UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDREZZA MARIA FERNANDES

**Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite
integral obtido por processo UAT direto**

Pirassununga

2007

ANDREZZA MARIA FERNANDES

**Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite
integral obtido por processo UAT direto**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em
Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

F363e	<p>Fernandes, Andrezza Maria</p> <p>Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto. / Andrezza Maria Fernandes – Pirassununga, 2007.</p> <p>109 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.</p> <p>Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.</p> <p>Unitermos: 1.Mastite 2. Qualidade do leite 3. Longa vida 4. Frações protéicas 5. Cromatografia 6. Análises físico-químicas.</p> <p>I. Título.</p>
-------	--

DEDICATÓRIA

*A minha mãe Valéria,
pelo incentivo e por toda a dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pela estrutura disponibilizada aos seus estudantes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP, pelo auxílio financeiro ao projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, incentivo e confiança.

Ao Sr. Celestino dos Santos Pantaleão, pela permissão da coleta de amostras no Laticínio Trevo de Casa Branca.

Aos funcionários do Laticínio Trevo de Casa Branca, pela colaboração na coleta das amostras, em especial José Paulo Consulo, Thaís, Vanderlei Santos Filho, Vivian, e ao fiscal do SIF José Eduardo Riolino.

À Fernanda Bovo, Thais Santos Moretti e Camila Mussarelli, estagiárias de iniciação científica, pela dedicação ao experimento.

À amiga Roice Rosim, técnica do LMMA, pelo auxílio nas análises em sistema CLAE.

Ao Prof. Dr. César Gonçalves de Lima, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. George Rottinghaus, à Giovana Krempel e ao Fernando Schalch, pela colaboração com materiais para o experimento.

À Prof^a. Dr^a. Elizabeth Macedo Viegas e ao Apolinário Ferraz, pela colaboração nas análises de nitrogênio.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral, pela colaboração no uso do colorímetro.

À Fernanda, Lisia e Camila, amigas da República Kissifur, pelos incontáveis momentos de diversão.

Aos amigos Alexandre, Arlindo, Fábio Garcia, Fábio Kaneto, Gustavo, Marina, Sabrina e Samantha, pelos momentos de companheirismo e diversão.

Às companheiras do LMMA, Evelise Andreatta e Helena Fagundes.

Aos familiares e amigos que me incentivaram.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FERNANDES, A.M. **Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto.** 2007. 109 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da contagem de células somáticas (CCS) sobre características físico-químicas (pH, acidez, composição, cor), microbiológicas, índices de proteólise e lipólise, formação de compostos de Maillard, viscosidade aparente e frações protéicas do leite integral obtido pelo processamento direto de temperatura ultra alta (UAT). O leite cru foi avaliado quanto ao nível de células somáticas (CS) e características físico-químicas. As amostras de leite foram colhidas em usina de beneficiamento de leite UAT no Estado de São Paulo. O leite cru foi submetido à pasteurização rápida e foi efetuada a esterilização industrial do leite por processo UAT direto, seguido do envase do produto. As análises no leite UAT foram realizadas nos dias 8, 30, 60, 90 e 120 após a fabricação. Quinze lotes de leite UAT foram avaliados para verificar a correlação entre a CCS e as variáveis estudadas. Adicionalmente, os lotes foram categorizados em grupos de baixa, intermediária e alta CCS. No leite cru, houve correlação negativa ($r = -0,54$, $P = 0,04$) entre CCS e níveis de α_{s2} e β -caseína. No leite UAT, o aumento da CCS foi acompanhado de uma diminuição dos níveis de α_{s1} -caseína ($r = -0,56$, $P = 0,03$) e β -caseína ($r = -0,56$, $P = 0,03$) aos 8 dias de armazenamento. No 60º dia após a fabricação a CCS foi correlacionada à diminuição de α_{s2} -caseína ($r = -0,69$, $P = 0,005$). A CCS exerceu efeito significativo ($P = 0,02$) sobre o componente a^* , com maiores ($P = 0,02$) valores para o grupo de alta CCS em relação ao de CCS intermediária, e sobre a β -caseína ($P = 0,02$), com menores ($P = 0,03$) concentrações no grupo de alta CCS comparado ao de CCS baixa. Os valores de pH, L^* , proteína verdadeira e caseína apresentaram diminuição significativa ao longo do armazenamento. Contrariamente, a acidez, o componente a^* , os ácidos graxos livres, a viscosidade e a proteólise aumentaram significativamente. A quantidade de caseína em relação à proteína verdadeira foi negativamente correlacionada à CCS no 120º dia de armazenamento. Observou-se redução significativa nas concentrações de frações protéicas durante o armazenamento, com exceção da α_{s2} -caseína. A CCS no leite cru utilizado para a fabricação de leite UAT pode prejudicar a qualidade do produto por possíveis alterações decorrentes da proteólise no final da vida de prateleira.

Palavras-chave: Mastite, qualidade do leite, longa vida, frações protéicas, cromatografia, análises físico-químicas.

ABSTRACT

FERNANDES, A.M. **Effects of somatic cell levels on quality of whole milk obtained by UHT direct process.** 2007. 109 p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

The aim of this study was to evaluate the effects of somatic cell counts (SCC) on physico-chemical characteristics (pH, acidity, composition, color), microbiology, proteolysis and lipolysis indexes, Maillard compound formation, apparent viscosity and protein fractions of whole milk obtained by direct ultra high temperature (UHT) process. The raw milk was analyzed for somatic cell (SC) levels and physico-chemical characteristics. Milk samples were collected in a dairy plant in São Paulo State. Raw milk was submitted to HT-ST pasteurization and industrial sterilization was taken by direct UHT process, followed by the packing. UHT milk analyses were conducted on days 8, 30, 60, 90 and 120 of storage. Fifteen batches of UHT milk were evaluated for correlations between SCC and the parameters studied. Additionally, UHT milks were categorized in selected groups of low, intermediate and high SCC. Raw milk presented a negative correlation ($r = -0.54$, $P = 0.04$) between CSS and levels of α_{s2} and β -casein. In UHT milk, SCC increase was followed by a reduction of α_{s1} -casein ($r = -0.56$, $P = 0.03$) and β -casein ($r = -0.56$, $P = 0.03$) concentrations on the 8th day of storage. On 60th day of storage, SCC was correlated with the reduction ($r = -0.69$, $P = 0.005$) on α_{s2} -casein concentration. SCC had significant effect on component a^* ($P = 0.02$), which values were higher ($P = 0.02$) on high SCC group compared to the intermediate SCC group, and on β -casein ($P = 0.02$), with lower ($P = 0.03$) concentrations in high SCC group than in low SCC group. Values of pH, L^* , true protein and casein presented significant reduction during storage. Conversely, acidity, component a^* , free fatty acids, viscosity and proteolysis increased significantly. Casein in relation to true protein was negatively correlated with SCC on 120th day of storage. It was observed a significant reduction on protein fractions concentrations in UHT milk during storage, except for α_{s2} -casein. SCC in raw milk used for UHT milk production may prejudice the quality of the product through alterations caused by proteolysis in the end of shelf life.

