



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

**MARIA ELISABETE FERNANDES DIAS**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CO<sub>2</sub> AO LEITE CRU SOBRE  
AS CARACTERÍSTICAS DO LEITE UHT ARMAZENADO  
A DIFERENTES TEMPERATURAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS-UNICAMP  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PROFA. DRA. MIRNA LÚCIA GIGANTE  
ORIENTADORA**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Maria Elisabete Fernandes Dias, aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e orientada pela Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante.

---

Assinatura do Orientador

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

D543e Dias, Maria Elisabete Fernandes, 1967-  
Efeito da adição de dióxido de carbono ao leite cru sobre as características do leite UHT armazenado a diferentes temperaturas / Maria Elisabete Fernandes Dias. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of carbon dioxide addition to raw milk on the characteristics of UHT milk stored at different temperatures

Palavras-chave em inglês (Keywords):

UHT milk

Carbon dioxide

Shelf life

Proteolysis

Age gelation

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Mirna Lúcia Gigante [Orientador]

Leila Maria Spadoti

Salvador Massaguer Roig

Data da defesa: 20/12/2011

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante  
(Orientadora)

---

Dra. Leila Maria Spadoti  
(Membro Titular)

---

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto  
(Membro Titular)

---

Profa. Dra. Priscila Cristina Bizan Vianna  
(Membro Suplente)

---

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig  
(Membro Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, saúde e força nos momentos mais difíceis;

Aos meus filhos Vinícius, Lucas, Gabriel e Gustavo pela paciência e compreensão desde o início até a concretização deste trabalho;

Aos meus pais Aparecido e Thereza, pelo amor incondicional, compreensão, e grande suporte sem o qual este trabalho não teria iniciado nem finalizado;

Ao ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, em especial à Dra. Leila M. Spadoti pelo empenho no sentido de viabilizar a execução dos processamentos na planta piloto da TETRA PAK instalada no TECNOLAT- ITAL;

À TETRA PAK, em especial aos funcionários Sebastião, Márcio e Reginaldo, que muito contribuíram na realização dos processos;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA/DTA, pela oportunidade do aprimoramento profissional que certamente irá contribuir para o melhor desempenho das minhas atividades profissionais;

A minha orientadora, Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante, pelo incentivo, amizade, paciência e disponibilidade em todos os momentos vividos no laboratório e fora dele;

Aos meus mestres da área de Leite e Derivados, prof. José Sátiro de Oliveira, prof. Salvador Massaguer Roig, profa. Walkiria Hanada Viotto e profa. Mirna Lúcia Gigante que contribuíram imensamente para minha capacitação na área desde quando ingressei como funcionária da Unicamp;

A profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto, minha chefe imediata no Laboratório de Leite e Derivados da FEA, pela amizade, compreensão e paciência em todos os momentos;

Aos membros da banca examinadora, professores Leila Spadoti, Priscila Cristina Bizan Vianna, Salvador Massaguer Roig e Walkiria Hanada Viotto pelo convite aceito e pelo tempo dedicado na avaliação deste trabalho;

A profa. Flávia Maria Netto pelo apoio nas decisões sobre as metodologias de cromatografia e eletroforese;

Ao Chico, técnico do Laboratório Central Analítico do DEPAN/FEA, pela disponibilidade, paciência, atenção e dedicação durante as análises de cromatografia;

Aos meus colegas de trabalho: Adauto, Ana Maria, Alice, Ana Koon, Alessandra, Bernadete, Denir, Dirce, Leonardo, Leonel, Luciana, Marlene, Roberto, Renata, Rosana, Renato, Tania, Eliana (Depan), e Erenice que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho;

A Diana, técnica do laboratório de microbiologia, pela dedicação e cuidados nas análises microbiológicas;

A minha amiga Ana Lourdes pela grande amizade, pelo incentivo, contribuição e troca de experiências durante a realização deste trabalho;

Aos alunos de pós-graduação que trabalharam no Laboratório de Leite durante o período de realização deste trabalho, meu agradecimento pela paciência, dedicação e compreensão em todos os momentos;

A Clarice Gebara, pelo incentivo no exame de seleção, pelo apoio, dedicação e paciência de explicar o que me parecia inexplicável;

A Karina Chaves e Cecília Ribeiro, alunas e amigas que contribuíram imensamente na análise estatística dos dados;

A Priscila Vianna, que muito me incentivou no ingresso e na realização deste trabalho, sempre disposta e pronta para tudo;

A todos os meus amigos e familiares que me incentivaram para que eu pudesse chegar ao fim desta jornada.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1. Qualidade do leite cru.....	3
3.2.Utilização de dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) em leite fluido.....	5
3.3.O leite UHT.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1.Recepção e Processamento.....	14
4.2. Amostragem e análises realizadas.....	18
4.2.1. Determinações físico-químicas.....	19
4.2.2. Determinações microbiológicas.....	23
4.3. Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Efeito da adição de CO <sub>2</sub> sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru.....	24
5.2. Efeito da adição de CO <sub>2</sub> ao leite cru sobre as características físico-químicas do leite UHT.....	26
5.3.Efeito da adição de CO <sub>2</sub> ao leite cru, da temperatura e do tempo de armazenamento sobre as características do leite UHT.....	28
6.CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
8. ANEXOS.....	47

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru sobre as características do leite UHT obtido por injeção direta de vapor e armazenamento a 25°C, 35°C e 45°C por 180 dias. O leite cru (250 litros) foi dividido em duas porções que foram armazenadas em tanques de expansão a 4±1°C por seis dias. Uma porção foi adicionada de CO<sub>2</sub> grau alimentício até que o pH do leite atingisse 6,20, enquanto a outra serviu de controle. O leite cru foi avaliado quanto ao pH, acidez, prova do álcool, composição físico-química, proteólise, lipólise, cor e concentração de CO<sub>2</sub> após a injeção. Para caracterização microbiológica, o leite cru foi avaliado quanto à contagem padrão em placas e de micro-organismos psicotróficos no dia da recepção e após seis dias de armazenamento refrigerado. As amostras foram submetidas ao tratamento UHT por injeção direta de vapor (143°C/4s), envasadas em embalagens *tetra brik aseptic* de 125 ml e armazenadas em BOD a 25, 35 e 45 °C por 180 dias. No dia seguinte, as amostras foram avaliadas quanto as mesmas características do leite cru, além da prova do álcool, viscosidade, sedimentação, eletroforese, peptídeos por HPLC e esterilidade comercial. Após 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento, as amostras foram avaliadas quanto ao pH, acidez, nitrogênio e frações nitrogenadas, cor, ácidos graxos livres, sedimentação, viscosidade, eletroforese e peptídeos por HPLC. O delineamento experimental foi o de sub-sub-parcelas divididas e o experimento foi repetido três vezes. O efeito do tratamento, da temperatura e do tempo de armazenamento, e a interação destes fatores sobre as características do leite UHT foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Após seis dias de armazenamento refrigerado, não houve diferença significativa nas características físico-químicas do leite adicionado ou não de CO<sub>2</sub>, exceto na quantidade de ácido graxos livres que foi maior no leite controle do que no adicionado de CO<sub>2</sub>. A adição de CO<sub>2</sub> inibiu o desenvolvimento de micro-organismos durante o armazenamento refrigerado, uma vez que a contagem total e de psicotróficos do leite controle foi maior que as contagens do leite adicionado de CO<sub>2</sub>. O pH das amostras de leite UHT armazenadas a diferentes temperaturas foi afetado pela temperatura e pelo tempo de armazenamento, apresentando maior decréscimo do pH nas amostras armazenadas a 45 °C. A cor das amostras a 25°C não apresentou escurecimento durante os 180 dias, enquanto as armazenadas a 35°C e 45°C apresentaram desenvolvimento de cor visível a olho nu e aumento no valor b\* ao longo do tempo. A lipólise do leite UHT foi maior nas amostras armazenadas a 45°C. A proteólise foi maior no leite armazenado a 45°C, cujo aumento

não refletiu na viscosidade e sedimentação do leite, que não foram significativamente afetados até o 120° dia de armazenamento, prazo de validade usualmente garantido pelas indústrias de processamento de leite UHT no Brasil.

Palavras-chave: leite UHT, dióxido de carbono, vida de prateleira, proteólise, gelificação.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on the characteristics of UHT milk obtained by direct steam injection and stored at 25 ° C, 35 ° C and 45 ° C for 180 days. Raw milk (250 liters) was divided in two portions that were stored in bulk tanks at 4 ± 1 ° C for six days. To one portion was added food grade CO<sub>2</sub> until the pH of milk was 6.20, while the other portion was the control sample. Raw milk was evaluated for pH, acidity, physicochemical composition, proteolysis, lipolysis, color and concentration of CO<sub>2</sub> after injection. Raw milk was evaluated for standard plate count and psychrotrophic micro-organisms on the reception and after six days of cold storage, for microbiological characteristics. The samples were submitted to UHT treatment by direct steam injection (143°C/4s), packed in 125 ml *Tetra Brik Aseptic* packing and stored in BOD at 25, 35 and 45 ° C for 180 days. One day after processing, the samples were evaluated for the same characteristics of raw milk, plus alcohol stability, viscosity, sedimentation, electrophoresis, peptides by HPLC and commercial sterility. After 1, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days of storage, samples were evaluated for pH, acidity, nitrogen and nitrogen fractions, color, free fatty acids, sedimentation, viscosity, electrophoresis and peptides by HPLC. The experimental design was split-split-plot and the complete experiment was repeated three times. The effect of treatment, temperature and storage period as well as the interaction of these factors on the characteristics of UHT milk was assessed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at 5% significance level. After six days of cold storage, there was no significant difference in the physicochemical characteristics of raw milk with or without CO<sub>2</sub> addition, except for free fatty acid values, which were higher for the milk without CO<sub>2</sub> addition. The addition of CO<sub>2</sub> inhibited the development of microorganisms during storage, since the standard plate count and psychrotrophic count of milk control was higher than values for the CO<sub>2</sub> added milk. The pH of UHT milk samples was affected by temperature and storage time, showing greater decrease in pH for samples stored at 45°C. The color of the samples at 25°C showed no browning during the 180 days, while those stored at 35 ° C and 45 ° C showed brown color visible to the naked eye and an increased b \* value over time. Lipolysis of UHT milk samples was higher for samples stored at 45°C. The proteolysis was higher in milk stored at 45°C, whose increase was not reflected in viscosity and sedimentation of the milk, since these parameters were not significantly affected during 120 days-storage, period of shelf life usually guaranteed by the processing industries of UHT milk in Brazil.

Keywords: UHT milk, carbon dioxide, shelf life, proteolysis, age gelation.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Embrapa (2008), a participação do leite UHT foi de aproximadamente 76% do total de leite fluido comercializado no Brasil em 2008 e, embora diversos fatores tenham impulsionado sua produção e comercialização desde a década de 80, certamente a facilidade de armazenamento e a praticidade de uso foram fatores decisivos na preferência do consumidor.

O processamento UHT envolve o aquecimento do leite a temperaturas de 130-150°C por 2-4 segundos, resfriamento rápido e envase asséptico do leite em embalagens estéreis hermeticamente fechadas. O tratamento UHT deve ser suficiente para se obter um produto comercialmente estéril, ou seja, no qual o crescimento bacteriano não ocorra sob condições normais de estocagem. Entretanto, alterações físico-químicas costumam limitar a vida de prateleira do leite UHT, que é normalmente de quatro meses para a maioria dos produtos disponíveis no mercado brasileiro.

As principais alterações durante o armazenamento do leite incluem escurecimento do produto causado pela reação de Maillard que é dependente do tratamento térmico e da temperatura de estocagem, ligeiro abaixamento de pH, também dependente da temperatura e causado pela formação de ácidos na reação de Maillard, precipitação de fosfato de cálcio, diminuição da estabilidade das proteínas ao etanol, separação de gordura, sedimentação e aumento da viscosidade do produto com eventual perda de fluidez podendo levar à gelificação.

Embora o mecanismo de gelificação não seja ainda completamente conhecido, diversas pesquisas indicam que o fator iniciante seja a hidrólise da caseína, causada tanto pela ação da plasmina como por enzimas microbianas termorresistentes. Alguns autores chegam a sugerir que a plasmina, enzima natural do leite, possa ser a responsável pela gelificação do leite UHT produzido com leite cru de boa qualidade, enquanto as proteases termorresistentes produzidas por micro-organismos psicotróficos possam ser as causadoras da gelificação no caso de leite cru de baixa qualidade.

Além disso, a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas de psicotróficos no leite UHT causa defeitos sensoriais, como o sabor amargo produzido pela liberação de peptídeos hidrofóbicos e o sabor e odor de ranço causado pelo aumento dos níveis de ácidos graxos livres de cadeia curta.

Desta forma, a qualidade microbiológica do leite cru antes do processamento, definida principalmente pelas condições higiênicas da ordenha e de tempo e temperatura de

armazenamento do leite cru, pode afetar diretamente a vida de prateleira e a conservação do leite UHT. Outros fatores como processamento UHT direto ou indireto, bem como a temperatura de estocagem do leite também afetam a conservação do produto.

A refrigeração é o método mais eficiente e universalmente aceito para manter a qualidade do leite cru antes do processamento. Através da refrigeração controla-se o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos causadores da acidificação do leite. Entretanto, dependendo das condições de refrigeração e tempo de armazenamento, pode-se favorecer o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos que produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que prejudicam a qualidade do leite e dos produtos processados. No Brasil, o leite cru é refrigerado nas fazendas a 7°C, podendo ser transportado a cada dois dias para a indústria de processamento. Se obtido e transportado em condições adequadas e processado em seguida pela indústria, o leite cru não costuma apresentar problemas durante sua vida útil. Entretanto, essa não é a realidade na indústria brasileira. O mercado de leite cru entre centros produtores e processadores (mercado *spot*) é cada vez mais intenso e, em função das longas distâncias a serem percorridas, o leite pode ser processado 5-7 dias após a ordenha e armazenamento refrigerado, condição que favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos. Alguns estudos indicam que o leite cru para processamento UHT no Brasil tem apresentado altas contagens tanto de micro-organismos mesófilos como psicotróficos. Desta forma, métodos para controlar o desenvolvimento de micro-organismos, especialmente psicotróficos, são de interesse da indústria láctea porque viabilizam o armazenamento do leite cru por maior tempo sem perdas de qualidade para os produtos processados.

A adição de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) tem se apresentado como um método eficaz para controlar o desenvolvimento microbiano no leite cru refrigerado, o que viabiliza, conseqüentemente, o processamento de uma matéria prima de melhor qualidade, mesmo após armazenamento refrigerado por um período maior de tempo. A ação antimicrobiana do CO<sub>2</sub> é proporcional à sua concentração e seu efeito inibitório sobre os micro-organismos depende da temperatura, acidez, atividade de água, tipo e fase de desenvolvimento do micro-organismo. O foco geral desse trabalho é avaliar o efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru, como uma forma de preservar sua qualidade antes do processamento, sobre as características do leite UHT durante seu armazenamento a diferentes temperaturas.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características do leite UHT obtido por injeção direta de vapor, a partir de leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub>, durante o armazenamento a 25°C, 35°C e 45°C.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Qualidade do leite cru

O leite bovino é um meio adequado para a multiplicação acelerada de uma ampla variedade de micro-organismos, pois a presença de carboidratos, proteínas e gorduras combinados com o pH próximo da neutralidade favorecem o desenvolvimento da microbiota (HAYES, BOOR, 2001).

O armazenamento refrigerado do leite cru minimiza o problema de desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, que crescem a temperaturas de 25-35°C, causando a acidificação do leite através da fermentação da lactose. Entretanto, a baixa temperatura favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos, que embora sejam destruídos durante o tratamento térmico, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que não são inativadas nos tratamentos usuais da indústria láctea (MUIR, 1996; SANTOS, FONSECA, 2001; SØRHAUG, STEPANIAK, 1997).

Os micro-organismos psicrotróficos presentes no leite cru são bactérias gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, e gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Suhren (1989) afirma que entre os micro-organismos psicrotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite refrigerado é *Pseudomonas*, sendo as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as relevantes na diminuição da qualidade do leite fluido e demais derivados lácteos. No leite cru refrigerado, a espécie *P. fluorescens* é predominante sobre as demais (ENEROTH *et al.*, 2000). O gênero *Pseudomonas spp* representa cerca de 10% da microbiota total do leite recém ordenhado, mas torna-se o gênero predominante em leite mantido sob refrigeração (MUIR, 1996).

Com a implantação em 1998 do PNQL, Programa Nacional de Qualidade do Leite, o Brasil começou a empregar esforços para garantir a qualidade do leite em toda cadeia produtiva.

Este esforço resultou na publicação da Instrução Normativa N°51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), através da qual, entre outras medidas, foi estabelecida a obrigatoriedade do resfriamento do leite nas propriedades rurais, que trouxe como consequência o aumento do tempo entre a ordenha e a chegada do leite nos estabelecimentos processadores.

Os principais pontos de contaminação de micro-organismos psicrotróficos são os latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos, utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente. Assim, os procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite são pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade. Pinto *et al.* (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru e detectaram contagens de psicrotróficos superiores a 10% da contagem de mesófilos em amostras coletadas em tanques de refrigeração individuais, coletivos e no silo industrial de uma indústria processadora de leite UHT. Os autores concluíram que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração não foram adequadas para minimizar a contaminação microbiana e o desenvolvimento de psicrotróficos.

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

A produção de proteases de psicrotróficos em amostras de leite cru armazenadas a 2°C, 4°C e 7°C por 10 dias foi avaliada por Haryani *et al.* (2003). Os autores observaram o aumento das contagens de psicrotróficos em todas as amostras, porém as contagens bacterianas foram significativamente maiores nas amostras armazenadas a 7°C por 10 dias, porém pouca proteólise ocorreu no leite armazenado a 2°C no mesmo período. As amostras armazenadas a 2°C, 4°C e 7°C apresentaram proteólise significativa após 6, 4 e 2 dias respectivamente. Esses resultados indicam que o leite deve ser armazenado pelo menor tempo na mais baixa temperatura para a prevenção de desenvolvimento de psicrotróficos e, conseqüentemente, da produção de proteases.

Celestino *et al.* (1996) avaliaram o efeito do armazenamento refrigerado (4°C/48 horas) sobre a qualidade do leite cru. Os autores observaram um aumento de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos, o que afetou a proteólise e lipólise do leite. A proporção de psicotróficos comparados à contagem de mesófilos aumentou de 47% para 80% após 2 dias. Os autores também observaram uma maior concentração de ácidos graxos livres e menor pH no leite armazenado, resultado de sua maior ação enzimática e bacteriana quando comparado ao leite fresco.

