation and color changes in milks. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 46, p. 407-410, 1998.

Lingnert, H.; Waller, G. R. Stability and antioxidants formed during histidine and glucose by Maillard reaction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 27-30, 1983.

Mehta, R. S.; & Bassette, R. Effects of carton material and storage temperature on the flavour of UHT-sterilized milk. **Journal of Food Protection**, v. 43, p. 392-394, 1979.

Mestdagh, F.; De Meulenaer, B.; De Clippeleer, J.; Devlieghere, F., Huyghebaert, A. Protective influence of several packaging materials on light oxidation of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 499-510, 2005.

Mittal, S. B.; Hourigan, J. A.; Zadow, J. G. Effect of added sodium hexametaphosphate on certain technological aspects of UHT recombined milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 45, p.1-4, 1990.

Moyssiadi, T.; Badeka, A.; Kondyli, E.; Vakirtzi, T.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. G. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: Chemical and sensorial aspects. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 429-436, 2004.

Nawar, W. W. Lipids. In: Fennema, O. R., editor. Food Chemistry. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. p. 176-202, 1985.

Nicoli, M. C.; Anese, M.; Manzocco, L.; Lerici, C. R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degrees. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, p. 292-297, 1997.

Østdal, H.; Andersen, H. J.; Nielsen, J. H. Antioxidative activity of urate in bovine milk. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 5588-5592, 2000

Reddy, K. K.; Nguyen, M. H.; Kailasapathy, K. The effects of some treatments and storage temperatures on UHT whole milk. **The Australian Journal Of Dairy Technology**, v. 46, p. 57-63, 1991.

Rollema, H. S.; Poll, J. K. The alkaline milk proteinase system: Kinetics and mechanism of heatinactivation. **Milchwissenschaft**, v. 41, p. 536-540, 1986.

Saffert, A.; Pieper, G.; Jetten, J. Effect of package light transmittance on vitamin content of milk. Part 2: UHT whole milk. **Package Technology Science**, v. 21, p. 47-55, 2008.

Sarantópoulos, C. I. G. L.; Oliveira, L. M.; Padula, M.; Coltro, L.; Alves, R. M. V.; Garcia, E. E. C. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267 p.

Sattar, A.; deMan, J. M. Photooxidation of milk and milk products: A review. **Indian Journal of Dairy Bioscience**, v. 9, p. 1-7, 1975.

Saxby, M. J. Food taints and off-flavors. Glasgow, UK: Blackie Academic & Prof. p. 150-163, 1993.

Schröder, M. J. A. Effect of oxygen on the keeping quality of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 49, p. 407-424, 1982.

Shipe, W. F.; Bassette, R.; Deane, D. D.; Dunkley, W. L.; Hammond, E. G.; Harper, W. J.; Kleyn, D. H.; Morgan, M. E.; Nelson, J. H.; Scanlan, R. A. Off flavors of milk: Nomenclature, standards, and bibliography. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 855-869, 1978.

Silva, F. A. S. **Assistat - Statistical Assistance**. <<http://www.assistat.com/>>. Viewed: august 6th 2009.

Skibsted, L. H. Light induces changes in dairy products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 345, p. 4-9, 2000.

Smet, K., De Block, J.; De Campeneere, S.; De Brabander, D.; Herman, L.; Raes, K.; Dewettinck, K.; Coudijzer, K. Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 372-379, 2009.

Smet, K.; Raes, K.; De Block, J.; Herman, L.; Dewettinck, K.; Coudijzer, K. A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 520-530, 2008.

Swanson, K. M. J.; Petran, R. L.; Hanlin, J. H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes, F. P.; Ito K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. Chap.6, p.53-62.

Toba, T.; Adachi, S.; Arai, I. Sunlight and sodium hypochlorite-induced color changes in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1796-1801, 1980.

Vassila, E.; Badeka, A.; Kondyli, E.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. G. Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packaging conditions. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 715-722, 2002.

Whited, L. J.; Hammond, B. H.; Chapman, K. W.; Boor, K. J. Vitamin A degradation and light-oxidized flavor defects in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 351-354, 2002.

Wold, J. P. Understanding and measuring photooxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy. **Spectroscopy**, v. 18, p. 8-13, 2006.

Yen, G. C.; Tsai, L. C. Antimutagenicity of partially fractionated Maillard reaction products. **Food Chemistry**, v. 47, p. 11-15, 1993.

Zadow, J. G. Studies on the ultra heat treatment of milk. 2. Measurement of the products of browning reactions as influenced by processing and storage. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 25, p. 123-126, 1970.

CONCLUSÃO GERAL

- O leite UHT produzido com leite cru que foi armazenado por 3 dias a 3°C, 7,3°C e 10,3°C apresentou maior extensão de proteólise e de lipólise, quanto maior foi a temperatura de armazenamento, resultado da ação das enzimas termoresistentes de bactérias psicrótróficas ao longo de 56 dias de estocagem. Houve rejeição dos provadores na 8ª semana de estocagem dos leites UHT, independentemente do armazenamento do leite cru. Em consequência disso, o leite UHT em embalagem PEBD e protegido de luz, produzido com leite cru de boa qualidade, apresentou uma vida de prateleira de sete semanas.
- O leite UHT embalado em embalagem flexível de PEBD com 1.5% TiO₂, quando exposto à luz de intensidade de $1,920 \pm 100$ lux apresentou defeito de sabor devido à oxidação lipídica, detectável por painel de julgadores não treinado, a partir de 24 h de estocagem. Os resultados sugerem o uso de uma embalagem complementar como barreira à luz.

ANEXOS

Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética.

Andamento do projeto - CAAE - 0112.0.146.000-09				
Título do Projeto de Pesquisa				
Efeito do armazenamento refrigerado do leite cru para a qualidade e vida útil do leite longa vida de embalagem flexível				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	09/03/2009 09:42:46	01/04/2009 08:49:21		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	09/02/2009 12:59:10	Folha de Rosto	FR242276	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	09/03/2009 09:42:46	Folha de Rosto	0112.0.146.000-09	CEP
3 - Protocolo Pendente no CEP	24/03/2009 13:37:11	Folha de Rosto	153/2009	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	01/04/2009 08:49:21	Folha de Rosto	153/2009	CEP

[Voltar](#)

Anexo II - Tabela dos resultados de viscosidade aparente do leite UHT.

Tabela. Viscosidade aparente (MPa $\pm$ 0,06) do leite UHT (n=4), controle (A) e produzido com leite cru armazenado por 3 dias a: 3°C (B), 7,3°C (C) e 10,3°C (D).

Dias estocagem	Tratamentos			
	A	B	C	D
1	2,44	2,29	2,22	2,00
7	2,23	2,19	2,09	2,01
14	2,33	2,27	2,15	2,27
21	2,24	2,19	2,11	2,08
28	2,23	2,25	2,20	2,01
35	2,26	2,16	2,17	1,96
42	2,16	2,23	2,12	1,93
48	2,16	2,14	2,15	1,97
56	2,26	2,28	2,13	2,00