Keywords: Mastitis, milk quality, long life, protein fractions, chromatography, physico-chemical analyses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do sistema da enzima plasmina no leite (BASTIAN e BROWN, 1996).....	29
Figura 2. Usina de beneficiamento de leite UAT: a-Silo de armazenamento do leite cru. b-Trocadores de calor. c-Envasadora asséptica.....	38
Figura 3. Fluxograma da amostragem dos leites cru, pasteurizado e UAT. 1 e 2 – Amostras de leite cru; 3 – Amostras de leite pasteurizado; 4 – Amostras de leite UAT.....	39
Figura 4. Avaliação do nível de células somáticas no leite cru.	40
Figura 5. Etapas da determinação por CLAE de hidroximetilfurfural no leite UAT: a-Centrifugação. b- Medida do volume final. c- Filtração. d- Injeção no sistema CLAE...	41
Figura 6. Exemplo de curva de calibração obtida na análise cromatográfica de hidroximetilfurfural em leite.	43
Figura 7. Etapas da análise de ácidos graxos livres: a- Amostras após a centrifugação. b-Retirada do sobrenadante. c- Amostra com reativo de cor. d- Leitura em espectrofotômetro.....	44
Figura 8. Exemplo de curva de calibração obtida para a avaliação de ácidos graxos livres (AGL).....	44
Figura 9. Etapas da determinação por CLAE de frações protéicas no leite UAT. a- Amostras em repouso. b- Centrifugação. c- Filtração. d- Injeção no sistema CLAE.....	46
Figura 10. Exemplos de curvas de calibração obtidas na análise cromatográfica das frações de proteínas do leite.	47
Figura 11: Fluxograma das operações para o processamento do leite UAT.	48
Figura 12. Avaliação da cor do leite UAT através dos componentes L^* , a^* e b^*	51
Figura 13. Equipamento utilizado para a avaliação da viscosidade aparente do leite UAT. ...	51
Figura 14. Contagem de microrganismos mesófilos no leite cru de 15 lotes experimentais, de acordo com o mês de colheita das amostras.	56
Figura 15. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos, microbiológicos e proteínas do leite cru.	58
Figura 16. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos, microbiológicos e proteínas do leite pasteurizado.....	60
Figura 17. Evolução do pH do leite UAT durante o armazenamento.	62
Figura 18. Evolução da acidez titulável do leite UAT durante o armazenamento.....	63
Figura 19. Evolução da luminosidade (L^*) do leite UAT durante o armazenamento.	66
Figura 20. Evolução do componente a^* do leite UAT durante o armazenamento.....	67
Figura 21. Valores médios do componente a^* do leite UAT de acordo com a CCS.	67

Figura 22. Cromatogramas obtidos na análise de hidroximetilfurfural (HMF): a-Padrão contendo 0,096 µg HMF/mL. b-Amostra de leite contendo 13,0 µg de HMF/100 mL.	69
Figura 23. Evolução da concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante o armazenamento.....	72
Figura 24. Evolução da viscosidade aparente do leite UAT durante o armazenamento.	76
Figura 25. Evolução do percentual de proteína verdadeira do leite UAT durante o armazenamento.....	78
Figura 26. Evolução do percentual de caseína do leite UAT durante o armazenamento.	79
Figura 27. Evolução do índice de proteólise do leite UAT durante o armazenamento.	80
Figura 28. Cromatograma obtido na análise das frações protéicas. Padrão contendo 4,0 mg/mL de α_s -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína.	81
Figura 29. Evolução da concentração de α_{s1} -caseína do leite UAT durante o armazenamento.....	83
Figura 30. Concentração média de β -caseína do leite UAT de acordo com a CCS.....	85
Figura 31. Evolução da concentração de β -caseína do leite UAT durante o armazenamento.	86
Figura 32. Evolução da concentração de κ -caseína do leite UAT durante o armazenamento.	87
Figura 33. Cromatogramas das frações protéicas de leite cru e UAT. a-Cru; b-UAT dia 8; c-UAT dia 30; d-UAT dia 60; e-UAT dia 90; f-UAT dia 120.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru	55
Tabela 2. Resultados de proteínas do leite cru.....	57
Tabela 3. Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado ¹	59
Tabela 4. Resultados de proteínas do leite pasteurizado ¹	59
Tabela 5. Resultados de pH do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	61
Tabela 6. Resultados de acidez titulável do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	62
Tabela 7. Resultados percentuais da gordura do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	63
Tabela 8. Resultados percentuais de sólidos totais do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	64
Tabela 9. Resultados percentuais de sólidos não gordurosos do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	64
Tabela 10. Resultados do componente L* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	65
Tabela 11. Resultados do componente a* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	66
Tabela 12. Resultados do componente b* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	68
Tabela 13. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.	68
Tabela 14. Recuperação média e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de hidroximetilfurfural (HMF).	70
Tabela 15. Resultados de hidroximetilfurfural (HMF) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	71
Tabela 16. Correlações entre CCS e hidroximetilfurfural (HMF) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.....	71
Tabela 17. Resultados da concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	72
Tabela 18. Correlações entre CCS e concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.....	73
Tabela 19. Resultados de viscosidade aparente do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	74