Guinot-Thomas *et al.* (1995) estudaram o efeito das enzimas microbianas sobre a proteólise ocorrida durante a estocagem do leite cru a 4°C. Amostras de leite foram submetidas a 4 tratamentos: a) amostra controle, b) amostra com uroquinase, inibidor de ativação de plasmina, c) amostra adicionada de bacteriocina, inibidor de crescimento microbiano e d) amostra adicionada de uroquinase e bacteriocina. A partir do 4º dia de estocagem houve maior proteólise nas amostras não adicionadas de bacteriocina, demonstrando que nestas condições (4°C por mais de 4 dias) a ação de enzimas microbianas possui maior importância na proteólise do que a plasmina.

De forma geral, a literatura evidencia que a melhor condição para conservação do leite cru de boa qualidade é a utilização de baixas temperaturas pelo menor tempo. No entanto, esta não é normalmente a condição observada na escala de produção nacional.

### **3.2. Utilização de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em leite fluido**

Dentre as pesquisas conduzidas para minimizar o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos e suas consequências para o leite e os produtos lácteos aparece o uso do dióxido de carbono, que tem sido explorado. Diversos autores (DANIELS *et al.*, 1985; DIXON, KELL, 1989; SPIE, MADDEN, 1997; KING, MABBITT, 1982; ROBERTS, TORREY, 1988) demonstraram que, quando dissolvido em meio aquoso, o CO<sub>2</sub> pode retardar o desenvolvimento de psicotróficos.

Os mecanismos de inibição pelo qual o CO<sub>2</sub> afeta o desenvolvimento e metabolismo microbiano ainda não foram totalmente esclarecidos, mas algumas teorias foram propostas e resumidas nos trabalhos de Loss e Hotchkiss (2000) e Hotchkiss *et al.* (2006):

1. Substituição do O<sub>2</sub> pelo CO<sub>2</sub>, desfavorecendo o desenvolvimento de micro-organismos aeróbicos;

2. Diminuição do pH do meio devido à dissolução do CO<sub>2</sub> e formação de ácido carbônico na fase aquosa do alimento;
3. Efeito direto no metabolismo dos micro-organismos. Uma vez que o CO<sub>2</sub> é lipossolúvel, ele se dissolve na camada lipídica da membrana celular e passa através dela, concentrando-se no citoplasma, causando a diminuição do pH intracelular e o *stress* da célula.

King e Mabbitt (1982) observaram que a adição de 1300 ppm de CO<sub>2</sub> em leite cru armazenado a 10°C reduziu a taxa de crescimento de psicrotróficos e aumentou em 2,5 dias a vida de prateleira do produto. Resultados semelhantes foram obtidos por Roberts e Torrey (1988) em leite cru armazenado a 7°C por 6 dias.

Martin *et al.* (2003) examinaram os efeitos de diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> (30, 680, 1200, 1700 ppm) em leite cru armazenado a 15°C sobre o desenvolvimento microbiano, que foi significativamente inibido na presença de CO<sub>2</sub>. O dióxido de carbono influenciou as fases lag, log e estacionária e os resultados indicaram que o efeito inibitório provavelmente seria maior em temperaturas de armazenamento mais baixas.

Ma *et al.* (2001) avaliaram o impacto da adição de CO<sub>2</sub> (1000 ppm) sobre os resultados de análises físico-químicas de rotina. Estes pesquisadores observaram uma diminuição do ponto de congelamento e do pH com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, parâmetros que foram restabelecidos após a remoção do gás por agitação e aquecimento a 38°C. No entanto, testes de antibióticos, composição por infravermelho, fosfatase alcalina, caseínas, proteínas do soro, monossacarídeos livres, ácidos orgânicos e vitaminas lipossolúveis não foram afetados pelo tratamento do leite.

A inibição do desenvolvimento de psicrotróficos diminui a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e, conseqüentemente, causa menor lipólise e proteólise conforme demonstrado por Ma *et al.* (2003). Estes autores observaram que a adição de 1500 ppm de CO<sub>2</sub> em leite cru armazenado por 21 dias a 4°C inibiu o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos e diminuiu a proteólise e lipólise ao longo do armazenamento refrigerado. A menor proteólise e lipólise foi atribuída à redução da produção de enzimas pelos micro-organismos.

As pesquisas demonstram que a adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru refrigerado diminui o desenvolvimento microbiano e prolonga a vida de prateleira do leite, portanto danos causados por enzimas proteolíticas e lipolíticas de psicrotróficos podem ser evitados.

### 3.3. O leite UHT

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

O processamento de leite UHT tem apresentado grande potencial de crescimento nos países tropicais, devido às altas temperaturas e a distribuição refrigerada limitada nestes países (GOFF, 2008). Tendências mundiais para o leite UHT têm mostrado um aumento da demanda de consumo e uma previsão global de mercado crescente para 2013, tanto em número de embalagens como em volume de leite comercializado (HARRINGTON, 2009).

Segundo uma pesquisa publicada em 2008 na revista *Global Aseptic Packing*, a previsão de consumo de leite UHT no mundo deve aumentar de 86 bilhões de litros em 2008 para 113 bilhões de litros em 2013, correspondendo a um aumento de 31%. As vantagens do processo UHT incluem o aumento da vida de prateleira, menores custos de energia e a eliminação da refrigeração durante a estocagem e distribuição. Mudanças desejáveis ocorrem durante o processamento do leite UHT, como a destruição de micro-organismos e inativação de enzimas, porém mudanças indesejáveis como escurecimento, perda de nutrientes, sedimentação, separação de gordura e sabor cozido também podem ocorrer com maior ou menor intensidade. O principal desafio na produção de leite UHT é a obtenção de um tratamento térmico eficiente com mínimas mudanças no sabor (CHAVAN *et al.*, 2011).

A estabilidade das proteínas do leite UHT ao etanol decresce com o tempo de estocagem, uma vez que estas proteínas passam por diversas alterações que levam à coagulação do leite.



Dentre estas alterações incluem-se a proteólise e uma progressiva perda de estabilidade que favorece a agregação das micelas de caseína (SAMEL *et al.*, 1971).

No que diz respeito à qualidade do leite cru, a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas de psicotróficos causa defeitos sensoriais como o sabor amargo no leite UHT produzido pela liberação de peptídeos hidrofóbicos e sabor e odor de ranço causado pelo aumento dos níveis de ácidos graxos livres de cadeia curta (DATTA, DEETH, 2003). Enright *et al.* (1999) estudaram as propriedades físico-químicas, proteólise e estabilidade de leite cru e leite UHT e comprovaram extensiva proteólise durante a estocagem do leite cru com evidências de atividade proteolítica derivada de enzimas de psicotróficos. Os autores também sugerem que a atividade da plasmina tem a maior influencia na proteólise que ocorre durante a estocagem de leite UHT.

Conforme Lopez-Fandino e Olano (1999), enzimas termoestáveis residuais podem causar sérios defeitos de estocagem e as atividades lipolítica e proteolítica e o grau de degradação de proteínas e lipídios são parâmetros úteis na estimativa da vida de prateleira do leite UHT.

Entretanto, o principal problema que afeta a qualidade e limita a vida de prateleira do leite UHT é o fenômeno da gelificação, que causa o aumento da viscosidade durante o armazenamento e, eventualmente, a perda de fluidez com formação de um gel (DATTA, DEETH, 2001; FOX, McSWEENEY, 1998; MANZI, PIZZOFERRATO, 2006).

A gelificação do leite UHT pode ser causada pela proteólise através da ação da plasmina ou de enzimas proteolíticas de bactérias psicotróficas presentes no leite cru que provocam a agregação das micelas de caseína durante o armazenamento, formando um gel. (FOX, McSWEENEY, 1998). Em linhas gerais, observa-se que a proteólise causada pela plasmina resulta principalmente da hidrólise da  $\beta$ -caseína, formando  $\gamma$ -caseína e proteose peptona. Já a proteólise causada pelas proteases de psicotróficos, da mesma forma que a quimosina, atacam predominantemente a  $\kappa$ -caseína na ligação 105-106 seguida por uma intensa hidrólise não específica (DATTA, DEETH, 2003; MANZI, PIZZOFERRATO, 2006; MUIR, 1996; SØRHAUG, STEPANIAK, 1997).

A desnaturação das proteínas do soro durante o tratamento térmico UHT, especialmente da  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), e sua interação com  $\kappa$ -caseína ( $\kappa$ -CN) através de pontes dissulfeto levam a formação do complexo  $\beta$ -Lg- $\kappa$ -CN. A liberação desse complexo  $\beta$ -Lg- $\kappa$ -CN da micela, que se dá pela ação de enzimas proteolíticas, é considerado o principal fator que leva ao início do processo de gelificação. Estes complexos se acumulam na fase soro e, supostamente, quando a concentração de proteína na fase soro alcança um limite crítico, iniciam-se novas interações

protéicas que levam inicialmente ao aumento da viscosidade do leite e, eventualmente, à gelificação. Esse processo pode ser acelerado ou retardado em função da qualidade da matéria prima, das condições de processamento e armazenamento do leite UHT (DATTA, DEETH, 2001).

Donato e Guyomarc'h (2009) sugerem que o complexo  $\beta$ -Lg- $\kappa$ -CN confere novas propriedades às micelas de caseína, através da mudança em sua superfície, aumentando as forças de atração e repulsão entre as interações, ou ainda como espaçadores que ligam as micelas e sustentam a micro-estrutura do gel.

Datta e Deeth (2003) avaliaram a proteólise durante o armazenamento do leite UHT e observaram que os peptídeos produzidos por ação das enzimas de psicotróficos são menos hidrofóbicos, portanto eluem primeiro na cromatografia HPLC-RP quando comparados com os peptídeos produzidos pela plasmina.

A evolução da proteólise e da viscosidade aparente de leite UHT foi estudada por Vidal-Martins *et al.* (2005) durante 120 dias de vida de prateleira. A contagem de psicotróficos no leite cru também foi avaliada e alcançou níveis médios de  $4,4 \times 10^7$  a  $2,0 \times 10^9$  ufc/mL dependendo do mês em que as amostras foram coletadas. Os autores observaram um aumento no índice proteolítico e na viscosidade aparente tanto no período de armazenamento, quanto após os 60 dias de estocagem, fato que foi relacionado à presença de proteases produzidas por psicotróficos do leite cru.

O efeito da qualidade do leite cru na proteólise do leite UHT durante 180 dias de armazenamento a 25°C foi investigado por Topçu *et al.* (2006), que encontraram altos níveis de proteólise no leite com alta contagem de psicotróficos levando à gelificação, formação de sedimentos e de sabor amargo. A proteólise neste leite foi atribuída tanto a proteases bacterianas quanto à plasmina.

No que diz respeito ao processo de fabricação, o aquecimento utilizado para atingir a temperatura de esterilização no processamento UHT pode ser direto (através da injeção de vapor direto ao leite ou da infusão, pulverização do leite numa câmara com vapor) ou indireto através de trocadores de calor (DATTA *et al.*, 2002).

O tratamento térmico do leite causa uma série de transformações nos seus constituintes. Em uma primeira etapa ocorre a desnaturação, a degradação e a inativação das proteínas do soro, enzimas e vitaminas. Na segunda etapa, ocorre a formação de lactulose, HMF, furosina e outros compostos que não são detectados no leite cru (MORALES *et al.*, 2000).

A estabilidade do leite refere-se a sua capacidade de suportar o alto tratamento térmico sem coagular ou gelificar. Soluções para melhorar a estabilidade ao calor incluem o pré-aquecimento do produto na linha UHT e adição de fosfatos, entre outros (SINGH, 2004).

O processamento térmico direto oferece menores mudanças químicas quando comparado ao tratamento térmico indireto. Características de sabor, acidez, inativação de enzimas e perda de vitaminas apresentam alterações menos ou mais acentuadas conforme a intensidade do tratamento térmico (ELLIOT *et al.*, 2003).

O tratamento térmico tem pouca influência nos sais do leite, com exceção dos carbonatos que se apresentam como dióxido de carbono que é eliminado durante o aquecimento e como fosfato de cálcio, cuja solubilidade diminui com o aumento da temperatura. No aquecimento, o fosfato de cálcio solúvel precipita sobre as micelas de caseína, com uma diminuição simultânea na concentração de íons cálcio e no pH do leite (CHAVAN *et al.* 2011).

A seção de resfriamento difere no tratamento direto e indireto: plantas de aquecimento direto utilizam câmara de vácuo enquanto que plantas de aquecimento indireto utilizam trocadores de calor a placas. Nas plantas de aquecimento indireto, o leite é pré-aquecido a 80-90°C por 15 segundos a fim de desnaturar as proteínas do soro, especialmente a  $\beta$ -lactoglobulina, uma vez que desnaturada ela não se deposita nas superfícies quentes da seção de aquecimento. Esta estabilização não é necessária em plantas de injeção direta de vapor devido à ausência de superfícies quentes em contato direto com o leite. No processo de injeção direta de vapor, o vapor superaquecido é injetado ao leite seguido de uma elevação instantânea da temperatura através da transferência de calor latente de vaporização para o leite, seguido de um resfriamento instantâneo em câmara de vácuo e, eventualmente, de um resfriamento adicional indireto até atingir a temperatura de envase (DATTA *et al.*, 2002).

O processo de esterilização indireto utiliza trocadores de calor a placas ou tubulares. A transferência de calor ocorre através do contato do leite com a superfície metálica que está aquecida por vapor ou água. As etapas de aquecimento e resfriamento do leite esterilizado em plantas indiretas são muito mais lentas que no processo de injeção direta de vapor ao leite, portanto leites submetidos a tratamentos indiretos estão expostos a uma carga maior de calor quando comparados a leites processados em plantas de injeção direta, com eficiência semelhante em relação à destruição de micro-organismos (DATTA *et al.*, 2002).

Segundo Datta *et al.* (2002), sistemas UHT que combinam a injeção direta de vapor com aquecimento indireto tem demonstrado resultados positivos. Entre as principais vantagens, estão

a maior taxa de regeneração de calor e as pequenas alterações sensoriais no produto final. No sistema combinado, o pré-aquecimento indireto atinge cerca de 120°C, quando comparado com os sistemas convencionais que operam com temperaturas próximas de 80 a 90°C. A etapa de maior aquecimento (>120°C) permite atingir temperaturas acima de 150°C sem grandes alterações químicas no produto, permitindo a inativação de esporos termorresistentes como, por exemplo, esporos do *Bacillus sporothermodurans*. Nesta etapa, o aquecimento ocorre através da infusão ou injeção de vapor ao leite, cuja principal diferença é a sequência na qual o produto é aquecido e resfriado. No processo por infusão de vapor, a câmara de vácuo está localizada logo após a seção de pré-aquecimento (95°C), que removerá uma quantidade de água equivalente a que será adicionada posteriormente na etapa de esterilização direta. Como consequência, todo o calor do leite após a esterilização participa da seção de regeneração através dos trocadores de calor. Já no processo por injeção de vapor, a câmara de vácuo está localizada após a etapa de resfriamento e tem a finalidade de resfriar o produto e remover a água que foi adicionada durante a etapa de aquecimento direto.

Manji *et al.* (1986) compararam o efeito do aquecimento direto ou indireto na esterilização de leite quanto à sua gelificação. O leite esterilizado por injeção direta de vapor tende a gelificar mais rapidamente do que o leite tratado por métodos indiretos de esterilização. Os pesquisadores atribuíram a maior susceptibilidade de gelificação do leite esterilizado por processo de injeção direta de vapor (comparado com o sistema indireto) à maior atividade da plasmina e plasminogênio, porém não encontraram correlação entre a vida de prateleira e a extensão da proteólise em leite submetido ao tratamento direto.

McKellar *et al.* (1984) observaram a gelificação de leite UHT entre 6 a 10 semanas de armazenamento a 20°C para o leite submetido ao tratamento térmico direto, porém não foi observada gelificação em leite submetido à esterilização pelo processo indireto no período de 30 semanas a 20°C.

Segundo alguns autores (MANJI *et al.*, 1986; McKELLAR *et al.*, 1984), a maior estabilidade de leite UHT obtido por processo indireto deve-se ao fato de que a exposição do leite ao calor por um período mais elevado aumenta a estabilidade das micelas de caseína. A resistência à gelificação de leites tratados pelo método indireto de esterilização deve-se a maior desnaturação das proteínas do soro. Amostras de leite com 28% de desnaturação protéica do soro apresentaram gelificação após 115 dias enquanto que amostras com 66% de desnaturação

protéica apresentaram gelificação após 150 dias. A formação de complexos entre as proteínas do soro e as caseínas exerce papel importante no processo de gelificação.

Estudos recentes (KETHIREDDIPALLI *et al*, 2010) mostram que o pH do leite durante o tratamento térmico é fundamental no controle da desnaturação das proteínas do soro e, conseqüentemente, na possibilidade de formar complexos com a  $\kappa$ -caseína, uma vez que a pH 6,3 ocorreu maior complexação das proteínas do soro (82,2%) quando comparado com um pH 6,7 e 7,1 que apresentaram 30% e 0-5% de complexação das proteínas do soro, respectivamente .

Segundo McMahon (1996), quanto mais severo o tratamento térmico, maior o tempo para gelificação devido ao reforço das ligações cruzadas entre as micelas. Como consequência, a dissociação do complexo  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína torna-se mais lenta, uma vez que ele está mais fortemente ligado à micela.

A gelificação de leite esterilizado por aquecimento indireto pode ser inibida pelo menor índice de proteólise durante a estocagem. A ação de proteinases, tanto da plasmina quanto de bactérias psicrotróficas, contribui para o enfraquecimento do complexo  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína, levando à gelificação do leite (DATTA *et al*, 2002).

A gelificação pode ocorrer mais facilmente em leites armazenados à temperatura ambiente (20-25°C) quando comparados a leites armazenados a temperaturas menores (4°C) ou a mais elevadas (35-40°C). A menor gelificação em amostras submetidas a altas temperaturas conflita com o conceito de que a proteólise é o iniciador da gelificação, uma vez que na maior temperatura observa-se maior proteólise. No entanto, a ausência de gelificação pode ser devido à maior degradação das proteínas que são incapazes de formar uma matriz estável na gelificação (DATTA *et al*, 2002).

Outro fator que pode influenciar as características do leite UHT é a temperatura de estocagem, que afeta o pH, a cor, podendo causar sua gelificação. Al-Saadi e Deeth (2008) estudaram as mudanças no pH e na cor durante o armazenamento de leite UHT por 12 semanas. O pH das amostras estocadas nas temperaturas de 45°C, 37°C, 20°C e 5°C foram 6,35, 6,43, 6,50, 6,56, respectivamente. Este decréscimo nos valores de pH pode ser atribuído à formação de ácidos durante a reação de Maillard (ANDREWS, 1970), à desfosforilação das caseínas fosforiladas ou à liberação de íons  $H^+$  durante as interações proteína-proteína (VENKATACHALAM *et al*, 1993). A cor das amostras armazenadas a 45°C, 37°C, 20°C e 5°C variou ao longo do tempo, sendo que a extensão do escurecimento, indicada por valores de  $b^*$ , foi maior com o aumento de tempo e temperatura de armazenamento. As amostras armazenadas a

20°C e 5°C não apresentaram desenvolvimento de cor visível a olho nu, porém apresentaram aumento nos valores de  $b^*$  ao longo do tempo. O escurecimento durante a estocagem é causado pela reação de Maillard, iniciada pelas reações entre a lactose e os amino-grupos dos resíduos de lisina da proteína, levando posteriormente à formação de melanoidinas (compostos de cor marrom) no leite durante seu armazenamento (AL-SAAD, DEETH, 2008).