Tabela 20. Correlações entre CCS e viscosidade aparente do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.....	74
Tabela 21. Resultados percentuais de proteína total do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	77
Tabela 22. Resultados percentuais de proteína verdadeira do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	77
Tabela 23. Resultados percentuais de caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	78
Tabela 24. Resultados do índice de proteólise, expresso como quantidade de caseína em relação à proteína verdadeira, do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	80
Tabela 25. Correlações entre CCS e resultados de análises de proteínas do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.....	81
Tabela 26. Recuperação média e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de proteínas.	82
Tabela 27. Resultados da concentração de α_{s1} -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	83
Tabela 28. Resultados da concentração de α_{s2} -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	84
Tabela 29. Resultados da concentração de β -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	85
Tabela 30. Resultados da concentração de κ -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento ¹	86
Tabela 31. Correlações entre CCS e concentrações das frações protéicas do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
C	Caseína
CCS	Contagem de células somáticas
CHM	Clorofórmio:Heptano:Metanol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CS	Células somáticas
cP	Centipoise
g	Grama
HMF	Hidroximetilfurfural
HT-ST	<i>High Temperature – Short Time</i>
IC	Índice crioscópico
Ig	Imunoglobulina
kg	Quilograma
L	Litro
LLP	Lipase lipoprotéica
LMMA	Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos
log	Logarítmo
meq	Miliequivalente
MGGL	Membrana do glóbulo de gordura do leite
mg	Miligrama
min.	Minutos
mL	Mililitro
NMP	Número mais provável
NNC	Nitrogênio não-caseinoso
NNP	Nitrogênio não-protéico
NT	Nitrogênio total
PV	Proteína verdadeira
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
s	Segundos
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
UAT	Temperatura ultra-alta
WMT	<i>Wisconsin Mastitis Test</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kapa
a^*	Componente vermelho-verde
b^*	Componente amarelo-azul
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
$^{\circ}\text{H}$	Graus Hortvert
L^*	Luminosidade
P	Probabilidade
r	Coeficiente de correlação
r^2	Coeficiente de determinação
μ	Micro
$=$	Igual
$>$	Maior
$<$	Menor
$\pm$	Mais ou menos
$^{\circ}$	Marca registrada
TM	<i>Trade mark</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS	16
2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MASTITE E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS	16
2.3 EFEITOS DAS CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE	17
2.3.1 <i>Proteínas</i>	18
2.3.2 <i>Lactose</i>	20
2.3.3 <i>Gordura</i>	21
2.3.4 <i>Minerais</i>	22
2.3.5 <i>Sólidos Totais</i>	22
2.3.6 <i>Alterações microbiológicas</i>	22
2.4 EFEITOS DAS CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE A QUALIDADE DOS PRODUTOS LÁCTEOS	23
2.4.1 <i>Leites Pasteurizado e UAT</i>	23
2.4.2 <i>Outros Produtos Lácteos</i>	25
2.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO LEITE.....	26
2.5.1 <i>Proteólise</i>	27
2.5.2 <i>Lipólise</i>	30
2.6 ASPECTOS DA TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DO LEITE UAT	33
2.6.1 <i>Importância da Viscosidade do Leite UAT</i>	34
2.6.2 <i>Importância dos Compostos de Maillard no Leite UAT</i>	35
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 DESCRIÇÃO DA USINA DE PROCESSAMENTO DE LEITE UAT	38
4.2 AMOSTRAGEM DO LEITE E AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CÉLULAS SOMÁTICAS	39
4.3 AVALIAÇÃO DO LEITE CRU.....	40
4.3.1 <i>Avaliação Microbiológica</i>	40
4.3.2 <i>Avaliação Físico-Química</i>	40
4.3.3 <i>Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)</i>	41
4.3.4 <i>Avaliação da Lipólise</i>	43
4.3.5 <i>Avaliação da Proteólise</i>	45

4.4 PROCESSAMENTO DO LEITE UAT	48
4.4.1 Tratamento térmico do Leite	48
4.4.2 Envase	49
4.5 AVALIAÇÃO DO LEITE PASTEURIZADO	49
4.5.1 Avaliação Microbiológica	49
4.5.2 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)	50
4.5.3 Avaliação da Lipólise	50
4.5.4 Avaliação da Proteólise	50
4.6 AVALIAÇÃO DO LEITE UAT	50
4.6.1 Avaliação Microbiológica	50
4.6.2 Avaliação Físico-Química	50
4.6.3 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)	51
4.6.4 Avaliação da Lipólise	51
4.6.5 Avaliação da Viscosidade	51
4.6.6 Avaliação da Proteólise	52
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 AVALIAÇÃO DO LEITE CRU	54
5.2 AVALIAÇÃO DO LEITE PASTEURIZADO	58
5.3 AVALIAÇÃO DO LEITE UAT	60
5.3.1 Avaliação Microbiológica	60
5.3.2 Avaliação Físico-Química	61
5.3.3 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)	69
5.3.4 Avaliação da Lipólise	71
5.3.5 Avaliação da Viscosidade	74
5.3.6 Avaliação da Proteólise	76
6 CONCLUSÕES	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8 ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm demonstrado a importância do consumo de leite e produtos lácteos para o crescimento, desenvolvimento e também para auxílio no combate a doenças crônicas. A inflamação da glândula mamária, denominada mastite, destaca-se como um dos principais fatores que diminuem a qualidade do leite destinado ao consumo humano, acarretando aumento na liberação de células somáticas (CS) no leite. Considerando-se a relação direta entre a ocorrência de mastite e a perda das características do leite, justifica-se o crescente interesse na realização de estudos que avaliem o impacto da contagem de células somáticas (CCS) sobre a qualidade do leite e seus derivados. Nas últimas décadas, muitos países estabeleceram limites de tolerância para CS no leite, cujos valores compreendem: 750.000 CS/mL nos Estados Unidos, 400.000 CS/mL na União Européia e Nova Zelândia, e 500.000 CS/mL no Canadá (PHILPOT, 2002, PHILPOT e NICKERSON, 2002). Adicionalmente, diversos países têm instituído o sistema de pagamento do leite por qualidade, de acordo com parâmetros de composição, físico-químicos e de higiene. Neste contexto, muitas indústrias de laticínios no Brasil têm incluído a CCS entre os critérios de pagamento por qualidade, a exemplo do que já ocorre em outros países.

Historicamente, a legislação brasileira sempre contemplou apenas as características físico-químicas do leite, como acidez, teores de gordura e sólidos totais, densidade e índice crioscópico, além da contagem global de microrganismos mesófilos (MAPA, 1980). Em setembro de 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento reformulou, através da Instrução Normativa Nº 51, os itens utilizados para a avaliação da qualidade do leite, incluindo, pela primeira vez no Brasil, a CCS como um dos critérios para aceitação do leite. Esta Normativa estabeleceu o limite máximo legal de 1.000.000 CS/mL, vigorando a partir de 1º de julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e a partir de 2007 nas regiões Norte e Nordeste (MAPA, 2003). Desta forma, é de fundamental importância o estudo do impacto da CCS sobre a qualidade do leite e derivados, uma vez que a adoção de novos critérios para avaliação da qualidade do leite deve ser embasada em resultados de pesquisa que subsidiem as utilidades destes parâmetros.