Samel *et al.* (1971) sugerem que na maior temperatura, a qual favorece a reação de Maillard, os compostos formados possam inibir a agregação das proteínas. A gelificação a 37°C pode ser inibida se a proteína que participaria da formação do gel estiver bloqueada pelas interações caseína-lactose, envolvendo resíduos de lisina. Estas interações precedem o escurecimento no leite UHT armazenado a temperaturas superiores a 30°C. Esta hipótese é sustentada por Hill e Cracker (1968), que observaram que quando resíduos da lisina e da arginina das moléculas de  $\kappa$ -caseína estão bloqueados, há uma menor atividade da renina na coagulação enzimática, indicando que o escurecimento por Maillard pode levar a uma inibição da hidrólise de  $\kappa$ -caseína.

Além do sistema UHT convencional por injeção direta de vapor (DSI, *Standard Direct Steam Injection*), Van Asselt *et al.* (2008) estudaram a aplicação de tecnologia recente de injeção de vapor ao leite através do sistema ISI, *Innovative Steam Injection*. Este processo permite rápido aquecimento (menos que 0,2s de tempo de retenção) e altas temperaturas (150 a 180°C). O leite é bombeado através de um tubo com uma saída estreita (1 a 2 mm). A parede do tubo contém pequenas aberturas através das quais o vapor é injetado com alta pressão, possibilitando aquecimento muito rápido do produto, permitindo que o leite seja aquecido a 80°C (com tempos de retenção diferentes) antes ou após o tratamento térmico. Após o aquecimento, o produto é instantaneamente resfriado através de *flash cooling*. Este processo permite produzir leite com vida de prateleira estendida com menor degradação da  $\beta$ -lactoglobulina (<50%) quando comparado com os processos UHT convencionais, além de melhorar as características de sabor do leite tratado termicamente.

A sedimentação é um fenômeno indesejável que ocorre durante a vida de prateleira do leite UHT. O tratamento térmico ao qual o leite é submetido cria agregados de proteína desnaturada, gordura, lactose e sais inorgânicos. A quantidade de sedimentos depende de vários fatores como qualidade do leite cru, tipo e intensidade do tratamento térmico, pressão de homogeneização e temperatura de estocagem, podendo ocorrer imediatamente após o processamento ou durante a vida de prateleira. Geralmente o processamento térmico direto

apresenta maior sedimentação que o processo indireto, fato que pode ser atribuído à ausência de uma superfície quente disponível no processo direto para ocorrer o depósito do sedimento, conseqüentemente a sedimentação ocorre durante o armazenamento do leite UHT (DATTA *et al.*, 2002).

O uso de aditivos para assegurar a estabilidade térmica do leite submetido a tratamentos térmicos mais severos é usual na indústria de processamento de leite UHT (SILVA, 2004). A adição de citrato de sódio ou fosfato de sódio acelera a gelificação do leite UHT, enquanto que o uso de polifosfatos retarda a formação de gel. Em estudo conduzido por Kocak e Zadow e citado por Datta e Deeth (2001), a gelificação ocorreu em amostras adicionadas de citrato de sódio após 7-10 semanas de armazenamento, sendo que amostras contendo 1% de citrato de sódio adicionado gelificaram mais rapidamente que amostras contendo 0,03%. Em outro estudo dos mesmos pesquisadores, observou-se que amostras de leite adicionadas de 0,3% de EDTA gelificaram no mesmo período que amostras controle não adicionadas de aditivo, enquanto que amostras adicionadas de 0,1% de EDTA apresentaram processo de gelificação acelerado. O efeito do citrato de sódio e do EDTA em relação à gelificação não é claro. Aparentemente, os citratos estabilizam a estrutura da micela de caseína, pois fortalecem as ligações de fosfato de cálcio coloidal. No entanto, próximo à gelificação, a agregação de micelas de caseína desestabilizadas pode ser acelerada pelas ligações de fosfato de cálcio coloidal envolvendo os íons citrato. Não há evidências similares da participação de complexos de EDTA com as micelas de caseína (DATTA e DEETH, 2001).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

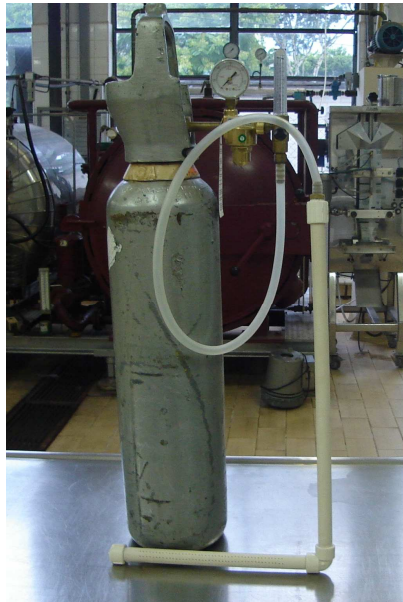
### **4.1. Recepção e Processamento**

O leite cru (250 litros) foi captado no Laticínio Atilatte em Itatiba-SP. Imediatamente após ordenha e resfriamento, o leite foi transportado em latões de 50 litros para Planta Piloto de Leite e Derivados da FEA/Unicamp. Este volume foi dividido em duas porções de 125 litros que foram armazenadas em dois diferentes tanques de expansão com controle automático de agitação e temperatura a  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Figura 1). Uma porção serviu de controle (sem adição de  $\text{CO}_2$ ) e a outra foi adicionada de  $\text{CO}_2$ , utilizando-se um tubo de PVC perfurado devidamente higienizado acoplado num cilindro de  $\text{CO}_2$  (Figura 2), até que o pH do leite atingisse  $6,20\pm 0,05$ , o que

correspondia a aproximadamente 1000 ppm de CO<sub>2</sub>. O leite cru adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub> foi mantido nos tanques a 4°C por seis dias antes do processamento UHT. Amostras foram coletadas em frascos estéreis destinados à realização das análises microbiológicas e em frascos higienizados para as análises físico-químicas.



**Figura 1.** Tanques de armazenamento de leite cru (FEA/UNICAMP).



**Figura 2.** Cilindro de CO<sub>2</sub> com tubo de PVC perfurado acoplado utilizado na carbonatação do leite.

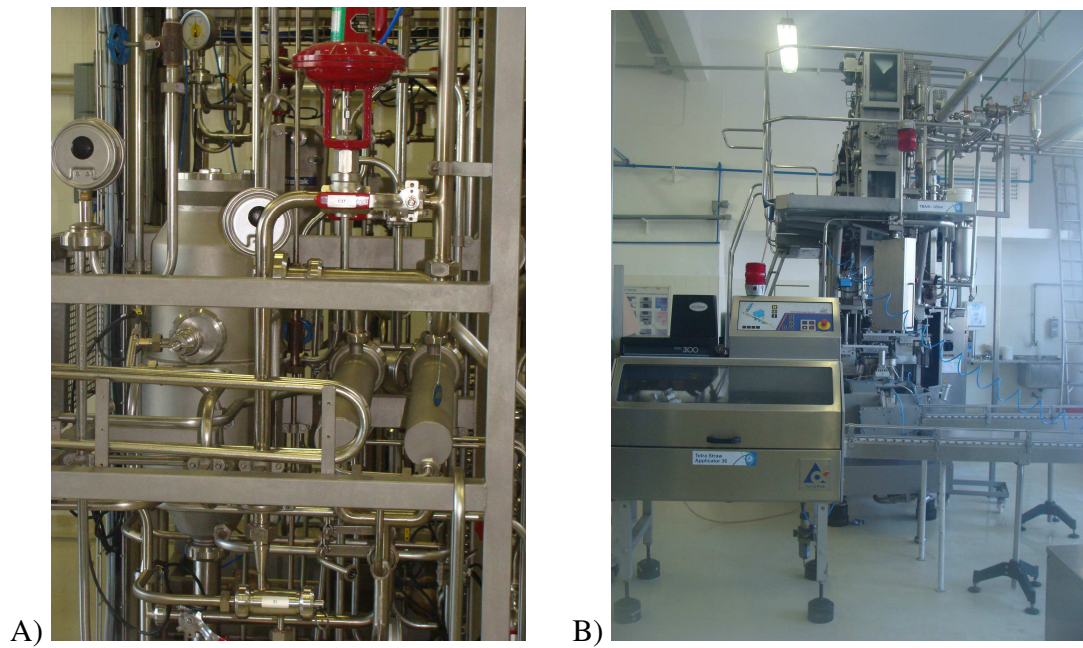


Após seis dias, o leite controle e o leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> foram transportados para a Planta Piloto da Tetra Pak instalada no Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Ambas as amostras foram pré-aquecidas a 75 °C em tanque de expansão (Figura 3) para expulsão do CO<sub>2</sub> e em seguida foram submetidas ao tratamento UHT por injeção direta de vapor a 143 °C/ 4 s (Figura 4A).

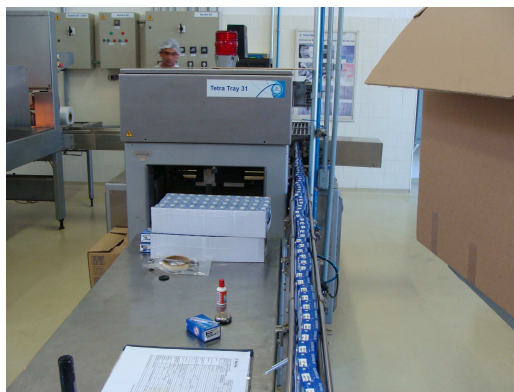
Antes do processamento, o leite foi adicionado de citrato de sódio (0,1%) para prevenir a desestabilização das proteínas durante o tratamento térmico. Após o tratamento térmico, o leite foi homogeneizado em dois estágios, com pressão total de 220 kgf/cm<sup>2</sup> (160 kgf/cm<sup>2</sup> no primeiro estágio e 60 kgf/cm<sup>2</sup> no segundo estágio), resfriado a 25 °C, armazenado em tanque asséptico e em seguida envasado assepticamente (Figura 4B) em embalagens cartonadas tipo *tetra brik aseptic* de 125 mL que foram acondicionadas em pelets (Figura 5) e transportadas para a FEA/UNICAMP onde foram armazenadas em câmaras incubadoras BOD a 25, 35 e 45 °C. O fluxograma geral do experimento está apresentado na Figura 6.



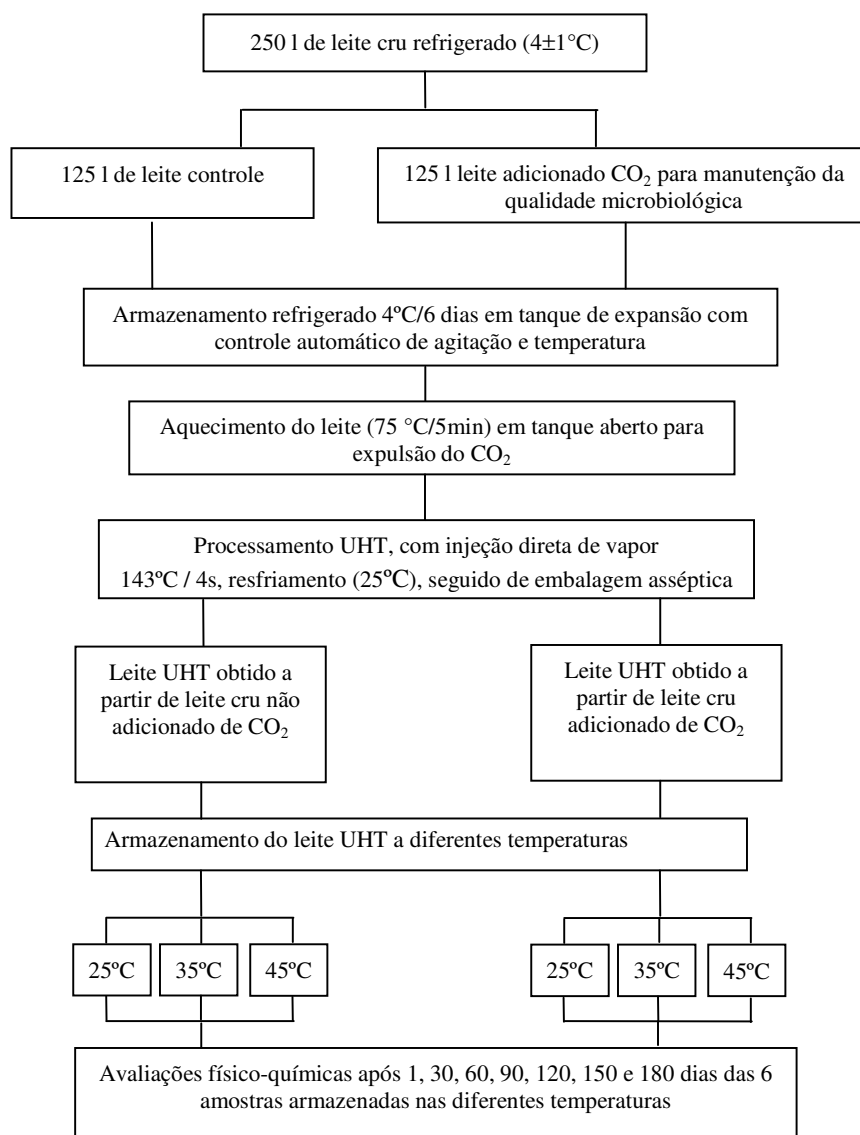
**Figura 3.** Tanque de pré-aquecimento do leite antes do tratamento térmico UHT (Planta Piloto Tetra Pak/ITAL).



**Figura 4.** Sistema de aquecimento por injeção direta de vapor (A) e embaladora asséptica (B), Planta Piloto Tetra Pak/ITAL.



**Figura 5.** Leite UHT embalado e acondicionado em caixas com 44 unidades de embalagens de 125 mL (Planta Piloto Tetra Pak/ITAL).



**Figura 6.** Esquema geral do trabalho.

#### 4.2. Amostragem e análises realizadas

Para a caracterização físico-química, o leite cru foi analisado quanto ao pH, acidez titulável, gordura, extrato seco total, lactose, cinzas, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não protéico (NNP), conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) e cor pelo sistema Cielab. O tanque contendo o leite controle foi mantido fechado durante os 6 dias de armazenamento refrigerado e o tanque contendo o leite adicionado de CO<sub>2</sub> foi monitorado diariamente quanto ao pH e concentração de CO<sub>2</sub>. Quando o pH encontrava-se acima de

6,20±0,05, o dióxido de carbono era borbulhado ao leite até que o pH retornasse ao valor inicial, com avaliação de pH e concentração de CO<sub>2</sub> após a reposição.

Após seis dias de armazenamento refrigerado, as amostras de leite cru adicionadas e não adicionadas de CO<sub>2</sub> foram avaliadas quanto ao pH, nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC), nitrogênio não protéico (NNP) e conteúdo de ácidos graxos livres (AGL).

Para caracterização microbiológica, tanto no dia da recepção como após seis dias de armazenamento, o leite cru adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub> foram avaliados quanto à contagem total de mesófilos e contagem de micro-organismos psicrotóxicos.

No dia seguinte ao processamento UHT (dia 1), os leites produzidos a partir do leite cru adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub> e armazenados a 25, 35 e 45 °C foram avaliados quanto às mesmas características do leite cru, além das provas de estabilidade ao álcool, viscosidade, sedimentação, eletroforese SDS PAGE, peptídeos por cromatografia HPLC em fase reversa e esterilidade comercial. Após 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento o leite UHT foi avaliado quanto ao pH, acidez titulável, nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel a pH 4,6, nitrogênio solúvel em TCA 24%, cor, conteúdo de ácidos graxos livres (AGL), sedimentação, viscosidade, eletroforese SDS PAGE e cromatografia HPLC-RP.

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, com exceção da concentração de CO<sub>2</sub> e do conteúdo de ácidos graxos livres que foram feitos em duplicata. As avaliações microbiológicas também foram realizadas em duplicata.

#### **4.2.1. Determinações físico-químicas**

**pH:** foi determinado por potenciômetro (DM 20, Digimed) previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente na amostra a 25°C.

**Acidez titulável:** foi determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína, segundo a metodologia AOAC 947.05 (1995).

**Gordura:** foi determinada pelo Método de Gerber (BRITISH STANDARD INSTITUTION, 1989), no qual, após a hidrólise ácida e digestão total dos componentes orgânicos exceto a gordura, faz-se a leitura direta da porcentagem de gordura na escala do butirômetro.

**Extrato seco total:** foi determinado gravimetricamente, por secagem em estufa a 105°C de acordo com AOAC 925.23 (1995).

**Cinzas:** determinada por incineração em mufla a 550°C, conforme AOAC 935.42 (1995).

**Nitrogênio e frações nitrogenadas:** o nitrogênio total e as frações nitrogenadas solúveis em TCA 24% e em pH 4,6 que foram determinadas no sobrenadante após precipitação das proteínas, seguiram metodologia de Kjeldahl, AOAC 991.20 (1995). Todos os resultados de nitrogênio foram expressos como proteína usando o fator de conversão de 6,38. A proteína (P) e caseína (CN) foram calculadas por (NT-NNP) x 6,38 e (NT-NNC) x 6,38, respectivamente, onde NT é o conteúdo de nitrogênio total do leite. No caso do leite cru, o decréscimo da relação (CN/P) x 100 foi utilizado como índice de proteólise. O aumento das relações (NS<sub>pH4,6</sub>/NT) x 100 e (NS<sub>TCA24%</sub>/NT) x 100 foram utilizados como índices de proteólise do leite UHT.

**Lactose:** calculada por diferença através da seguinte fórmula:

Lactose (%) = % Extrato Seco Total – (% Gordura + % Proteína + %Cinzas)

**Dióxido de carbono:** a concentração de CO<sub>2</sub> foi determinada utilizando-se analisador de CO<sub>2</sub> MOCON Pac Check 650 (MOCON, USA) conforme descrito por Ma *et al.* (2001). O equipamento (Figura 7) determina a porcentagem de CO<sub>2</sub> dissolvido no leite e liberado para o espaço livre do frasco selado após tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Para estabelecer a curva padrão, foram preparados oito frascos de vidro com 25 mL de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> (4°C). A cada frasco foram adicionados água e uma solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,057M para se conseguir concentrações de CO<sub>2</sub> equivalentes a 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 ppm. O ponto zero da curva correspondia ao leite cru sem adição de CO<sub>2</sub>. Cada frasco foi imediatamente selado com tampa de borracha e o CO<sub>2</sub> do espaço livre foi medido após a adição do ácido sulfúrico. Assim foi possível fazer a conversão da concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido (como %CO<sub>2</sub>) para ppm de CO<sub>2</sub>. A calibração do equipamento foi realizada conforme instruções do fabricante, utilizando oxigênio (ar ambiente), oxigênio de alta pureza (gás de referência), CO<sub>2</sub> (ar ambiente) e

finalmente CO<sub>2</sub> de alta pureza (gás de referência). A confirmação da calibração era obtida através da leitura do ar ambiente, que deveria estar dentro da faixa de 20,1 a 21,1% para o oxigênio e 0,0 a 0,5% para o CO<sub>2</sub>.



**Figura 7.** Analisador de CO<sub>2</sub> MOCON Pac Check 650.

**Ácidos graxos livres:** foi determinado pelo método de sabão de cobre descrito por Shipe *et al.* (1980) e modificado por Ma *et al.* (2003). Os ácidos graxos livres foram extraídos da amostra através de agitação e centrifugação com uma mistura de solventes (clorofórmio:heptano:metanol, 49:49:2). O substrato obtido recebeu um reagente de cor e a coloração desenvolvida foi lida a uma absorbância de 440 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Photonics, Modelo SP-2000UV, USA) utilizando cubeta de vidro de 1 cm. A massa de ácidos graxos livres (AGL) foi calculada usando-se a equação da reta da curva de calibração onde o padrão foi o ácido palmítico. O resultado final foi expresso em unidades de meq de AGL/ kg de leite e foi calculado como:  $AGL_{(meq/kg, \text{ expresso } \acute{a}c. \text{ palmítico})} = [(\mu g \text{ AGL}_{amostra} \times 0,001)/256,43]/(g_{amostra} \times 0,001)$ . O aumento da concentração de ácidos graxos livres foi usado como índice de lipólise.

**Sedimentação:** foi determinada pelo método gravimétrico descrito por Ramsey e Swartzel (1984) e modificado por Silva (2004). A embalagem UHT foi completamente aberta pela parte superior com auxílio de tesoura e o leite foi escoado cuidadosamente. A embalagem foi cortada de modo a obter-se uma altura final de 4 cm a partir da base. Inverteu-se a embalagem e manteve-se a mesma na posição vertical por 10 minutos a fim de permitir que o leite escoasse das paredes internas e do fundo. A embalagem foi então pesada e o valor foi anotado. O sedimento seco foi removido, a embalagem foi lavada, seca a temperatura ambiente e novamente pesada. A massa de sedimentos foi obtida pela diferença entre as duas pesagens e expressa em g de sedimento/100 ml de leite.

**Prova do álcool:** quantidades iguais de leite e de uma solução de álcool etílico 68% foram misturadas. Não havendo precipitação das proteínas observada através de coágulos na parede do tubo, o leite era considerado estável ao etanol 68%.

**Viscosidade:** foi avaliada a 25°C em viscosímetro Brookfield modelo DVII, utilizando UL Adapter, seguindo as orientações de calibração e operação fornecidas pelo fabricante.

**Cor:** foi avaliada pelo sistema L\*,a\*,b\* em colorímetro Hunterlab ColorQuest II, com iluminante D65, ângulo de visão 10° e modo de calibração refletância incluída, sistema de cor Cielab. A variação da cor foi acompanhada pelo valor de Hunter b\* [medida azul (-) para amarelo (+)].

**Eletroforese SDS-PAGE:** foi realizada segundo método descrito por Laemmli (1970), utilizando-se o Sistema BioRad III (Bio-Rad Laboratories). As amostras foram digeridas em tampão de amostra na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e aplicadas em gel de SDS PAGE contendo 5% de acrilamida no gel de cobertura e 12% no gel de separação. Após a corrida, as bandas foram tingidas com uma solução contendo 0,1% de Comassie Blue, 40% de metanol e 10% de ácido acético e descoradas com uma solução de água, metanol e ácido acético na proporção 5:4:1.

**Cromatografia HPLC-RP:** os peptídeos solúveis em pH 4,6 foram analisados em cromatógrafo de coluna em fase reversa com fase móvel acetonitrila grau HPLC conforme descrito por Datta e Deeth (2003). A fração solúvel em pH 4,6 foi preparada pelo ajuste do pH do leite até 4,6 com ácido acético 10%, seguido de agitação e incubação por 1 hora a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 24.000 g por 15 min e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman 41 e posteriormente em membrana de PTFE 0,45  $\mu$ m (Milipore, USA), sendo que 20  $\mu$ L da solução foram injetados no sistema HPLC. Utilizou-se coluna X-Terra MS C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 150 x 2,1 mm, Waters, USA) a 40°C, fluxo de 0,9 mL/min e detecção a 210 nm. O solvente A foi 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água e o solvente B foi 0,1% de TFA em acetonitrila grau HPLC. O gradiente de solventes foi iniciado com 20% do solvente B. A proporção do solvente B aumentou de 20 para 35% durante os primeiros 20 min e depois de 5 min aumentou para 65% em 20 min e finalmente para 100% em 5 min, retornando à condição inicial após 10 minutos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.2. Determinações microbiológicas

**Contagem total de micro-organismos mesófilos aeróbios:** contagem pelo método de plaqueamento em profundidade. Utilizou-se ágar (PCA) e incubação a 35°C/48 horas (APHA, 1992). Esta análise foi terceirizada e realizada no Laboratório Geral de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

**Contagem total de micro-organismos psicrotróficos:** contagem pelo método de plaqueamento em superfície. Utilizou-se ágar (PCA) e incubação a 7°C/10 dias (APHA, 1992). Esta análise foi terceirizada e realizada no Laboratório Geral de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

**Esterilidade comercial:** amostras de cada lote de leite processado foram incubadas a 35-37°C durante sete dias. Decorrido esse período, as amostras foram avaliadas quanto à contagem padrão em placas, estabilidade ao álcool 68% e acidez. Para atender ao padrão da legislação brasileira, o produto deveria apresentar ausência de micro-organismos mesófilos, estabilidade ao etanol 68%, não apresentar variação de acidez acima de 0,02 g de láctico/100 mL em relação à amostra antes da incubação e nem alterações na embalagem (BRASIL, 1997). Esta análise foi terceirizada e realizada no Laboratório Geral de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

#### 4.3 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de sub-sub-parcelas divididas (*split-split-plot*) e o experimento completo foi repetido 3 vezes. O fator principal foi a adição de CO<sub>2</sub> com dois níveis de variação (com e sem CO<sub>2</sub>); o fator secundário foi a temperatura de armazenamento com três níveis de variação (25, 35 e 45±1°C) e o terceiro fator foi o tempo de armazenamento do leite com sete níveis de variação (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). O efeito dos tratamentos foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de comparação entre médias de Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5%.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da adição de CO<sub>2</sub> sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas e microbiológicas do leite cru recém ordenhado e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub>.

Embora o processamento tenha sido realizado com três repetições, a análise estatística foi realizada com os dados de dois processamentos (n=2), uma vez que houve contaminação do 3º processo, evidenciada pela coagulação das amostras com separação de fases após 60 dias de armazenamento (Figura 8). A composição físico-química do leite cru no dia da ordenha (0 d) atendeu aos requisitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002).

Quanto aos padrões microbiológicos, a contagem total de mesófilos, que foi de  $4,5 \times 10^4$  ufc/mL, ficou abaixo do limite estabelecido para leite cru, que é de  $7,5 \times 10^5$  ufc/mL, caracterizando um leite obtido em boas condições higiênicas de ordenha que foi devidamente conservado e transportado.



Figura 8. Amostra de leite UHT após 60 dias de armazenamento a 25°C , com visível coagulação e separação de fases.

Tabela 1. Características físico-químicas do leite cru recém ordenhado e após 6 dias de armazenamento a 4°C adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub> (n=2). Valores médios ± desvio padrão.

	Leite cru 0 d	Leite cru 6 d	Leite cru <sub>CO<sub>2</sub></sub> 6 d	<i>p</i> -valor
<b>Características físico-químicas</b>				
pH	6,80 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,22 ± 0,09 <sup>b</sup>	< 0,001
Acidez (°D)	16,29 ± 1,05	-----	-----	-----
Extrato seco total (%)	11,91 ± 0,37	-----	-----	-----
Gordura (%)	3,33 ± 0,15	-----	-----	-----
Cinzas (%)	0,74 ± 0,07	-----	-----	-----
Lactose (%) <sup>(1)</sup>	4,94 ± 0,41	-----	-----	-----
Proteína total (%)	2,90 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,85 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,743
Proteína (%)	2,67 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,567
Caseína (%)	2,25 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,978
N <sub>Sp</sub> H4,6 (%NT)	22,26 ± 1,75 <sup>a</sup>	21,56 ± 2,59 <sup>a</sup>	22,40 ± 2,64 <sup>a</sup>	0,925
NS-TCA24% (%NT)	7,81 ± 1,82 <sup>a</sup>	9,25 ± 0,85 <sup>a</sup>	8,45 ± 1,04 <sup>a</sup>	0,463
AGL <sup>(2)</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	< 0,001
<b>Características microbiológicas</b>				
Mesófilos (log ufc/mL)	4,69 <sup>c</sup>	7,12 <sup>a</sup>	5,10 <sup>b</sup>	< 0,001
Psicrotróficos (log ufc/mL)	4,39 <sup>c</sup>	6,70 <sup>a</sup>	5,30 <sup>b</sup>	0,006

<sup>a,b</sup> Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ) <sup>(1)</sup> Lactose calculada por diferença; <sup>(2)</sup> AGL: ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg de leite).

Observa-se na Tabela 1 que depois de seis dias de armazenamento refrigerado não houve diferença significativa nas características físico-químicas do leite adicionado ou não de CO<sub>2</sub>, exceto na quantidade de ácido graxos livres que foi significativamente menor para o leite adicionado de CO<sub>2</sub>, possivelmente devido à menor contagem de micro-organismos psicrotróficos produtores de enzimas lipolíticas. A diferença nos valores de pH, que foi menor no leite adicionado de CO<sub>2</sub>, já era esperada uma vez que a sua adição promove a redução do pH do leite, o qual retorna aos padrões normais após a expulsão do CO<sub>2</sub> antes do tratamento UHT (MA *et al*, 2001).

No que diz respeito à característica microbiológica do leite cru a ser processado, observou-se na Tabela 1 que a adição de CO<sub>2</sub> inibiu o desenvolvimento de micro-organismos durante o armazenamento refrigerado. Desta forma, após 6 dias de armazenamento, a contagem total de mesófilos aumentou 0,41 e 2,43 ciclos logarítmicos para o leite adicionado e não

adicionado de CO<sub>2</sub>, enquanto a contagem de psicrotróficos aumentou 0,91 ciclos log para o leite adicionado de CO<sub>2</sub> e 2,31 ciclos log para o leite controle não adicionado de CO<sub>2</sub>. Durante o armazenamento refrigerado, a contagem total de mesófilos passou de 4,5x10<sup>4</sup> ufc/mL no dia zero para 1,4x10<sup>7</sup> e 1,3x10<sup>5</sup> ufc/mL após seis dias de armazenamento a 4°C para o leite cru controle e leite adicionado de CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Nestas mesmas condições, as contagens de psicrotróficos passaram de 3,6x10<sup>4</sup> ufc/mL no dia da ordenha (d 0) para 8,4x10<sup>6</sup> e 5,2x10<sup>5</sup> ufc/mL para o leite cru controle e leite adicionado de CO<sub>2</sub> respectivamente. Desta forma, após seis dias armazenados a 4°C o leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou melhor qualidade microbiológica do que o não adicionado, que apresentou contagem total de mesófilos superior ao estabelecido pela legislação (7,5x10<sup>5</sup> ufc/mL).

Embora significativamente diferentes, as contagens de psicrotróficos do leite adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub> foram bastante próximas, sendo que mesmo o leite não adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou contagem da ordem de 10<sup>6</sup> ufc/mL. Segundo diversos autores (COUSIN, 1982; SANTOS, FONSECA, 2001; SØRHAUG, STEPANIAK, 1997; MUIR, 1996) a atividade enzimática passa a ter importância para a qualidade dos produtos processados quando as contagens de psicrotróficos ultrapassam este valor.

O efeito do CO<sub>2</sub> na manutenção da qualidade do leite cru já foi reportado por diversos autores em diferentes temperaturas de armazenamento do leite cru (DANIELS *et al.*, 1985; DIXON, KELL, 1989; ESPIE, MADDEN, 1997; KING, MABBITT, 1982; ROBERTS, TORREY, 1988; VIANNA, GIGANTE, 2010).

## **5.2. Efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru sobre as características físico-químicas do leite UHT**

A composição das amostras de leite UHT produzidas a partir de leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub> (Tabela 2) atendeu aos padrões estabelecidos pelo Regulamento de Identidade e Qualidade do leite UHT integral que são: mínimo de 3,0% de gordura, 8,2% de extrato seco desengordurado (ESD) e acidez entre 0,14-0,18% de ácido láctico. Observa-se também que as amostras apresentaram-se comercialmente estéreis, uma vez que após o período de incubação de sete dias a 35-37°C não apresentaram desenvolvimento microbiano, foram estáveis ao álcool 68% e não apresentaram variação de acidez ou alterações na embalagem (BRASIL, 1997). A composição de ambas as amostras (adicionada e não adicionada de CO<sub>2</sub>) não apresentou

diferença significativa, exceto para a porcentagem de ácidos graxos livres, que, assim como no leite cru, foi maior no leite UHT obtido a partir do leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub>.

Tabela 2. Composição físico-química e avaliação da esterilidade comercial do leite UHT produzido a partir de leite cru adicionado ou não de CO<sub>2</sub> (n=2).

	Leite UHT obtido a partir de leite cru não adicionado de CO <sub>2</sub>	Leite UHT obtido a partir de leite cru adicionado de CO <sub>2</sub>	<i>p</i> -valor <sup>(1)</sup>
pH	6,84 ± 0,03	6,82 ± 0,02	0,057
Acidez (% ácido láctico)	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	-----
Extrato seco total (%)	11,84 ± 0,31	12,10 ± 0,39	0,372
Gordura (%)	3,33 ± 0,15	3,31 ± 0,13	0,250
ESD <sup>(2)</sup>	8,49 ± 0,20	8,78 ± 0,42	-----
Cinzas (%)	0,80 ± 0,11	0,80 ± 0,12	0,905
Lactose (%)	4,61 ± 0,52	4,97 ± 0,26	-----
Proteína total (%)	3,10 ± 0,26	3,01 ± 0,21	0,615
Proteína (%)	2,83 ± 0,28	2,74 ± 0,19	0,607
NSpH4,6 (%NT)	12,87 ± 0,63	13,41 ± 1,80	0,731
NS-TCA24% (%NT)	8,82 ± 0,91	9,10 ± 0,17	0,642
AGL <sup>(3)</sup>	0,221 ± 0,001	0,192 ± 0,005	0,005
Viscosidade (mPa)	2,08 ± 0,11	2,07 ± 0,12	0,634
<b>Esterilidade comercial</b>			
<b>(Resultados após incubação a 35-37°C por 7 dias)</b>			
Desenvolvimento microbiano	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento	
Varição de acidez e alteração da embalagem	Não apresentou	Não apresentou	
Prova do álcool 68%	Estável	Estável	

<sup>(1)</sup>  $p \leq 0,05$ ; <sup>(2)</sup> Extrato seco desengordurado, calculado por diferença; <sup>(3)</sup> AGL: Ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg de leite).

### 5.3. Efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru, da temperatura e do tempo de armazenamento sobre as características do leite UHT

A Tabela 3 apresenta a análise de variância para o efeito dos tratamentos (adição ou não de CO<sub>2</sub> ao leite cru), da temperatura (25, 35 e 45°C) e do tempo de armazenamento (1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), bem como de suas interações sobre os parâmetros avaliados.

Tabela 3: Análise de variância para o efeito dos tratamentos, da temperatura e do tempo de armazenamento, bem como de suas interações sobre os parâmetros avaliados.

	Valores de $p^{(1)}$						
	pH	NS-pH 4,6	NS-TCA24%	AGL <sup>(2)</sup>	Cor	Viscosidade	Sedimentação
Tratamento <sup>(3)</sup>	0,107	<0,001	0,237	0,226	0,023	0,950	0,414
Temperatura <sup>(4)</sup>	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,821	0,986
Tempo <sup>(5)</sup>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tratamento <sup>(3)</sup> x temperatura <sup>(4)</sup>	0,923	0,083	0,316	0,083	0,112	0,972	0,461
Tratamento <sup>(3)</sup> x tempo <sup>(5)</sup>	0,962	0,020	0,559	1,000	0,216	0,229	0,605
Temperatura <sup>(4)</sup> x tempo <sup>(5)</sup>	<0,001	0,744	0,737	<0,001	<0,001	0,077	0,463
Tratamento <sup>(3)</sup> x temperatura <sup>(4)</sup> x tempo <sup>(5)</sup>	1,00	0,958	0,926	1,000	0,443	0,174	0,691

<sup>(1)</sup>  $p \leq 0,05$ ; <sup>(2)</sup> Ácidos Graxos Livres (meq. ác. palmítico/kg de leite); <sup>(3)</sup> Adição ou não de CO<sub>2</sub> ao leite cru; <sup>(4)</sup> Temperatura de armazenamento do leite UHT a 25, 35 e 45°C; <sup>(5)</sup> Tempo de armazenamento do leite UHT (1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias).

Observa-se na Tabela 3 que o pH do leite UHT não foi significativamente afetado pela adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru antes do processamento e foi, em média,  $6,71 \pm 0,19$  para o leite UHT fabricado a partir do leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> e  $6,69 \pm 0,19$  para o fabricado a partir do leite não adicionado de CO<sub>2</sub>. No entanto, o pH do leite UHT foi significativamente afetado pela temperatura e pelo tempo de armazenamento, bem como pela interação destes dois fatores. Observa-se na Figura 9, que apresenta comportamento do pH do leite UHT durante o armazenamento a diferentes temperaturas, que a 25°C não houve variação significativa do pH durante os 180 dias de armazenamento. Entretanto, a 45°C observou-se um decréscimo de 0,58

unidades de pH durante os 180 dias. Este mesmo comportamento foi observado por Al Saadi e Deeth (2008) que estudaram as mudanças no pH durante o armazenamento de leite UHT por 12 semanas a 45, 37, 20 e 5°C. O maior decréscimo do pH a 45 °C pode ser atribuído à formação de ácidos durante a reação de Maillard (ANDREWS, 1970), a qual é favorecida pelo aumento da temperatura, bem como à desfosforilação das caseínas fosforiladas ou à liberação de íons H<sup>+</sup> durante as interações proteína-proteína (VENKATACHALAM *et al*, 1993).