Entre os produtos lácteos, o leite UAT se destaca por ser um produto de longa vida de prateleira, o que proporciona comodidade ao consumidor, principalmente em grandes centros urbanos. No entanto, a longevidade comercial do leite UAT implica em uma maior suscetibilidade do produto aos fatores que afetam sua qualidade. As vendas de leite UAT no Brasil aumentaram de 204 milhões de litros em 1991 (5% do total de leite fluido) para 4.804 bilhões de litros em 2005, representando 74% do volume total de leite fluido comercializado

no país (ABLV, 2006). Embora seja evidente a importância econômica do leite UAT no mercado consumidor de produtos lácteos e na dieta da população brasileira, poucas pesquisas deram ênfase à avaliação da qualidade do produto (CUNHA, 2001).

Com base nos aspectos mencionados, o presente trabalho foi delineado com a finalidade de avaliar os efeitos da CCS sobre a qualidade do leite UAT ao longo do armazenamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos Nutricionais do Leite e Produtos Lácteos

O leite é há muito tempo reconhecido por fornecer nutrientes para o adequado crescimento e desenvolvimento do ser humano. As pesquisas nos últimos 30 a 40 anos têm demonstrado que o leite e os produtos lácteos podem auxiliar na redução dos riscos de doenças crônicas. Evidências científicas demonstram que a ingestão adequada de cálcio e outros nutrientes dos produtos lácteos reduz o risco de osteoporose, conseqüentemente reduzindo o risco de fraturas decorrentes desta enfermidade. Estudos clínicos comprovaram que o consumo de produtos lácteos em níveis recomendados pode auxiliar na redução da pressão sanguínea em indivíduos com pressão normal ou elevada, contribuindo para evitar a hipertensão. Os resultados indicam que peptídeos específicos associados à caseína e proteínas do soro podem diminuir significativamente a pressão sangüínea (HUTH, DIRIENZO e MILLER, 2006).

O leite e os produtos lácteos também contribuem para a perda de peso e de gordura corporal. Diversos estudos recomendam a ingestão de cálcio, vitamina D e produtos lácteos contra o câncer de cólon. Adicionalmente, o ácido linoléico conjugado, um ácido graxo naturalmente encontrado em produtos lácteos, confere uma variedade de benefícios anticarcinogênicos em animais experimentais, sendo especialmente eficaz na proteção contra o câncer de mama. Por estas razões, o *Dietary Guidelines for Americans 2005* recomenda que os americanos aumentem o consumo de leite e produtos lácteos para três porções por dia (HUTH, DIRIENZO e MILLER, 2006).

2.2 Considerações Gerais sobre Mastite e Contagem de Células Somáticas

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, de origem predominantemente bacteriana (IDF, 1987). Em processos infecciosos do tecido glandular, observa-se aumento na liberação de células de diversos tipos no leite, as quais podem ser enumeradas no produto através de técnicas de contagem de células somáticas (FONSECA e SANTOS, 2000).

A CCS tem sido utilizada em países desenvolvidos há mais de 25 anos, quando se tornou uma prática acessível aos produtores pelo advento de equipamentos eletrônicos. Atualmente tem grande importância na estimativa de perdas na produção e como indicativo da qualidade do leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

As células somáticas (CS) estão presentes normalmente no leite e são constituídas, em sua grande maioria, por leucócitos, sobretudo neutrófilos, e células de descamação do epitélio secretor da glândula (BIBALKE, 1984; NICKERSON, 1994). Em um quarto mamário infectado, aproximadamente 99% de todas as células do leite são leucócitos, enquanto que o percentual remanescente é formado por células epiteliais secretoras do tecido mamário. A distribuição das células em uma glândula sadia é de 60% de macrófagos, 25% de linfócitos e 15% de neutrófilos (PHILPOT e NICKERSON, 2002). Durante a evolução da mastite há um influxo maior dessas células para a glândula mamária, conduzindo à elevação do seu número no leite (BIBALKE, 1984; NICKERSON, 1994).

A CCS é um fenômeno dinâmico, estando sujeita a variações significativas. O estágio de lactação, a idade da vaca, a estação do ano, o tamanho do rebanho, o nível de produção de leite e a presença de outras doenças são fatores que podem afetar a concentração de células somáticas no leite. Porém, o fator que exerce maior influência sobre o nível de CS do leite é a infecção intramamária. As vacas com mastite subclínica contribuem com um número substancial de CS no leite do rebanho (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

2.3 Efeitos das Células Somáticas sobre a Composição do Leite

A composição do leite é determinante para estabelecer o seu valor, para ser processado pela indústria. Originalmente um leite era considerado de qualidade elevada somente em função do conteúdo de gordura, mas atualmente a proteína é o sólido com maior valor econômico. Portanto, os produtores deveriam buscar aumentar a concentração dos componentes do leite, a indústria deveria remunerar o esforço dos produtores que lhes proporcione maiores benefícios e os consumidores deveriam aceitar pagar o preço justo pelo esforço que vai satisfazer suas necessidades (MONARDES, 2004).

A mastite é uma doença extremamente complexa que resulta em redução na quantidade de leite sintetizado e em mudanças nos níveis de componentes específicos do leite, reduzindo sua qualidade (POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a). A mastite determina consideráveis prejuízos à indústria de laticínios, relacionados às alterações que provoca na composição do leite, reduzindo os teores de cálcio, lactose, caseína e gordura, além de aumentar os níveis de íons sódio, cloro e de proteínas séricas (KITCHEN, 1981; OLIVEIRA, FONSECA e GERMANO, 1999). As alterações de composição do leite ocorrem em consequência à inflamação, que causa diminuição na capacidade de síntese da glândula mamária e aumento da permeabilidade vascular (KITCHEN, 1981; SHUSTER et al., 1991; OLIVEIRA, FONSECA e GERMANO, 1999).

2.3.1 Proteínas

A fração nitrogenada do leite é constituída pela caseína, pelas proteínas do soro e pelos compostos nitrogenados não protéicos. As proteínas do leite pertencem a duas principais categorias, as quais podem ser separadas baseando-se na solubilidade em pH 4,6 a 20°C. Sob estas condições, o grupo das caseínas precipita, e as proteínas que permanecem solúveis são denominadas séricas. Aproximadamente 80% do nitrogênio total do leite de bovinos é constituído por caseína. A caseína bovina pode ser classificada em quatro tipos de proteína com diferentes propriedades: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, perfazendo, respectivamente, 38%, 10%, 34% e 15% da caseína total (FOX et al., 2000). Os pesos moleculares destas frações são 23.600, 25.200, 23.983 e 19.550 para α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, respectivamente (WALSTRA et al., 2001). As caseínas α e β são fosfoproteínas que contêm entre cinco a 13 resíduos de fosfoserina, responsáveis pela sensibilidade das proteínas do leite ao cálcio e pelas áreas hidrofílicas. A κ -caseína contém um grupo éster serina fosfato e é insensível à adição de cálcio (EARLY, 1998).