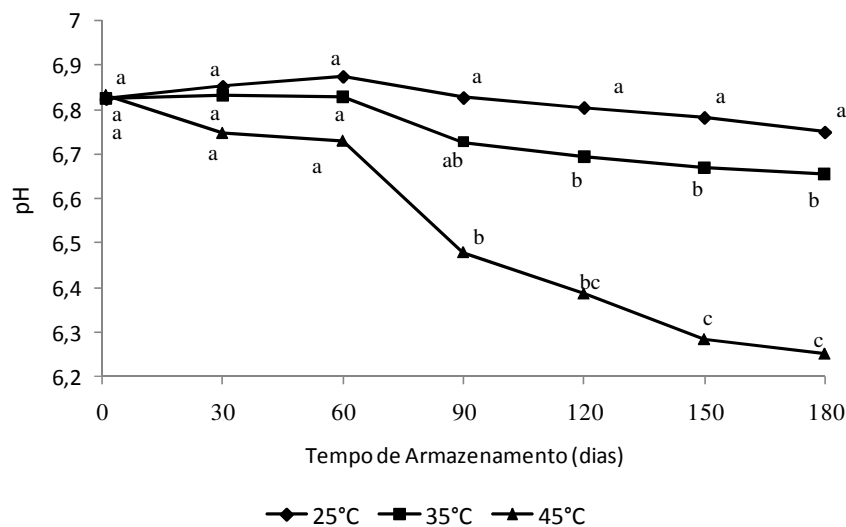


Figura 9: Comportamento do pH do leite UHT durante o armazenamento a diferentes temperaturas.

Observa-se na Figura 10 que o decréscimo do pH a 45°C foi acompanhado pelo escurecimento do produto, indicado pelo aumento dos valores de b\*. As amostras armazenadas a 25 °C não apresentaram escurecimento durante os 180 dias, enquanto as armazenadas a 35°C não apresentaram desenvolvimento de cor visível a olho nu, mas apresentam aumento de valor b\* somente após 150 dias. Para as amostras armazenadas a 45°C, o aumento no valor de b\* começou após 30 dias de armazenamento.

Além de ter sido significativamente afetada pela interação dos fatores tempo e temperatura, a cor do leite UHT foi também afetada pelos tratamentos (Tabela 3), e foi mais intensa no leite fabricado a partir de leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> (9,23±0,02) do que no fabricado a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> (8,91±0,01). Considerando que o escurecimento do leite durante a estocagem ocorre devido às reações de Maillard, iniciadas pelas reações entre a

lactose e o amino-grupos dos resíduos de lisina da proteína (AL-SAAD, DEETH, 2008) era de se esperar maior escurecimento do leite UHT com maior proteólise, especialmente se a proteólise fosse devida à ação da plasmina, a qual possui alta especificidade para ligações peptídicas com resíduos de lisina (FOX, McSWEENEY, 1998) permitindo que os amino grupos da lisina (-NH<sub>2</sub>) fiquem disponíveis para participar da reação de Maillard.

No entanto, o leite UHT fabricado a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> apresentou maior proteólise (NS pH 4,6 = 19,24±4,47) e menor escurecimento (valor de b\* 8,91±0,01). Para o leite UHT fabricado a partir de leite cru adicionado de CO<sub>2</sub> estes valores de b\* e de NS pH 4,6 foram 16,53±3,50 e 9,23±0,02, respectivamente. Estes dados evidenciam que nas condições deste trabalho outros fatores como, por exemplo, a temperatura e o tempo de armazenamento de leite UHT afetaram de forma mais acentuada a cor do leite.

Na Figura 11 pode-se comparar a cor visual das amostras de leite UHT fabricado a partir de leite cru adicionado e não adicionado de CO<sub>2</sub>, após 180 dias de armazenamento a 25°C, 35°C e 45°C. Observa-se que as amostras 3 e 6 armazenadas a 45°C não apresentaram coloração típica de leite, independente do tratamento do leite cru.

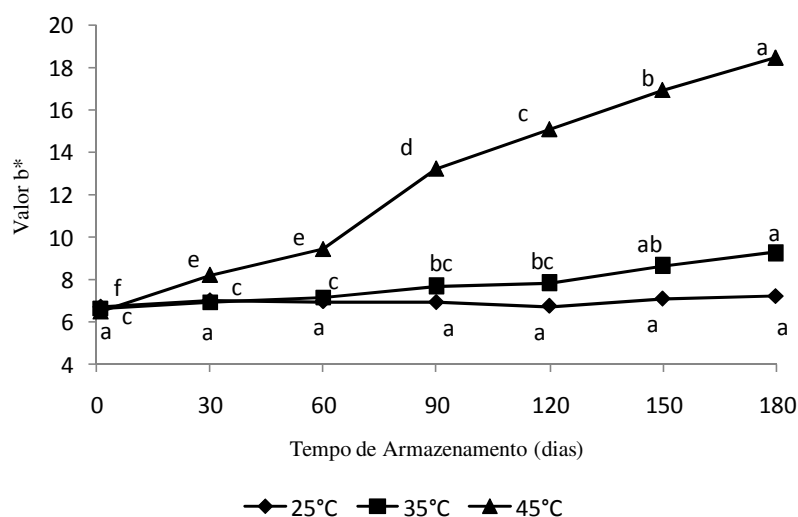


Figura 10. Comportamento da cor do leite UHT (Hunter b\* value (azul [-] para amarelo [+]) durante o armazenamento a diferentes temperaturas.

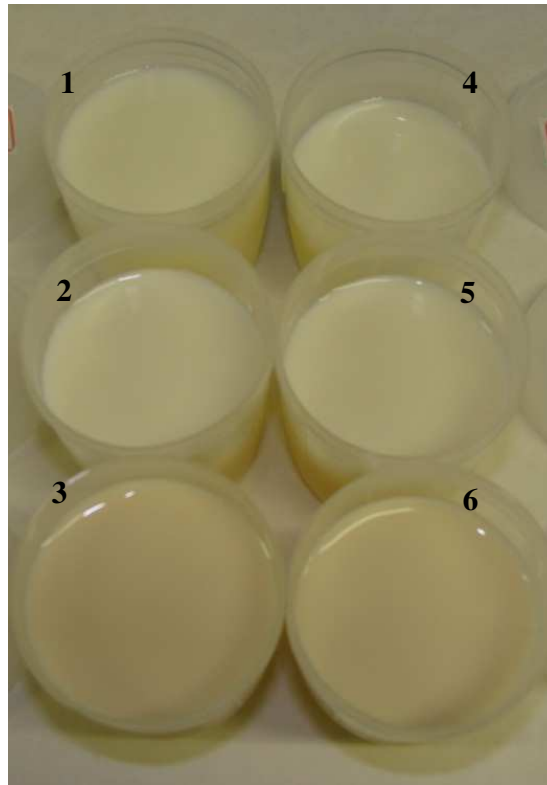


Figura 11. Cor visual do leite UHT. Amostras 1, 2 e 3 leite UHT fabricado a partir de leite não adicionado de CO<sub>2</sub>, armazenado a 25, 35 e 45°C, respectivamente, após 180 dias de armazenamento. Amostras 4, 5 e 6 leite UHT fabricado a partir de leite adicionado de CO<sub>2</sub>, armazenado a 25, 35 e 45°C, respectivamente, após 180 dias de armazenamento.

A lipólise do leite UHT, representada pela concentração de ácidos graxos livres, foi significativamente afetada pela interação entre os fatores tempo e temperatura (Tabela 3). Observa-se na Figura 12, que apresenta o comportamento dos ácidos graxos livres do leite UHT durante o armazenamento a diferentes temperaturas, que a 35°C não houve alteração na concentração de ácidos graxos livres durante os 180 dias de armazenamento, enquanto a 45°C a variação foi de 0,34 meq. ác. palmítico/kg após esse tempo, a qual aumentou mais intensamente durante os primeiro 60 dias de armazenamento. A 25 °C a concentração de ácidos graxos livres aumentou 0,08 meq. ác. palmítico/kg diferindo significativamente apenas entre o primeiro e o último dia de avaliação.

Neste trabalho não foi feita a avaliação sensorial dos produtos, mas é de se esperar que o leite armazenado a 45°C apresente sabor e odor de ranço causados pelo aumento dos níveis de ácidos graxos livres de cadeia curta, uma vez que estes são preferencialmente esterificados na



posição três do triacilglicerol, que é a posição mais susceptível á hidrólise enzimática (DATTA, DEETH, 2002).

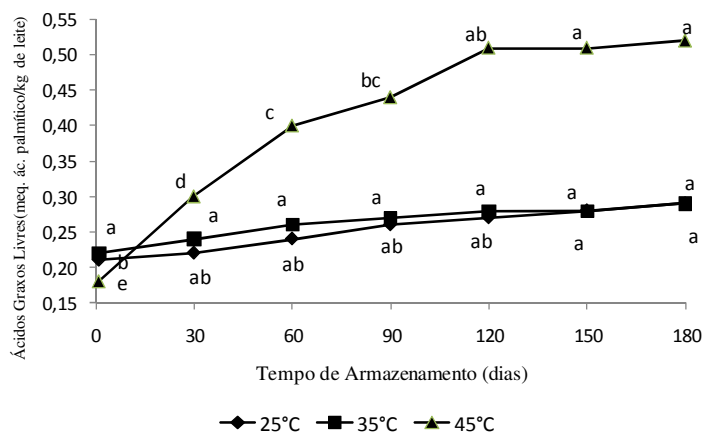


Figura 12: Comportamento dos ácidos graxos livres (meq. ác. palmítico/kg de leite) do leite UHT durante o armazenamento a diferentes temperaturas.

A proteólise é o mais importante evento que pode afetar a qualidade do leite UHT, uma vez que diversas evidências sugerem que a gelificação, ou seja, a perda de fluidez do leite UHT está relacionada à proteólise (McMAHON, 1996; AL SAADI, DEETH, 2008). Neste trabalho a proteólise foi analisada através do comportamento das frações nitrogenadas do leite (NS-pH4,6 e NS-TCA24%), do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras e do perfil de peptídeos obtidos no filtrado solúvel a pH 4,6 por cromatografia líquida de coluna em fase reversa. Buscou-se também evidenciar alterações no comportamento da viscosidade e sedimentação do leite que se relacionassem com o comportamento da proteólise.

Observa-se na Tabela 3 que o NS-pH4,6 foi significativamente afetado pela adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru e pela temperatura e tempo de armazenamento do leite UHT. Por outro lado, o teor de NS-TCA24%, somente foi afetado pela temperatura e tempo de armazenamento do leite UHT. Nenhuma destas frações foi significativamente afetada por qualquer interação entre os fatores estudados.

O NS-pH4,6 foi maior ( $19,24 \pm 4,87$ ) no leite UHT obtido a partir de leite não adicionado de CO<sub>2</sub> do que no leite adicionado de CO<sub>2</sub> ( $16,53 \pm 3,50$ ). A maior proteólise no leite não

adicionado de CO<sub>2</sub> pode sugerir atividade mais intensa de enzimas microbianas termorresistentes as quais foram possivelmente produzidas pelos micro-organismos psicotróficos durante o armazenamento do leite cru refrigerado. Tanto o NS-pH4,6 como o NS-TCA24% aumentaram para ambos tratamentos durante o armazenamento do leite UHT e foram maiores a 45°C do que a 25°C (Figuras 13 e 14), apresentando uma maior proteólise do leite armazenado a 45°C.

A Figura 15 apresenta os perfis eletroforéticos do leite UHT fabricado a partir de leite cru não adicionado ou adicionado de CO<sub>2</sub>. Observa-se que as amostras armazenadas a 25°C apresentaram bandas mais largas após 180 dias de armazenamento quando comparadas com as amostras do 1º dia, tanto para o leite UHT fabricado a partir do leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub>, como para o adicionado de CO<sub>2</sub>, indicando que grandes agregados de proteína se acumularam no leite durante o armazenamento. Como as ligações hidrofóbicas foram quebradas com o SDS e as pontes dissulfeto foram reduzidas com o agente redutor β-mercaptoetanol, ligações covalentes resultantes da reação de Maillard podem ser as responsáveis pela formação de caseínas poliméricas (AL SAADI e DEETH, 2008). As amostras armazenadas a 35°C apresentaram perfis distintos no 1º dia e 180º dia de armazenamento, mostrando bandas menores no 180º dia, provavelmente devido à degradação de peptídeos. Já as amostras armazenadas a 45°C apresentaram perfis eletroforéticos com definição deficiente no gel, o que não foi possível avaliar a degradação da proteína nesta amostras.

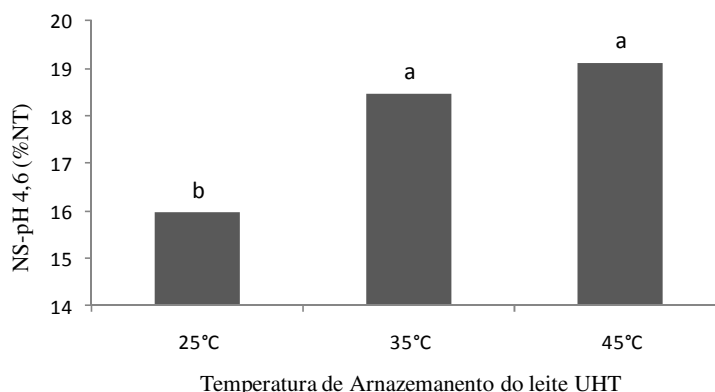


Figura 13: Efeito da temperatura de armazenamento do leite UHT sobre o NS-pH4,6.

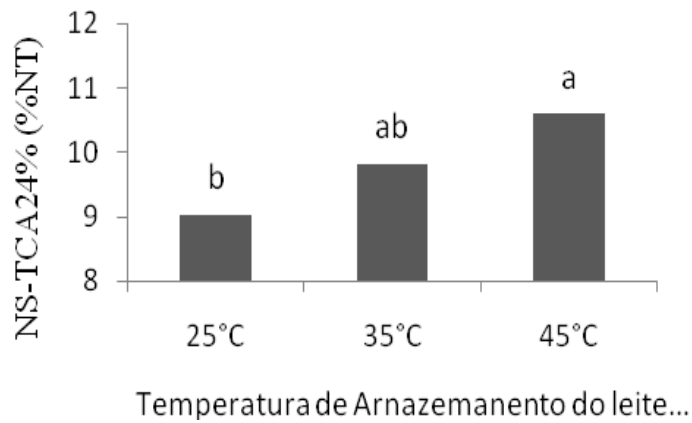


Figura 14: Efeito da temperatura de armazenamento do leite UHT sobre o NS-TCA24%.

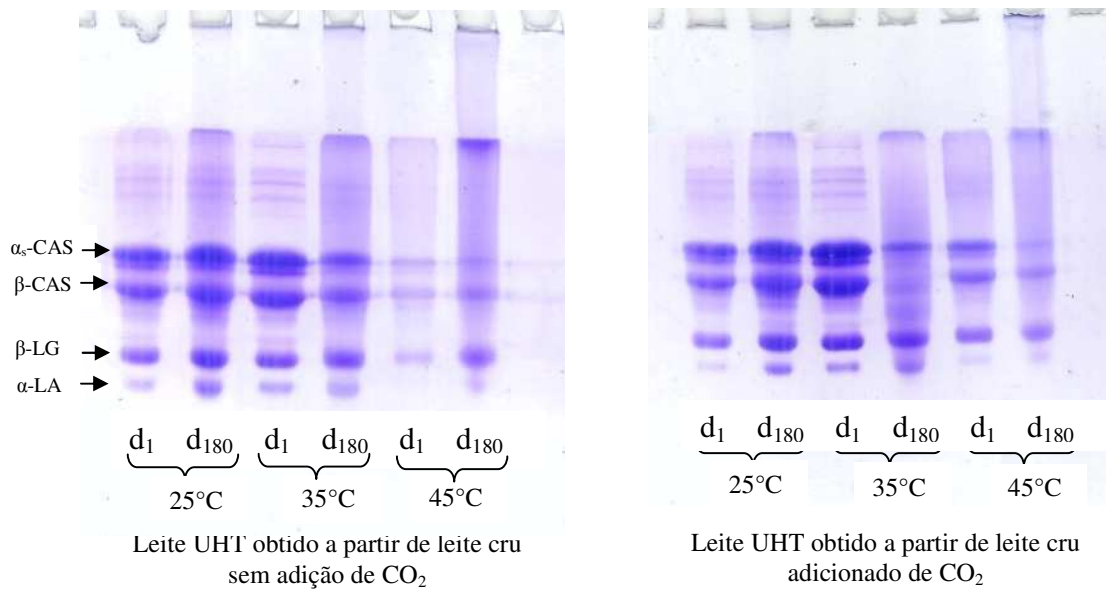


Figura 15: Perfis eletroforéticos das amostras de leite UHT fabricadas a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> (controle) e adicionado de CO<sub>2</sub>, analisadas no 1º dia e 180º dia de armazenamento à 25°C, 35°C e 45°C.

Os perfis cromatográficos dos peptídeos analisados por HPLC-RP obtidos a partir do filtrado solúvel a pH 4,6 são apresentados no anexo I. O comportamento dos picos nas amostras

analisadas foi semelhante, o que não permitiu concluir sobre possíveis influências dos tratamentos, da temperatura ou do tempo de armazenamento das amostras.

A maior proteólise observada para o leite UHT obtido a partir do leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> não se refletiu no comportamento da viscosidade e da sedimentação do leite, que, embora tenham aumentado durante o armazenamento do leite UHT, não foram significativamente afetados nem pela adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru antes do processamento, nem pela temperatura de armazenamento do produto processado (Tabela 3).

A sedimentação do leite UHT não foi significativamente afetada pelo tratamento e pela temperatura de estocagem, mas foi significativamente afetada pelo tempo de armazenamento do produto (Tabela 3). Observa-se na Figura 16 que a sedimentação foi constante durante os 120 dias de armazenamento, prazo normalmente garantido pelas indústrias de processamento de leite UHT no Brasil. Entretanto, a partir desse ponto, observou-se um aumento de 97% na quantidade de sedimentos. A sedimentação é um fenômeno físico de decantação dos agregados formados durante tratamentos térmicos do leite mais intensos e que ocorre durante a vida de prateleira do leite UHT. Estes agregados podem ser proteína desnaturada, sais inorgânicos, gordura ou lactose, sendo que segundo Datta et al. (2002) a quantidade de sedimentos depende da qualidade do leite cru e das condições de processamento e armazenamento do leite UHT. No entanto, a variação da qualidade microbiológica do leite cru (Tabela 1) e as diferentes condições de armazenamento (25, 35 e 45 °C) estudadas neste trabalho não afetaram a sedimentação.

Enquanto que a sedimentação trata-se de um fenômeno físico, a viscosidade pode ser considerada um fenômeno físico-químico que pode levar a perda de fluidez com formação de gel durante o armazenamento do leite. Neste trabalho, da mesma forma que a sedimentação, a viscosidade foi afetada exclusivamente pelo tempo de armazenamento (Tabela 3).

Observa-se na Figura 17 que a viscosidade aumentou ao longo do tempo. Este aumento foi observado após 90 dias de armazenamento quando comparado com o leite recém processado, sendo mais acentuado após 120 dias de armazenamento quando a viscosidade passou de 1,91 mPa para 3,73 mPa, significando um aumento de 49% na viscosidade.

Conforme observado neste trabalho, as mudanças na viscosidade do leite durante o armazenamento podem ocorrer em diferentes estágios (DATTA e DEETH, 2001). Inicialmente, imediatamente após o processamento, observa-se um período com aumento de fluidez do

produto. Em um estágio seguinte, observam-se pequenas mudanças na viscosidade, conforme verificada neste trabalho após 90 dias de armazenamento. Em um próximo estágio ocorre um aumento repentino de viscosidade, como foi observado após 150 e 180 dias de armazenamento, podendo ocorrer formação de gel.

Apesar do aumento da viscosidade, durante o período de avaliação das amostras (180 dias) não houve gelificação do leite. Entretanto, após este período observou-se a gelificação de diferentes amostras (Figura 18). A gelificação é um fenômeno irreversível que possivelmente se inicia através da liberação do complexo  $\beta$ -Lg- $\kappa$ -CN da micela que se acumula na fase soro e, quando alcança um limite crítico, novas interações protéicas são formadas levando ao aumento da viscosidade e eventualmente à formação do gel (DATTA, DEETH, 2003; MANZI, PIZZOFERRATO, 2006; MUIR, 1996; SØRHAUG, STEPANIAK, 1997).

Segundo Vidal-Martins *et al.* (2005), quando a presença de psicrotróficos é elevada o suficiente para produzir enzimas proteolíticas, a viscosidade poderá aumentar significativamente durante a vida de prateleira do leite UHT, cujas alterações podem conduzir à gelificação. Estas alterações são decorrentes de atividades enzimáticas, principalmente enzimas extracelulares e termorresistentes, particularmente lipases e proteases, produzidas por bactérias psicrotróficas contaminantes do leite antes do processamento térmico.

Conforme estudos de Datta e Deeth (2001), a resistência à gelificação de leites armazenados a temperaturas mais elevadas pode ser devido à maior degradação da proteína que fica impedida de formar um gel estável. A gelificação pode ser inibida se os sítios que participariam da interação estiverem bloqueados por interações entre a lactose e a caseína envolvendo resíduos de lisina. Esta hipótese é sustentada por Hill e Cracker (1968), que observaram em seus estudos que quando resíduos de lisina e arginina da k-caseína estavam indisponíveis para participar da reação, a coagulação por renina ficava prejudicada, indicando que o escurecimento de Maillard pode inibir a hidrólise da k-caseína.

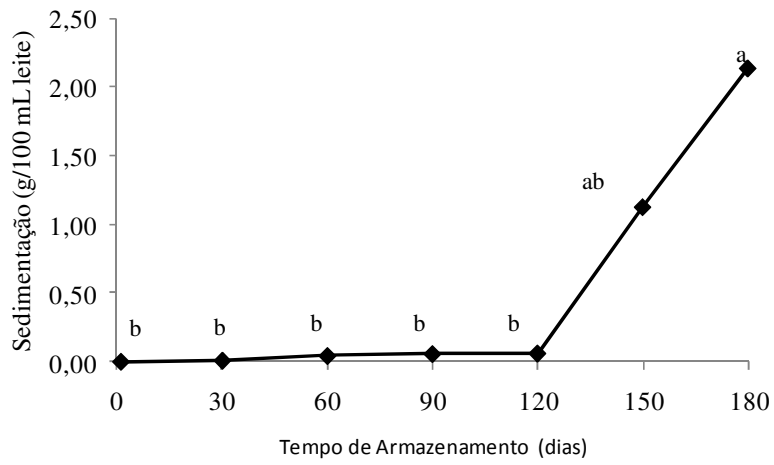


Figura 16: Comportamento da sedimentação do leite UHT durante o armazenamento.

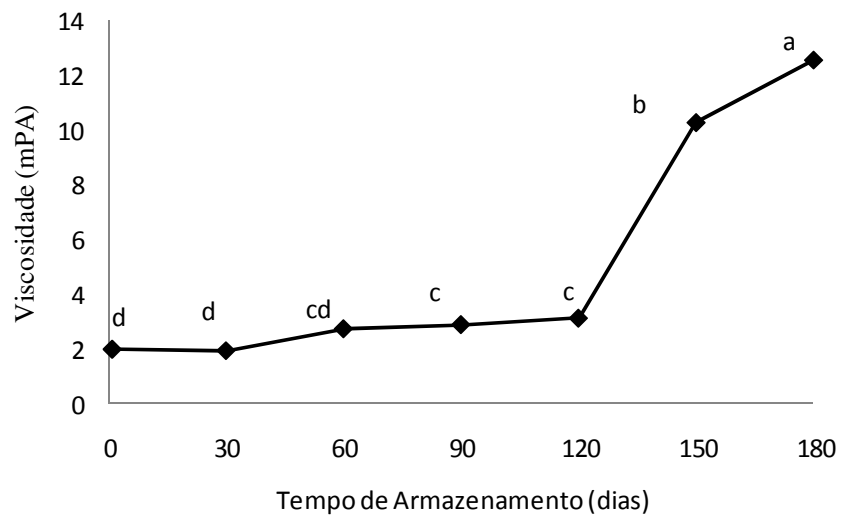


Figura 17: Comportamento da viscosidade do leite UHT durante o armazenamento.



Figura 18: Amostra de leite UHT gelificada após 180 dias de armazenamento.

## 6. CONCLUSÕES

A adição de CO<sub>2</sub> ao leite cru afetou sua qualidade microbiológica antes do processamento, no entanto, este tratamento teve menor impacto sobre a qualidade do leite UHT do que a temperatura e o tempo de armazenamento. Isso se deve possivelmente ao fato de que as amostras, embora diferentes, apresentaram contagem de psicotróficos bastante próxima entre si e também próximas da contagem limite para que a atividade enzimática possa ser considerada importante para a qualidade do produto processado.

Durante os 180 dias de armazenamento observou-se uma transformação físico-química do leite. A redução do pH foi acompanhada pelo aumento da proteólise e lipólise do leite, bem como da intensidade de cor e da quantidade de sedimentos e da viscosidade do leite.

No geral todas as transformações foram mais acentuadas a 45°C do que a 35 ou a 25 °C. Quanto maior a temperatura de armazenamento, mais intensas foram a acidificação, a extensão do escurecimento e a proteólise e lipólise de leite UHT.

Durante os 180 dias, independente da temperatura de armazenamento, observou-se o aumento da viscosidade, sem que se tenha observado a gelificação das amostras de leite UHT. A gelificação foi observada após este período.

Os resultados evidenciam que a qualidade da matéria-prima tem pouca importância sobre a qualidade do leite UHT processado por injeção direta de vapor a 143°C durante 4 segundos. Embora as transformações do produto durante o armazenamento sejam esperadas em função das enzimas residuais presentes no leite, elas foram minimizadas a 25°C, o que evidencia a necessidade de conservação em menores temperaturas para a manutenção da qualidade do produto durante o período de estocagem.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ANDREWS, A.T. Properties of aseptically packed ultra-high-temperature milk. Formation of polymerized protein during storage at various temperatures. **Journal of Dairy Research**, v. 42, p.89-99, 1970.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, tipo B, tipo C, pasteurizado e Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**: aprovado pela Instrução Normativa N° 51 de 18/09/2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>>. Acesso em: 10/09/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT)**: aprovado pela Portaria n° 370, de 04 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1252>>. Acesso em: 10/09/2011.

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

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

CHAVAN, R.S; CHAVAN, S.R.; KHEDKAR, C.D.; JANA, A.H. UHT Milk Processing and effect of plasmin activity on shelf life: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 10. p.251-267, 2011.

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

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

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

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

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

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

DONATO, L., GUYOMARC'H, F. Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk - a review. **Dairy Science and Technology**, v.89, n.3, p.29, 2009.

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

EMBRAPA (2008). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência de Informação Embrapa. Agronegócio do Leite - Especialização da Pecuária Leiteira. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_34\\_217200392358.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_34_217200392358.html)>. Acesso em 21/11/2011.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v.10, n.5-6, p. 325-331, 2000.

ENRIGHT, E.; BLAND, A. P.; NEEDS, E. C.; KELLY, A. L. Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO<sub>3</sub> addition. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 9, p. 581-591, 1999.

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

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

GOFF, D. 2008. University of Guelph, Canada. **Dairy Chemistry and Physics**. Disponível em <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu>>. Acesso em: 15/12/ 2010.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; 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, n.7, p.685-697, 1995.

HARRINGTON, R. **Asia and UHT milk to lead strong growth in aseptic packaging**. 2009. Disponível em < <http://www.foodproductiondaily.com/content/view/print/250203>> Acesso em: 10/09/2011.

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

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

HILL, R.D.; CRACKER, B.A. The role of lysine residues in the coagulation of casein, **Journal of Dairy Research**, v.35, p. 13-19, 1968.

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

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL A. R.; DALGLEISH, D.G. Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. **International Dairy Journal**, v.20, p. 838-843, 2010.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A. Review: Selected indicators of the quality of thermal processed milk. **Food Science and Technology International**, v.5, n. 2, p. 121-137, 1999.

LOPEZ-FANDIÑO, R.; VILLAMIEL, M.; CORZO, N.; OLANO, A. Assessment of the thermal treatment of milk during continuous microwave and conventional heating. **Journal of Food Protection**, v. 59, n.8, p. 889-892, 1996.

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

MA, Y.; BARBANO, D. M.; HOTCHKISS, J. H.; MURPHY, S.; LYNCH, J. M. Impact of CO<sub>2</sub> addition to milk on selected analytical testing methods. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p.1959-1968, 2001.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. Effect of CO<sub>2</sub> addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 5, p. 1616-1631, 2003.

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

MANJI, B.; KAKUDA, Y.; ARNOTT, D. R. Effect of Storage Temperature on Age Gelation of Ultra-High Temperature Milk Processed by Direct and Indirect Heating Systems. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 12, p. 2994-3001, 1986.

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

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

McKELLAR, R. C., FROEHLICH, D. A., BUTLER, G., CHOLETTE, H.; McMAHON D. J. 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, n. 1, p. 14-17, 1984.

MORALES, FJ; ROMERO, C.; JIMENEZ-PEREZ, S. Characterization of industrial processed Milk by analysis oh heat-induced changes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p.193-200, 2000.

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.

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.

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

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

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, n. 3, p. 323–332, 1971.

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

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

SILVA, P.H.F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Templo Ed., Juiz de Fora, 2004. 128p.

SINGH, H. Heat Stability of Milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.111, 2004.

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

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

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

VAN ASSELT, A.J.; SWEERE, A.P.J.; ROLLEMA, H.S., DE JONG, P. Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. **International Dairy Journal**, v.18, p.531-538, 2008.

VENKATACHALAN, N.; McMAHON, D.J.; SAVELLO, P.A.. Role of protein and lactose interactions in age gelation of UHT processed concentrated skin milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n.7, 1993.

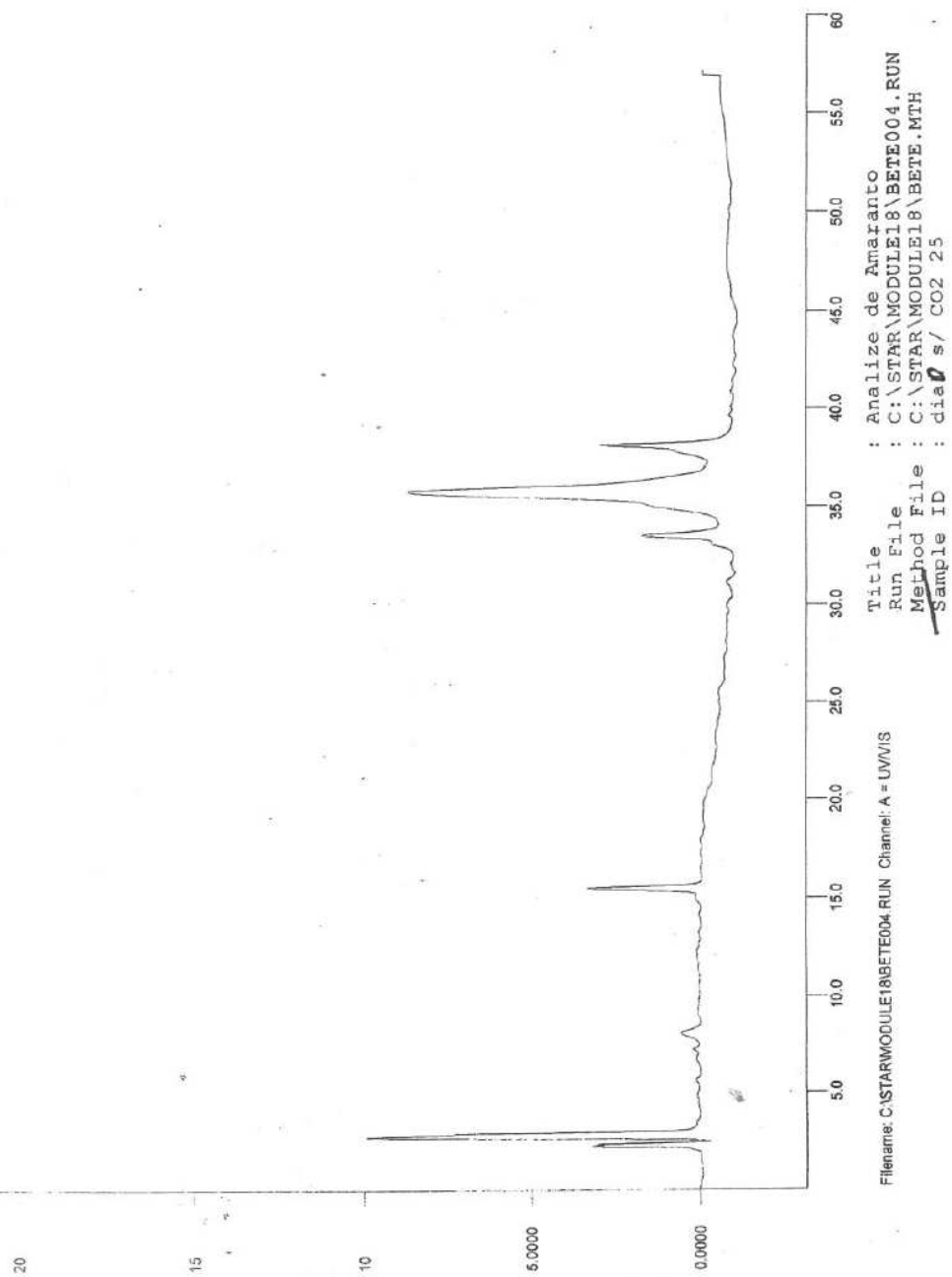
VIANNA, P.C.B.; GIGANTE, M.L. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado adicionado de dióxido de carbono. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.65 p.51-59, 2010.

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

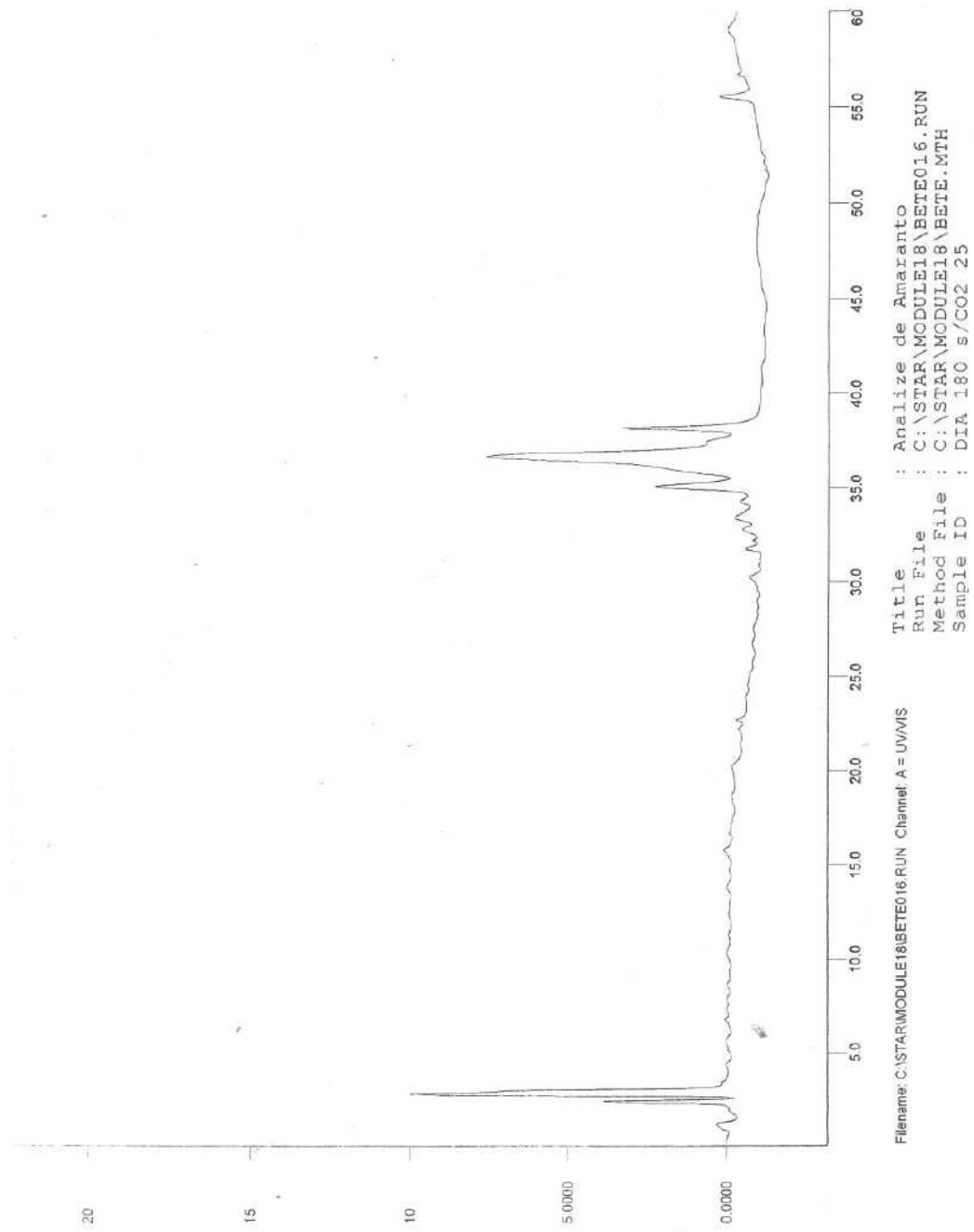
## **ANEXO 1**

Cromatogramas das frações de caseína do leite UHT<sub>controle</sub> e UHT<sub>CO2</sub>  
após 1 e 180 dias de armazenamento.