A fração de proteína sérica do leite de bovinos contém quatro principais proteínas: β -lactoglobulina (50%), α -lactalbumina (20%), soroalbumina (10%) e imunoglobulinas (10%), como IgG₁ (principalmente), IgG₂, IgA e IgM (FOX et al., 2000). As temperaturas de desnaturação das proteínas séricas são 78°C, 62°C e 64°C para a β -lactoglobulina, α -lactalbumina e soroalbumina respectivamente. As imunoglobulinas são muito termolábeis (BROWN, 1988).

O método Kjeldahl para análise de proteínas determina a quantidade de nitrogênio total da amostra. Contribui para o nitrogênio total não somente o nitrogênio protéico, mas também o nitrogênio proveniente de substâncias nitrogenadas não protéicas como bases purínicas e pirimidínicas, creatinina, vitaminas, uréia, aminas e amidas (SGARBIERI, 1996).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (CASS e DEGANI, 2001). Pode-se utilizar para determinação de proteínas a separação das frações protéicas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) em fase reversa (SGARBIERI, 1996). Este método oferece uma resposta quantitativa, precisão e resolução (BOBE et al., 1998).

Os resultados experimentais são conflitantes no que se refere aos efeitos de elevadas CCS no leite sobre a concentração de proteína total do leite medida pela concentração de nitrogênio total. Diversos autores relataram que o leite de vacas com alta CCS apresenta maiores níveis de proteína total, quando comparado ao de vacas saudáveis (MILLER et al., 1983; AULDIST et al., 1995; KLEI et al., 1998; URECH, PUHAN e

SCHÄLLIBAUM, 1998; MARQUES, BALBINOTTI e FISCHER, 2002; SOMERS et al., 2003). Weaver e Kroger (1976) afirmam que a proteína total do leite aumenta com a CCS, assim como as proteínas séricas. Klei et al. (1998) reportaram que um aumento na CCS de 83.000 para 872.500 CS/mL influencia a composição do leite. Assim, o leite com alta CCS apresenta maiores valores de proteína, porém menores teores de caseína como porcentagem da proteína verdadeira.

De forma contrária, Haenlein, Schultz e Zikakis (1973), Mitchell, Fedrick e Rogers (1986) e Verdi et al. (1987) não identificaram diferenças entre os teores de proteína total de vacas com altas CCS e vacas sadias. Rogers et al. (1989) e Bueno et al. (2004) relataram redução no teor de proteína total no leite de vacas com elevada CCS.

Segundo Schultz (1977), os efeitos das mastites sobre a proteína do leite são de natureza qualitativa, uma vez que os valores absolutos de proteína bruta não sofrem alterações significativas. Assim, o leite proveniente de vacas com mastite apresenta menor teor de caseína, que é a proteína nobre do leite, porém há aumento dos níveis de proteínas séricas, como soroalbuminas e imunoglobulinas. Ballou et al. (1995) observaram que a porcentagem de caseína foi significativamente maior quando o leite era proveniente de um grupo de vacas que apresentava baixa CCS em relação a grupos de maiores contagens.

De acordo com Haenlein, Schultz e Zikakis (1973), exceto para proteína total, todas as outras concentrações mudam com o aumento da contagem de leucócitos no leite. Amostras de leite com maiores contagens apresentam menores valores para caseína total, menor relação caseína:proteína total e maiores quantidades de proteínas do soro do que amostras com baixas contagens. Adicionalmente, ocorre um decréscimo nas quantidades de α_{s1} -caseína, β -caseína, β -lactoglobulina e α -lactalbumina, enquanto que as quantidades de imunoglobulinas, soroalbuminas e κ -caseína aumentam (HAENLEIN, SCHULTZ e ZIKAKIS, 1973). O decréscimo da β -caseína é mais pronunciado que o da α_{s1} -caseína (ANDERSON e ANDREWS, 1977; ANDREWS, 1983).

As alterações na caseína compreendem também o balanço entre caseína micelar e solúvel, encontrando-se no leite com alta CCS maior concentração de caseína solúvel e menor de caseína micelar (SHARMA e RANDOLPH, 1974). No leite normal, cerca de 95% do total de caseína é encontrada em micelas, enquanto que no leite de vacas com mastite clínica há apenas 46% (SINGH e GANGULI, 1975).

Anderson e Andrews (1977) afirmaram que no leite com alta CCS as concentrações de soroalbumina e imunoglobulinas aumentam acentuadamente, concordando com Randolph, Erwin e Richter (1974), os quais reportaram que no leite considerado positivo no *Winsconsin Mastitis Test* (WMT) foram encontradas concentrações 68% maiores de

soroalbumina, cinco vezes mais imunoglobulinas, maiores teores de α_s - e κ -caseínas, e menores concentrações de β -lactoglobulina e β -caseína, 25% e 22%, respectivamente, em comparação ao leite negativo.

De acordo com Caffin, Poutrel e Rainard (1985), há uma correlação negativa entre a concentração de α -lactalbumina e a CCS ($r = -0,31$), a qual é amplificada pelo *status* de infecção dos quartos mamários. Nenhuma correlação foi notada entre a CCS e a concentração de β -lactoglobulina quando considerado um período completo de amostragem, porém a correlação tornou-se negativa nos quartos mamários infectados pelos patógenos de maior importância, como o *Staphylococcus aureus* e estreptococos.

A CCS foi correlacionada ($r = 0,53$) às concentrações de soroalbumina no leite. Cerca de 32% dos quartos mamários infectados pelos patógenos de maior importância apresentam menos de 500.000 CS/mL, enquanto que em 47,5% deles pode-se observar teores de soroalbumina inferiores a 0,2 mg/mL. Para infecções subclínicas, as concentrações de soroalbumina aumentaram pronunciadamente quando a CCS foi maior que 1.000.000 CS/mL (POUTREL, CAFFIN e RAINARD, 1983).

A alta CCS, segundo Politis e Ng-Kwai-Hang (1988b), tem profundo efeito nas propriedades de coagulação do leite, uma vez que estas são intimamente relacionadas à composição do mesmo.

2.3.2 Lactose

A lactose, principal carboidrato no leite, é essencial para a produção de derivados lácteos fermentados. A concentração de lactose no leite sofre variações de acordo com a raça da vaca, fatores individuais, infecção no úbere e estágio de lactação. A lactose e os íons solúveis (Na^+ , K^+ e Cl^-) são os principais componentes responsáveis pela pressão osmótica do leite (FOX et al., 2000).

Durante a mastite, a concentração de NaCl no leite aumenta, resultando em aumento da pressão osmótica. Este aumento é compensado por meio de uma redução no teor de lactose, havendo uma relação inversa entre a concentração de NaCl e lactose no leite (FOX et al., 2000). Outros autores concordam que há uma diminuição na concentração de lactose quando se trata de leite de vacas com alta CCS (MILLER et al., 1983; ROGERS et al., 1989; AULDIST et al., 1995; SOMERS et al., 2003; FERNANDES, OLIVEIRA e TAVOLARO, 2004; LEITNER et al., 2006).

Klei et al. (1998) reportaram que um aumento de 83.000 CS/mL para 870.000 CS/mL no leite corresponde a uma diminuição na concentração de lactose de 4,98% para 4,71%.

Bueno et al. (2004) observaram diminuição nos teores de lactose de 4,60% para 4,36% com contagens menores que 200.000 CS/mL e maiores que 1.000.000 CS/mL, respectivamente. Miller et al. (1983) observaram uma correlação negativa entre a porcentagem de lactose no leite e a severidade da mastite, e esta determina uma redução contínua na concentração de lactose no leite com CCS acima de 100.000 células/mL. O decréscimo na concentração de lactose, segundo Marques, Balbinotti e Fischer (2002), pode ser notado a partir de 300.000 CS/mL, e pode ser explicado pela diminuição da capacidade de síntese da glândula, além da possível passagem de lactose do leite para o sangue em vacas com mastite (SHUSTER et al., 1991; MARQUES, BALBINOTTI e FISCHER, 2002).

2.3.3 Gordura

Os teores de gordura no leite podem sofrer variações relacionadas à raça, a fatores individuais, estágio de lactação, idade, saúde do animal, *status* nutricional e intervalo entre as ordenhas. Os lipídeos no leite são predominantemente triglicerídeos, os quais perfazem aproximadamente 98% do total da fração lipídica, enquanto que os 2% restantes compreendem diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróis (principalmente colesteróis) e traços de vitaminas lipossolúveis (FOX et al., 2000).

Os glóbulos de gordura, que possuem em média de 3 a 4 μ m de diâmetro (FOX et al., 2000), são envolvidos por uma fina camada (LEE e SHERBON, 2002) denominada membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL). A MGGL consiste em uma complexa mistura de proteínas, glicoproteínas, triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol, enzimas e outros compostos minoritários. A principal enzima endógena que compõem a MGGL é a xantina oxidase (FOX et al., 2000).

El-Deeb e Hassan (1987) reportaram menores teores de gordura no leite de vacas com mastite. De acordo Randolph e Erwin (1974) e Schultz (1977), pode-se observar no leite com alta CCS menor concentração de gordura devido ao fato de haver menor síntese de gordura pela glândula mamária. Entretanto, alguns autores sugerem que a correlação entre a CCS e o percentual de gordura pode ser negativa, positiva ou nula, dependendo do valor médio da CCS no leite dos rebanhos (SCHULTZ, 1977; MUNRO, GRIEVE e KITCHEN, 1984). Marques, Balbinotti e Fischer (2002) observaram maiores concentrações de gordura de acordo com a elevação dos níveis de CCS.

2.3.4 Minerais

As concentrações dos minerais durante a mastite são também alteradas, afetando significativamente a qualidade do leite (AULDIST e HUBBLE, 1998) e influenciando as características do mesmo para o processamento (MUNRO, GRIEVE e KITCHEN, 1984). O cálcio no leite pode ser encontrado na forma ionizada, ligado às micelas de caseína ou associado ao citrato e fosfato. Durante a mastite, há redução na concentração de cálcio no leite (NEVILLE e WATTERS, 1983).

Tallamy e Randolph (1970) reportaram que no leite positivo para o WMT foram encontradas 9%, 8% e 4% menores concentrações de potássio, fósforo inorgânico e cálcio, respectivamente, em relação às amostras de leite negativas. Adicionalmente, as amostras WMT positivas apresentaram aumento de cerca de 38% nos níveis de sódio, 22% de cobre, 19% de ferro, 8% de zinco e 6% de magnésio. Em um nível de 250.000 CS/mL, ocorre um significativo aumento nos teores de sódio e na relação sódio:potássio. A alta CCS pode também ocasionar aumento na concentração de cloro e na relação cloro:lactose (ROGERS, MITCHELL e BARTLEY, 1989).

2.3.5 Sólidos Totais

Klei et al. (1998) e Marques, Balbinotti e Fischer (2002) relataram que os sólidos totais não são influenciados pelo aumento da CCS. No entanto, Fernandes, Oliveira e Tavolaro (2004) observaram uma correlação negativa entre a CCS e a concentração de sólidos totais quando o nível de CCS supera 1.000.000 de CS/mL. Bueno et al. (2004) também reportaram diminuição no teor de sólidos totais no leite relacionada à CCS, com valores de 12,61% com CCS menor que 200.000 CS/mL e 12,20% para contagens acima de 1.000.000 CS/mL.

Significativos decréscimos no teor de sólidos não gordurosos foram observados quando o valor de CCS atingiu 500.000 CS/mL (ROGERS et al., 1989).

2.3.6 Alterações microbiológicas

A ocorrência de mastite pode afetar, também, a qualidade microbiológica do leite. Primeiramente, os próprios patógenos causadores da mastite podem gerar aumento na contagem global em placa de microrganismos do leite entregue à indústria. Isto é particularmente importante em rebanhos que apresentam alta prevalência da doença causada por *Streptococcus agalactiae* e *S. uberis*. Além disso, outras bactérias causadoras de mastite, tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podem gerar toxinas

termorresistentes, o que representa um risco considerável à saúde humana (BRAMLEY, 1996).

Os valores de CCS estão diretamente relacionados ao aumento na contagem de bactérias psicrótróficas no leite. Esta associação advém do fato de que a principal fonte destes microrganismos é a superfície externa dos tetos (PACKARD e GINN, 1991). Assim, quanto melhor a desinfecção dos tetos, mais baixa a CCS e menor a concentração de bactérias psicrótróficas no leite produzido. Deve-se ressaltar que os critérios de higiene da glândula mamária tornam-se ainda mais importantes à medida que se intensificam as ações para o resfriamento do leite na propriedade rural, imediatamente após a ordenha, a exemplo do que vem ocorrendo atualmente no país.