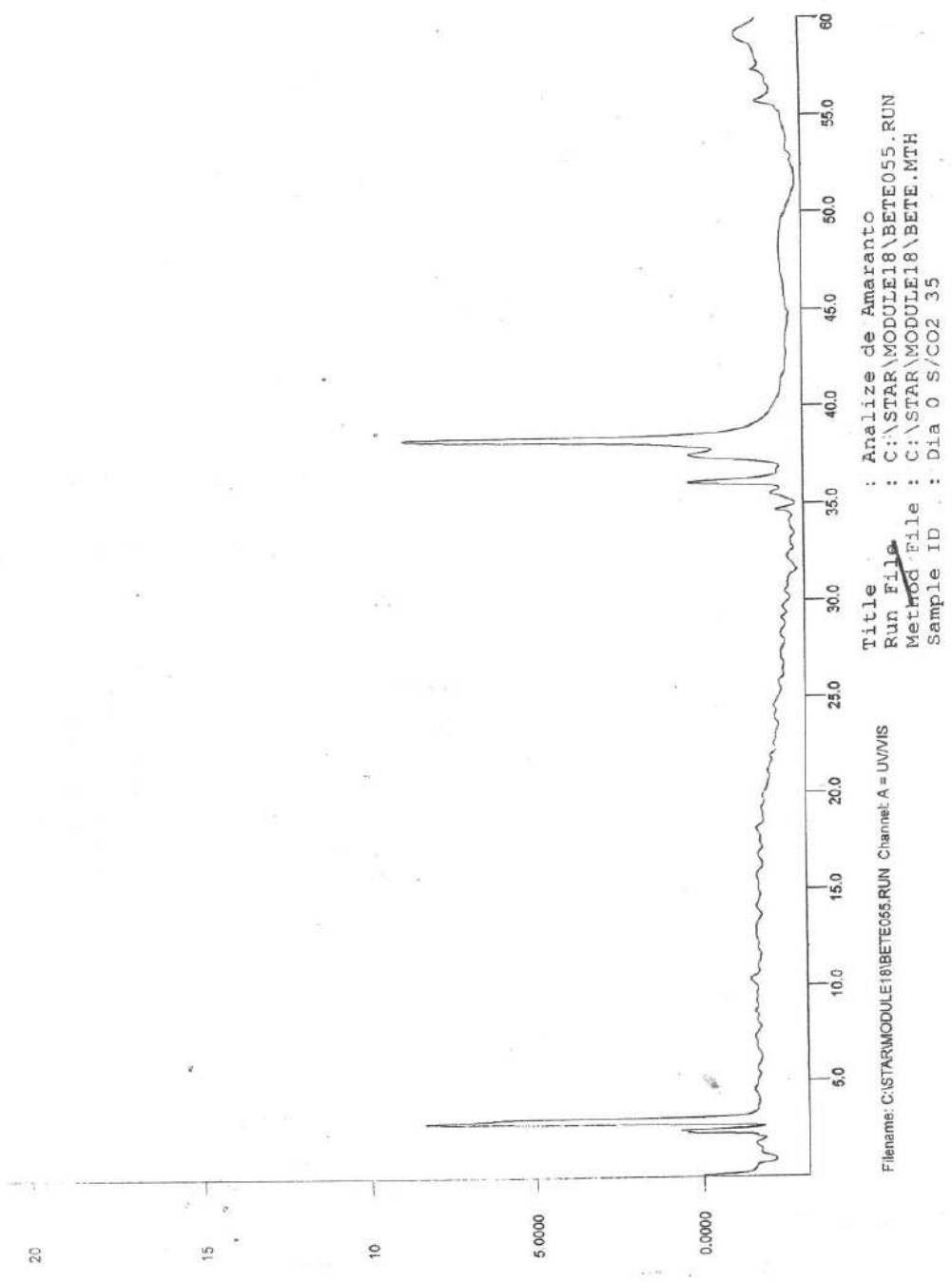




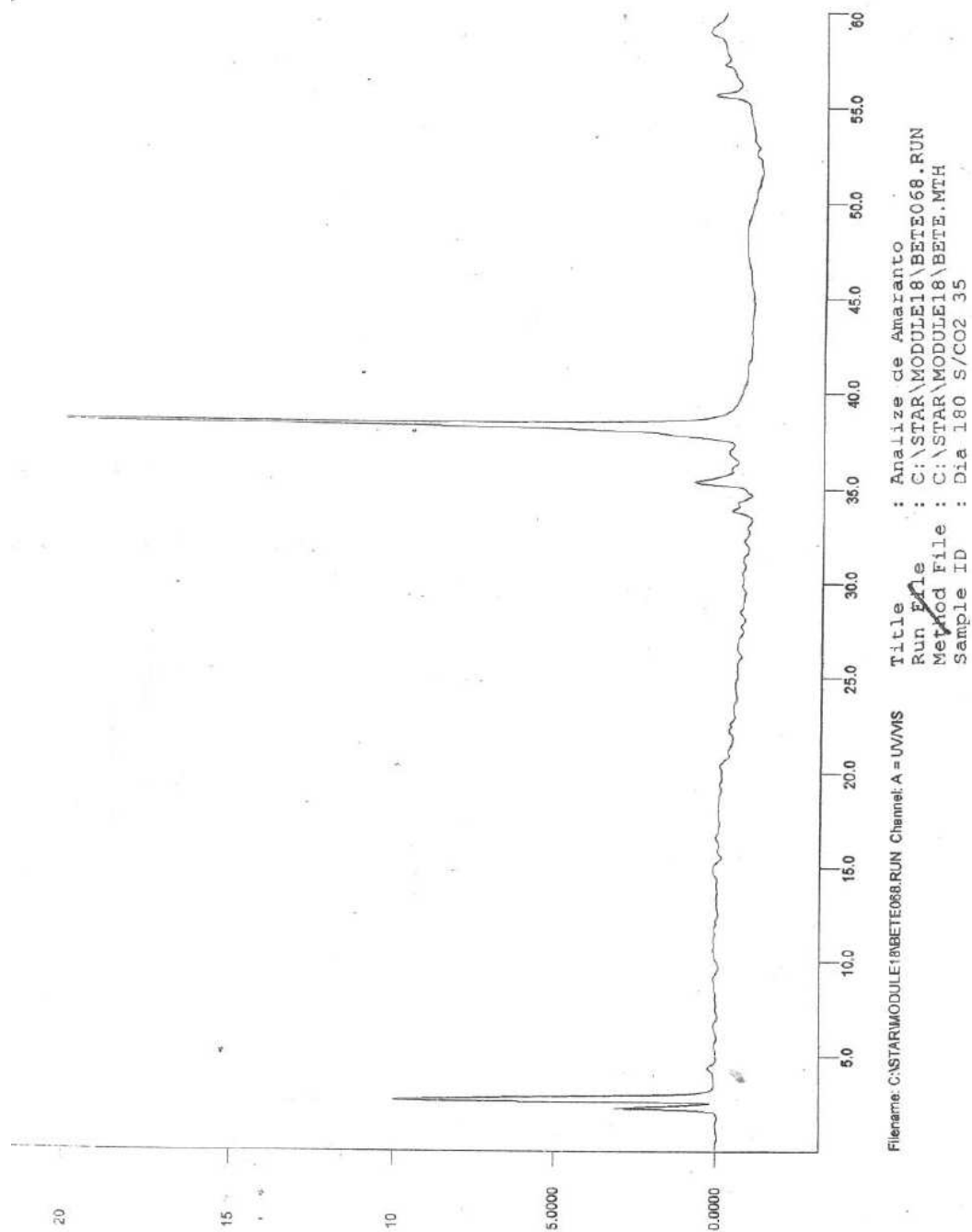
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **não adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 25°C por 1 dia.



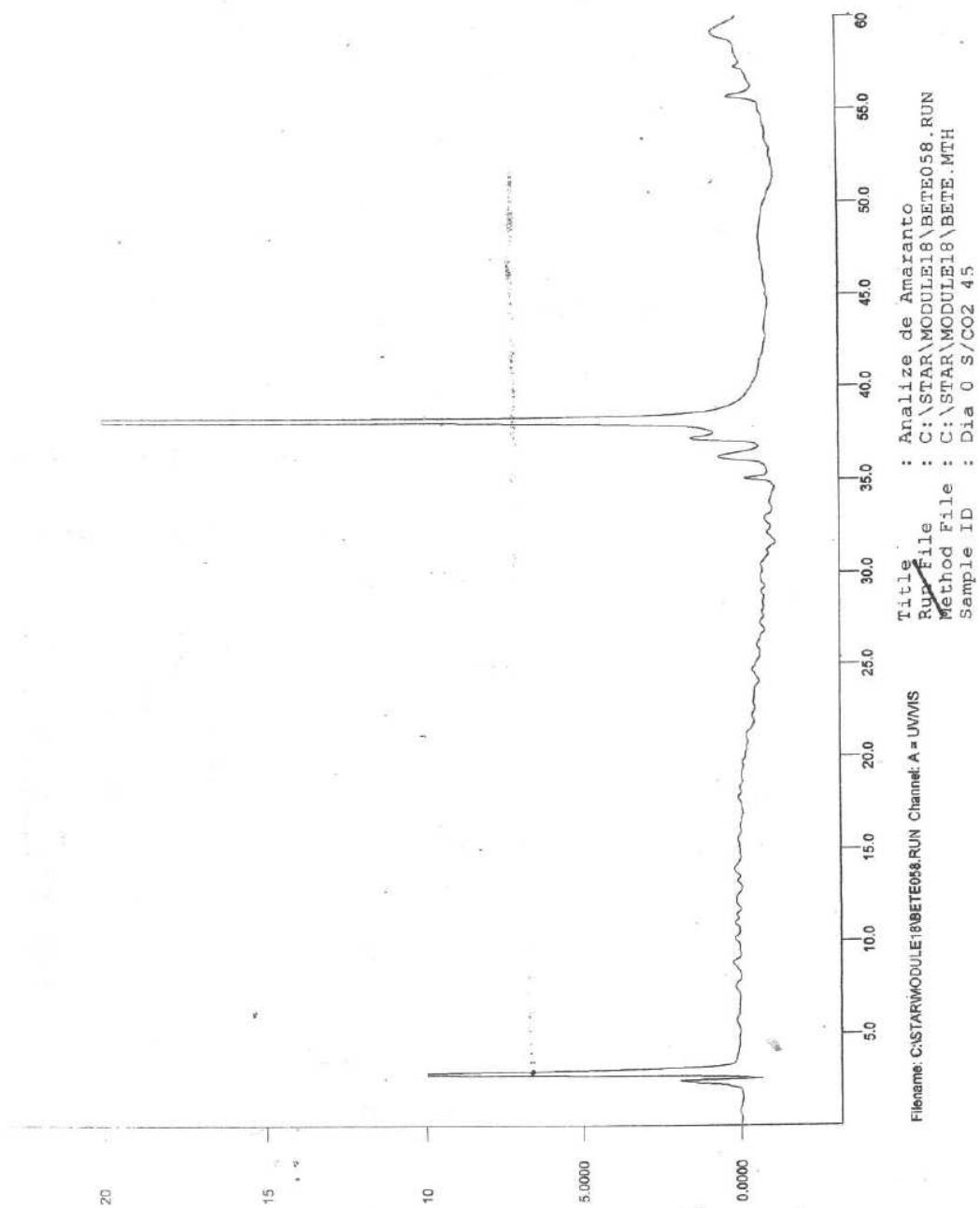
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **não adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 25°C por 180 dias.



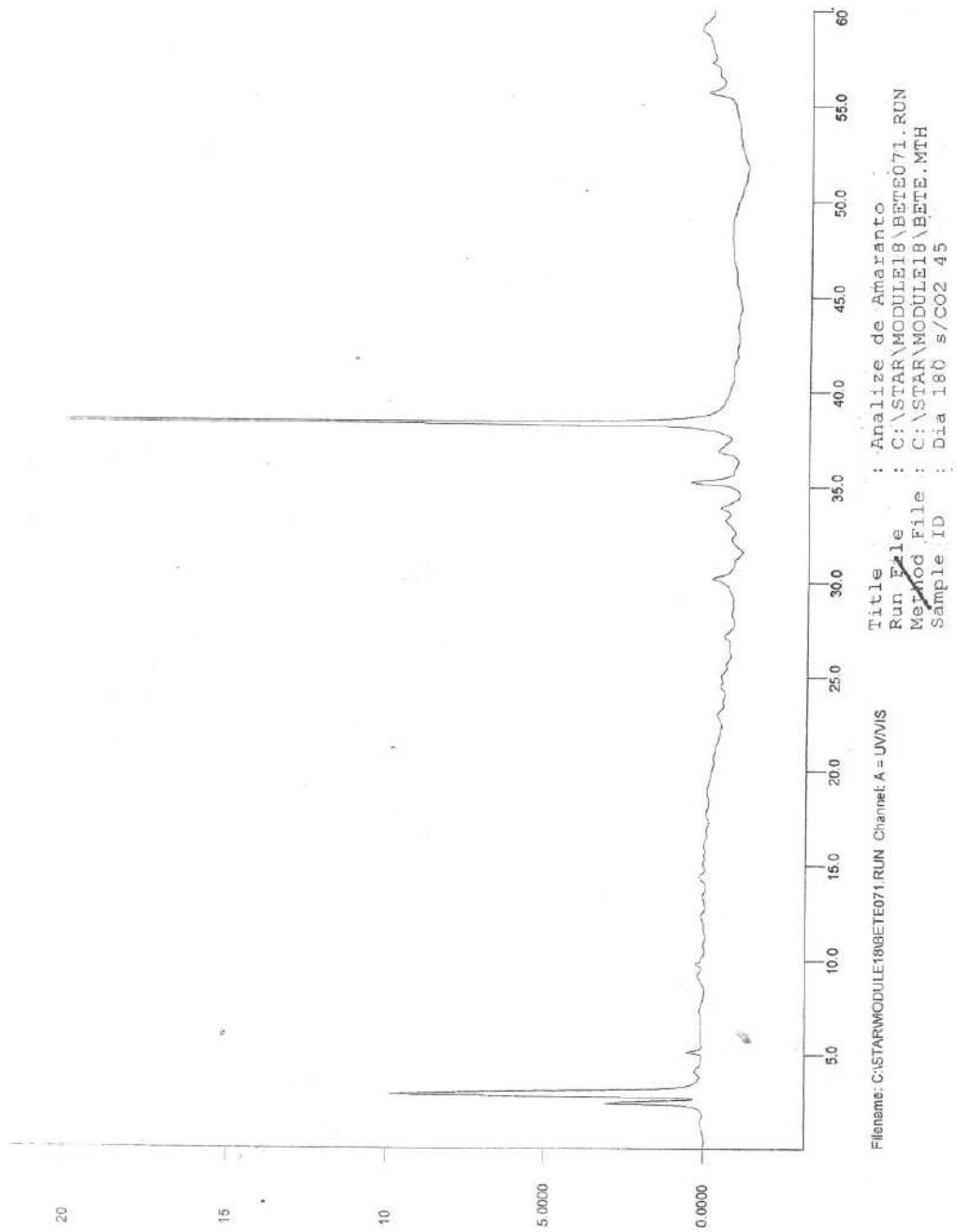
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru não adicionado de CO<sub>2</sub> armazenado a 35°C por 1 dia.



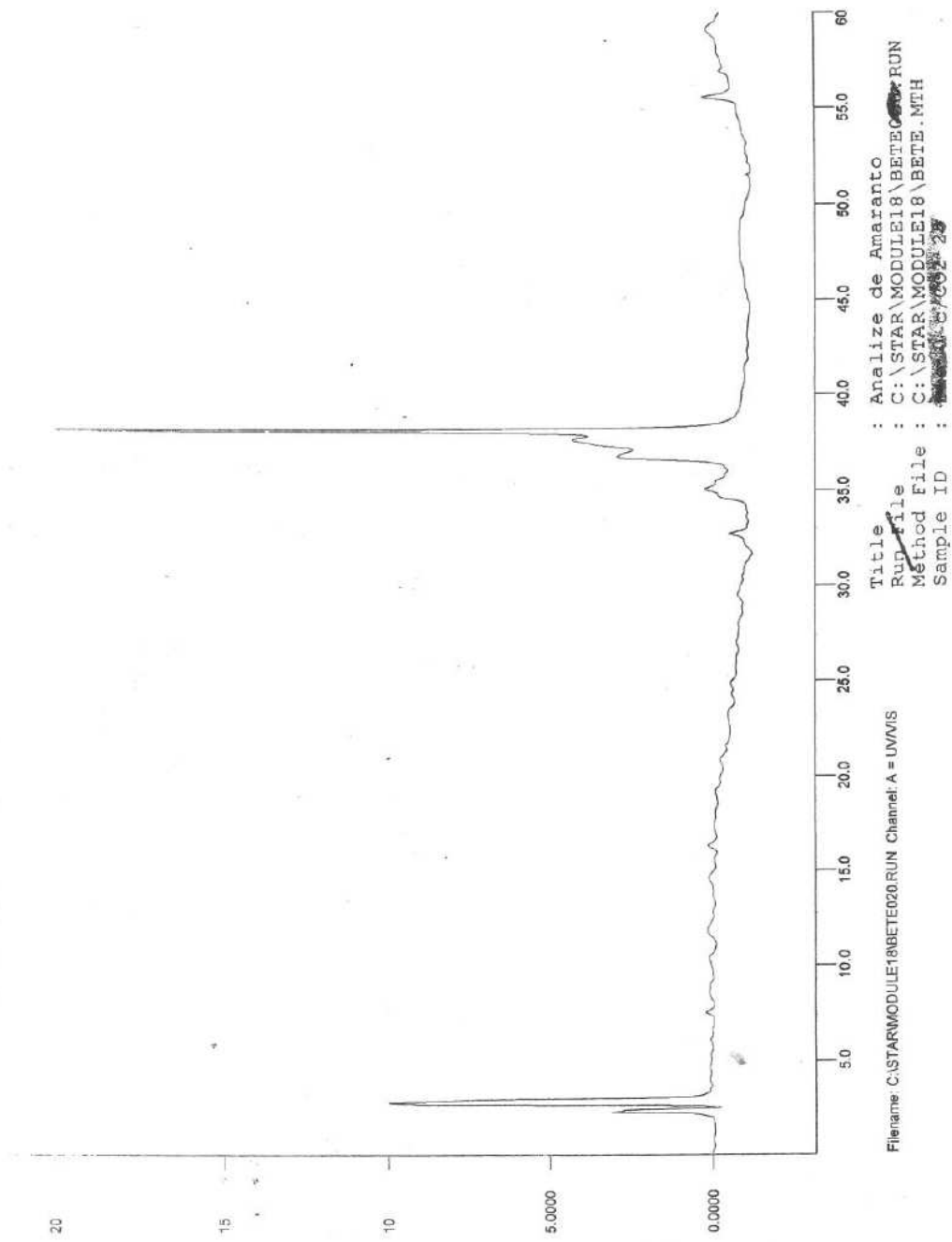
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **não adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 35°C por 180 dias.