O tratamento das mastites apresenta sérias implicações em Saúde Pública, pela presença de resíduos de antibióticos no leite. Alguns estudos têm demonstrado que a maior fonte destes resíduos é representada pela freqüente inoculação intramamária de antibióticos utilizados no combate à mastite (ALLISON, 1995).

2.4 Efeitos das Células Somáticas sobre a Qualidade dos Produtos Lácteos

Em consequência às alterações na composição do leite, diversos efeitos podem ser observados na produção de derivados lácteos, entre os quais destacam-se: menor rendimento industrial; diminuição do valor nutritivo dos alimentos lácteos; redução do tempo de prateleira, devido à ação de enzimas que contribuem para conferir sabores estranhos ao alimento; e, em certos casos de mastite, menor qualidade microbiológica do produto final, resultante do aumento da contagem global de microrganismos (KITCHEN, 1981; OLIVEIRA, FONSECA e GERMANO, 1999).

2.4.1 Leites Pasteurizado e UAT

A influência da CCS do leite cru na qualidade do leite fluido pasteurizado é causada pelo aumento nos níveis de proteases termoestáveis e lipases originárias de vacas com crescente CCS no leite (BARBANO, MA e SANTOS, 2006).

Em estudo sobre o leite pasteurizado, Ma et al. (2000) constataram que o leite com maior CCS (849.000 CS/mL) comparado ao leite com menor CCS (45.000 CS/mL) foi mais suscetível à lipólise durante o armazenamento refrigerado. A contínua lipólise no leite pasteurizado durante o armazenamento refrigerado indica que as lipases do leite sobrevivem à pasteurização. Durante o armazenamento refrigerado, houve uma degradação mais extensa de caseína no leite com alta CCS do que naquele com baixa CCS. Os

decrecentes níveis na relação caseína/proteína verdadeira durante armazenamento refrigerado, especialmente do leite com alta CCS, indicou que significativos níveis de atividade proteolítica permanecem após a pasteurização. Os níveis de AGL e a hidrólise da caseína foram significativamente maiores no leite com alta CCS comparado ao leite com baixa CCS (0,43 e 0,27 meq AGL/100g de gordura, respectivamente).

A qualidade organoléptica do leite de baixa CCS armazenado sob refrigeração permaneceu alta mesmo após 21 dias após a fabricação, enquanto que o leite com alta CCS apresentou defeitos sensoriais significativos, como rancidez, adstringência e sabor amargo. O decréscimo na qualidade sensorial do leite com alta CCS entre os dias 14 e 21 foi provavelmente causado por altos níveis de enzimas lipolíticas e proteolíticas. De fato, o leite pasteurizado com alta CCS foi mais suscetível à lipólise durante o armazenamento sob refrigeração. Concluiu-se que a mastite afetou adversamente a qualidade do leite pasteurizado e diminuiu sua vida de prateleira (MA et al., 2000).

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

Santos, Ma e Barbano (2003) afirmaram que a combinação de baixas CCS, baixas temperaturas de armazenamento e baixas contagens bacterianas iniciais podem resultar em um leite fluido que manterá a qualidade sensorial por mais de 61 dias de armazenamento a temperaturas inferiores a 6°C.

Auldist et al. (1996) relacionaram a CCS e o estágio de lactação à qualidade do leite UAT. Os leites contendo altos níveis de CS (687.000 e 1.463.000 CS/mL para, respectivamente, estágios inicial e avançado de lactação) apresentam menor relação caseína:proteína total, além de maior pH e nível de proteólise quando proveniente de estágio avançado de lactação. Os leites com altas contagens também apresentam tendência de gelatinizar antes que o de baixas contagens. Segundo Machado, Barancelli e Ribeiro (1998), o leite UAT com altas contagens apresenta aumento da gelatinização e conseqüente diminuição do tempo de prateleira.

Topçu, Numanoğlu e Saldamli (2006) constataram que o leite UAT com 621.000 CS/mL apresentou maiores níveis de proteólise durante o armazenamento comparado ao leite com 212.000 CS/mL devido à ação de proteinases bacterianas e da plasmina. Foi observada gelatinização nos leites com mais de 315.000 CS/mL após 150 dias de armazenamento. Os leites UAT produzidos por sistema direto a partir de leite de baixa

qualidade com alta CCS e contagem de psicotróficos apresentaram altos níveis de proteólise durante o armazenamento a temperatura ambiente. Isto causou sabor amargo, gelatinização e sedimentação, o que reduziu a vida de prateleira do leite (TOPÇU, NUMANOĞLU e SALDAMLI, 2006). Porém, de acordo com Dagleish (1992), a formação de sedimentos em leites armazenados pode ser um efeito físico o qual é inevitável quando o leite é deixado sem perturbações por um período extenso.

2.4.2 Outros Produtos Lácteos

Os níveis de CCS no leite são negativamente relacionados aos teores de gordura, proteína e sólidos totais do queijo (POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a), produto lácteo mais estudado. Alterações na composição podem ser observadas, segundo Barbano, Rasmussen e Lynch (1991), havendo redução da caseína como porcentagem da proteína verdadeira e aumento nas perdas de proteína e gordura no soro. Ocorrem, ainda, alterações negativas nas propriedades organolépticas (MUNRO, GRIEVE e KITCHEN, 1984).

O queijo é também afetado pelas altas contagens no que se refere ao rendimento (GRANDISON e FORD, 1986), com redução de até 5%, além de aumento no tempo de coagulação (MACHADO, BARANCELLI e RIBEIRO, 1998; POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a). Isto significa uma perda final de 500 kg de queijo para cada 100.000 litros de leite processado, se for considerado o rendimento médio de 1 kg de queijo para cada 10 L de leite utilizado. Com relação ao coágulo, ocorre diminuição da firmeza, aumento de água e baixa taxa de enrijecimento (POLITIS e NG-KWAI-HANG, 1988a). De acordo com Auldist e Hubble (1998), modificações no rendimento, tempo de coagulação e firmeza do coágulo são decorrentes das alterações na composição protéica do leite, balanço mineral e perda de sólidos no soro.