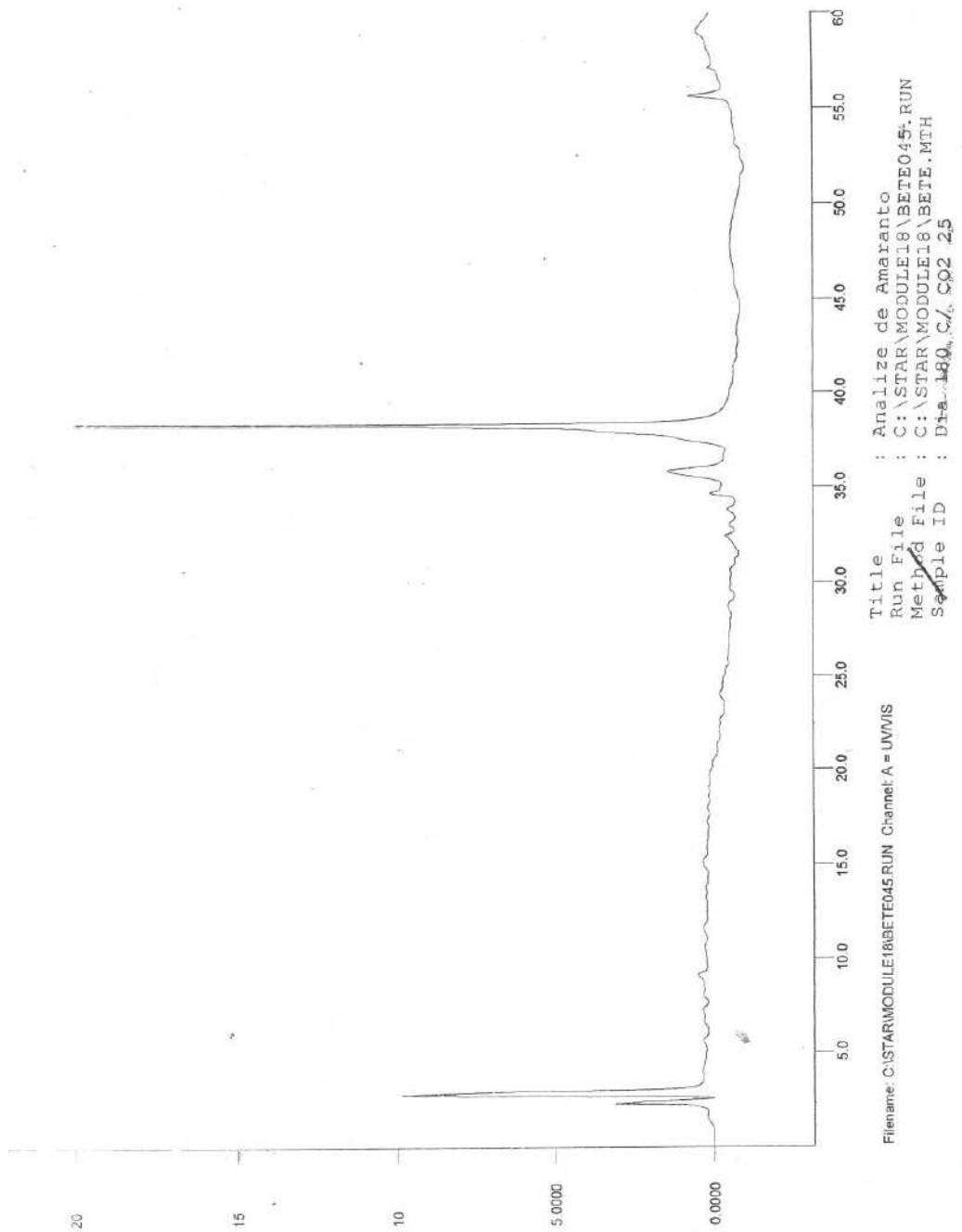
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **não adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 45°C por 1 dia.



Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **não adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 45°C por 180 dias.

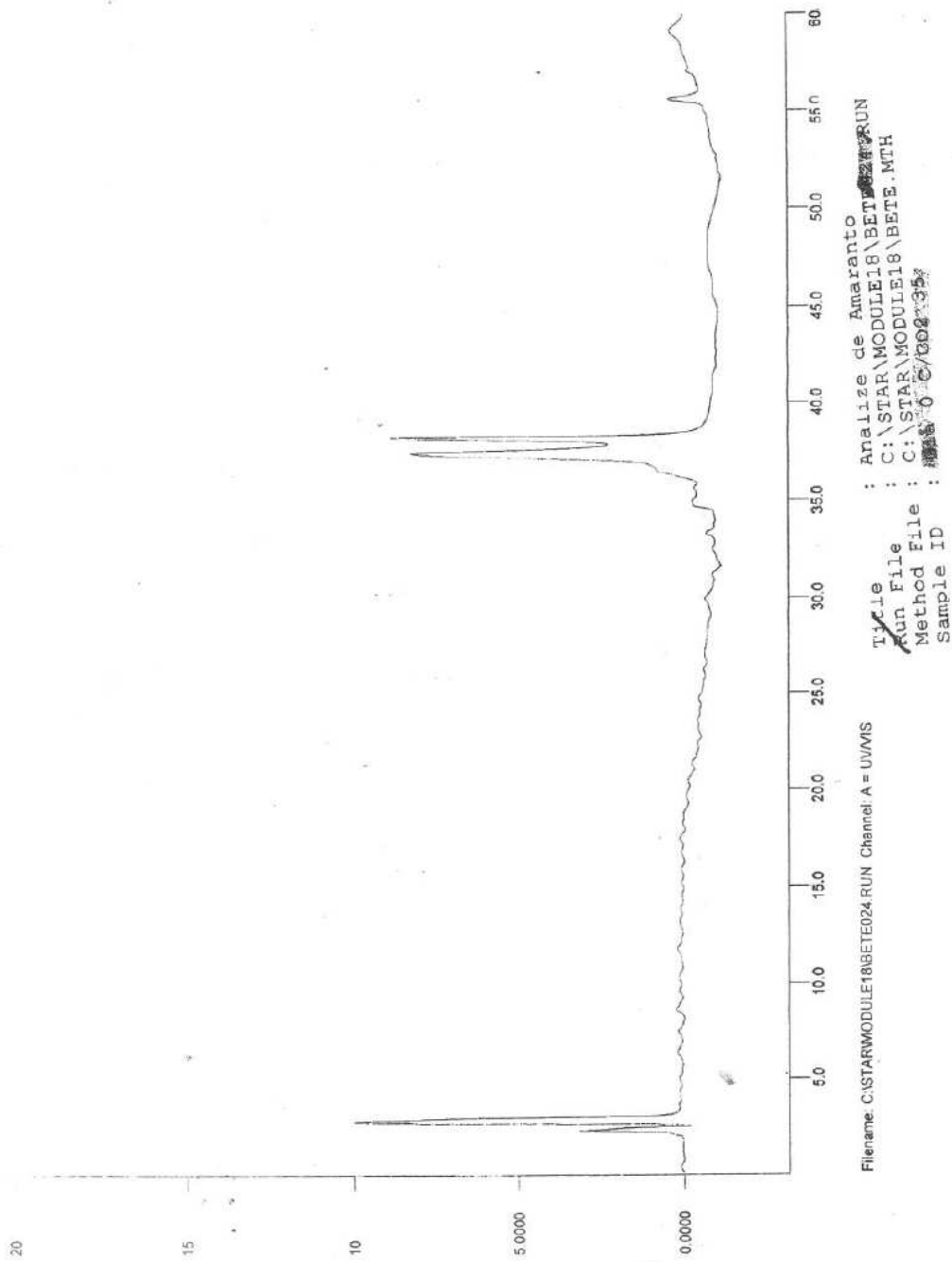


Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 25°C por 1 dia.

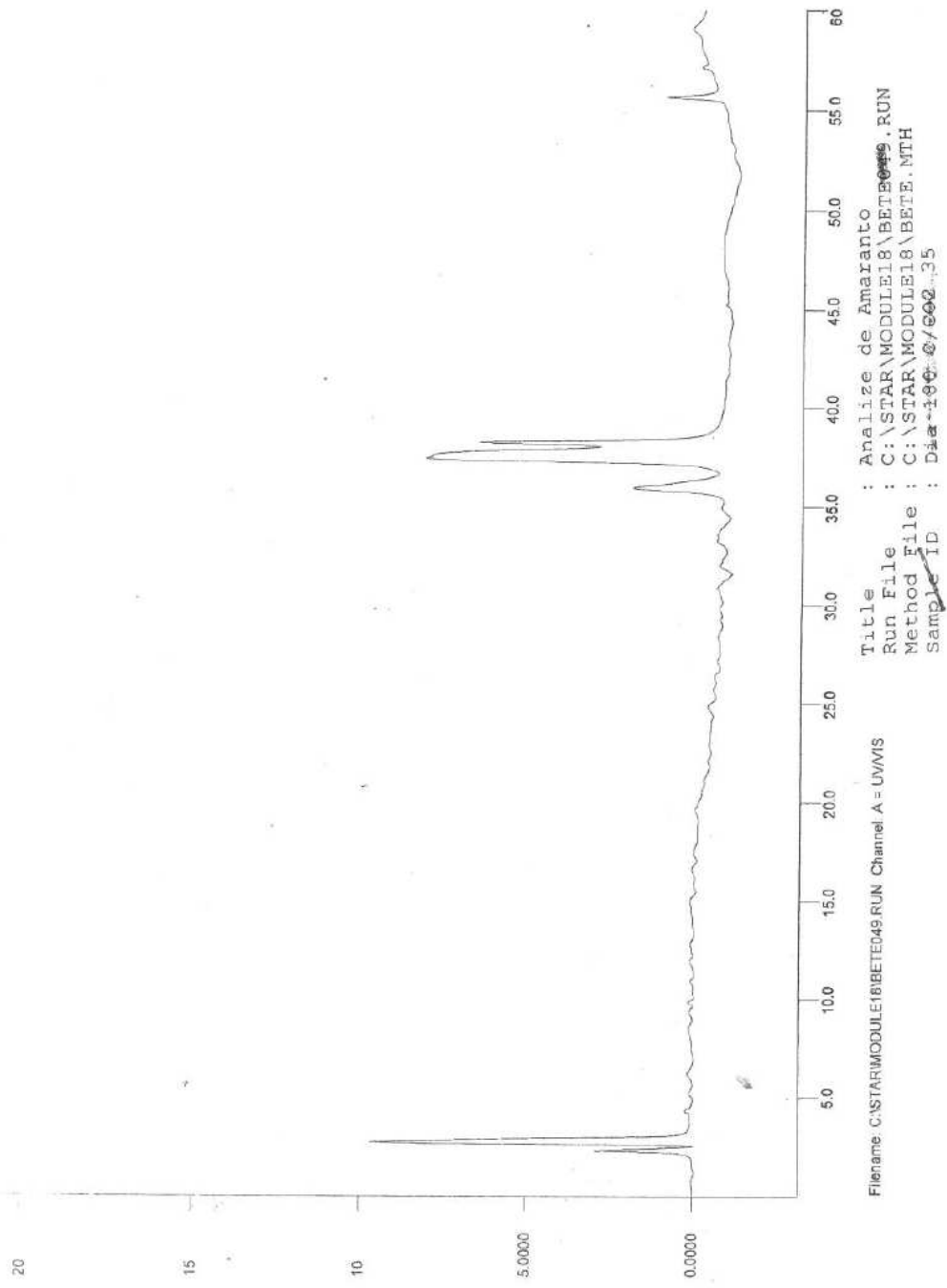


Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 25°C por 180 dias.

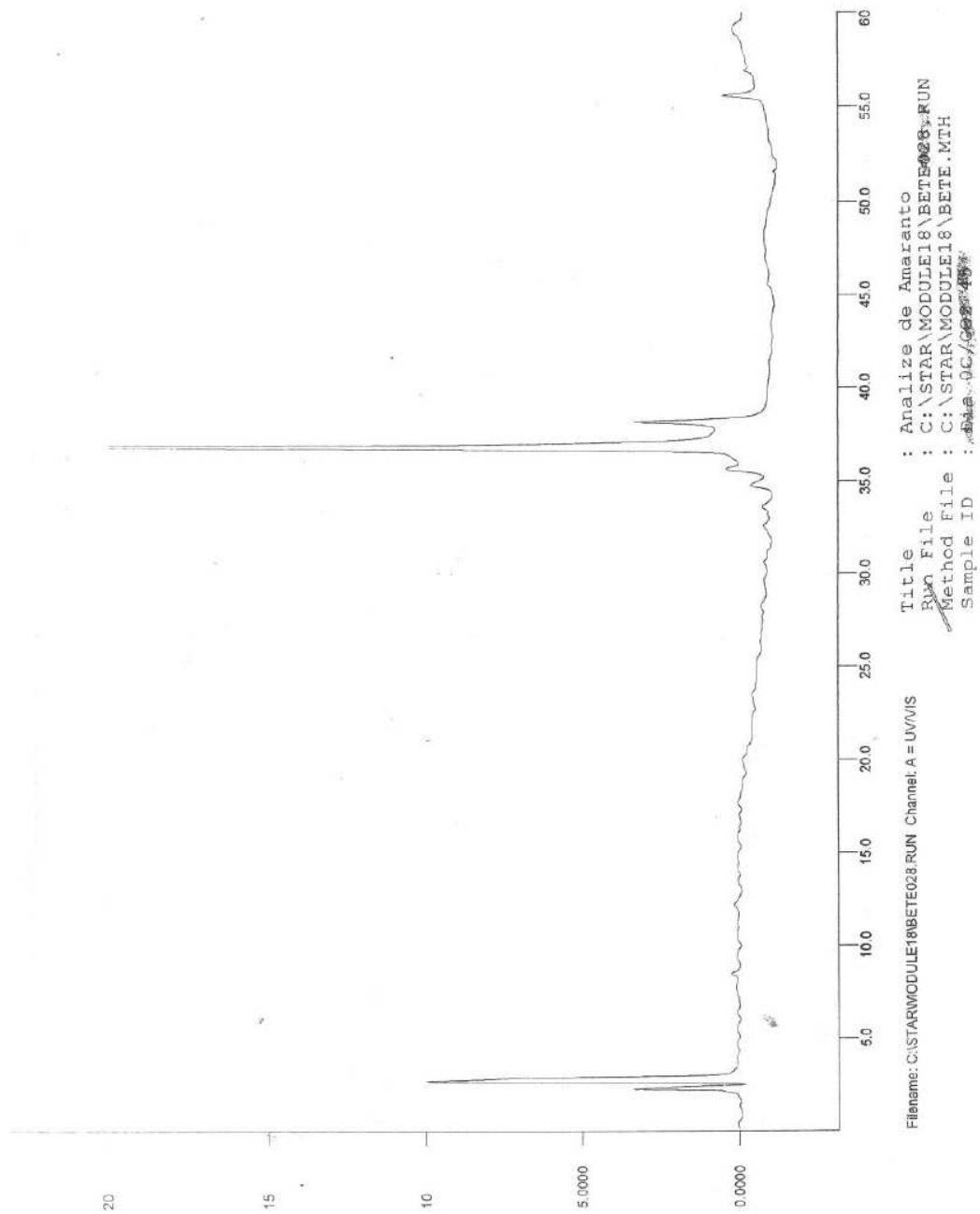




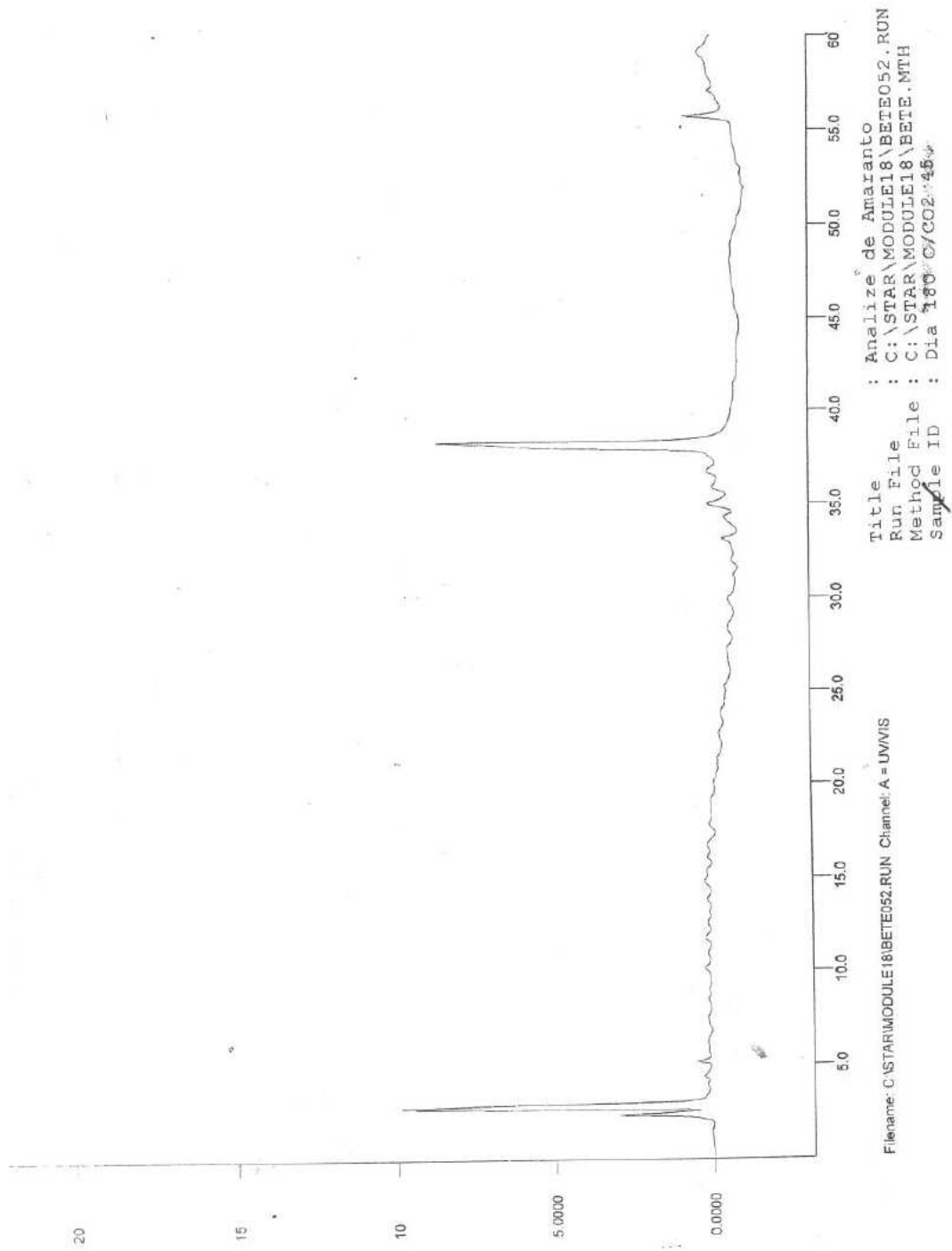
Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 35°C por 1 dia.



Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 35°C por 180 dias.



Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 45°C por 1 dia.



Cromatograma de leite UHT fabricado a partir de leite cru **adicionado** de CO<sub>2</sub> armazenado a 45°C por 180 dias