O queijo tipo *Cheddar* elaborado com leite contendo mais de 500.000 CS/mL apresenta maior umidade e proteólise. O *flavor*, o corpo e a textura são também afetados (ROGERS e MITCHELL, 1994), além do tempo de coagulação, firmeza do coágulo e da atividade da cultura *starter* (KITCHEN, 1981). O tempo de coagulação pode diminuir até 25% e há maior perda gordura e proteína no soro, resultando em menor rendimento (ROGERS e MITCHELL, 1994). Para o queijo tipo *Cottage*, nota-se também rendimento industrial significativamente menor quando elaborados com leite com alta CCS, além de maiores umidade no coágulo e proteólise (KLEI et al., 1998). Segundo Cooney et al. (2000), durante o processamento de queijos tipo suíço, como o *Emmental*, o *Gruyere* e o *Comte*, a atividade das proteinases endógenas do leite é claramente aumentada com a elevação da CCS, além de se observar decréscimo na quantidade de proteína total, maior perda de

proteína no soro e aumento nos teores de gordura. O queijo tipo Prato produzido com leite com mais de 500.000 CS/mL apresenta menores teores de proteína verdadeira, caseína e maior proteólise (MAZAL et al., 2007).

Rogers e Mitchell (1994) estudaram a relação entre os níveis de CCS e algumas características do iogurte desnatado. Os autores utilizaram misturas de leite com altas e baixas contagens, obtido em duas propriedades leiteiras. Contudo, os resultados obtidos foram conflitantes, visto que a qualidade organoléptica do iogurte foi afetada significativamente somente com o leite de uma das propriedades, para níveis acima de 250.000 CS/mL. Oliveira et al. (2002) constataram decréscimo da qualidade sensorial do iogurte natural batido elaborado com CS acima de 800.000/mL, sobretudo para os atributos consistência, sabor e média geral de aceitação do produto. Fernandes, Oliveira e Lima (2007) afirmaram que a CCS no leite não causa aumento da proteólise do iogurte, mas ocasiona o aumento da concentração de AGL. Além disso, a viscosidade do produto aumenta quando produzido com mais de 800.000 CS/mL.

Ainda com relação a outros produtos lácteos, há inibição do crescimento do *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados produzidos com leite contendo altos níveis de células somáticas (MACHADO, BARANCELLI e RIBEIRO, 1998) e diminuição no tempo de prateleira de manteigas e leites em pó devido à ação de enzimas que deterioram a gordura (FONSECA e SANTOS, 2000).

2.5 Atividade Enzimática no Leite

As alterações no tempo de prateleira ocorrem no leite fluido e em produtos derivados. Este fenômeno se deve, principalmente, à ação de enzimas proteolíticas, as quais em grande parte são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após os processos usuais de pasteurização do leite. Os principais efeitos destas enzimas manifestam-se na forma de alterações no sabor dos produtos lácteos. As enzimas proteolíticas geram um sabor amargo no leite armazenado e seus derivados, enquanto que as enzimas lipolíticas predispõem à ocorrência de sabor rançoso, em função da quebra dos ácidos graxos de cadeia longa em ácidos graxos de cadeia curta (RANDOLPH e ERWIN, 1974; MURPHY et al., 1989; RENEAU e PACKARD, 1991).

Existem no leite 50 diferentes tipos de atividade enzimática. No entanto, as enzimas nativas com atividade relevante são a lipase lipoprotéica (LLP), a plasmina e a lactoperoxidase (MUIR, 1996).

2.5.1 Proteólise

A presença de atividade de proteases no leite pode causar impacto na qualidade e estabilidade do leite e derivados (LARSEN et al., 2006). O aumento da CCS associado à deterioração na qualidade da proteína (GRANDISON e FORD, 1986) ocorre devido ao fato de, no leite mastítico, ocorrer aumento na atividade proteolítica em consequência à presença de altos níveis de proteases, que podem ter origem na plasmina (*Enzyme Commission* - 3.4.21.7), nas células somáticas (DE RHAM e ANDREWS, 1982; ANDREWS, 1983; VERDI et al., 1987; SAEMAN, VERDI e GALTON, 1988) ou nas bactérias (GRIEVE e KITCHEN, 1985).

A atividade proteolítica pode estar associada em grande parte à CCS (SENYK, BARBANO e SHIPE, 1985; VERDI et al., 1987; SAEMAN, VERDI e GALTON, 1988; BALLOU et al., 1995), o que predispõe o leite a uma substancial hidrólise da α_s - e β -caseína por proteases, havendo diminuição nos níveis destas frações no leite (RANDOLPH, ERWIN e RICHTER, 1974; ANDERSON e ANDREWS, 1977; DE RHAM e ANDREWS, 1982; ANDREWS, 1983; VERDI et al., 1987). Mudanças nas frações protéicas no leite UAT têm significado importante (RECIO et al., 1996).

A taxa de proteólise das caseínas pelas proteases de diferentes fontes ocorre de acordo com a seguinte predominância: α_{s1} - > β - > κ -caseína para proteases originárias de leucócitos, β - > α_{s1} - > κ -caseína para a plasmina (GRIEVE e KITCHEN, 1985), e β - $\approx$ κ - > α_{s1} -caseína para proteases de origem de microrganismos psicrotróficos (GRIEVE e KITCHEN, 1985; GASSEM e FRANK, 1991).

A proteólise pode também estar associada à atividade de macrófagos nas células isoladas do leite com alta CCS (VERDI e BARBANO, 1991a). A atividade proteolítica associada às células somáticas isoladas do leite bovino é de 27,5% em pH 6,6 (VERDI e BARBANO, 1991a). A proteólise no produto refrigerado por 72 horas a 6,7°C é 1,5 vezes maior em leites com mais de 1.000.000 de CS/mL do que em leites com menos de 60.000 CS/mL. A proteólise aumenta com o aumento da CCS, sendo que as proteases associadas com elevada CCS prejudicam a qualidade do leite cru durante o armazenamento, e também de queijos e de leite pasteurizado ao longo da vida de prateleira (SENYK, BARBANO e SHIPE, 1985). Ressalta-se que a proteólise pode se iniciar em baixas contagens, a partir de 250.000 CS/mL (LE ROUX, COLIN e LAURENT, 1995).

Existe uma intensa atividade proteolítica associada à alta CCS, fato que pode originar uma quantidade significativa de caseína enzimaticamente degradada. As porcentagens de proteína verdadeira, caseína e nitrogênio não protéico no leite sofrem variações sazonais, mas não são afetadas pelo nível de CCS. Porém, a caseína expressa

como porcentagem da proteína verdadeira não varia sazonalmente, mas é menor no leite com alta CCS (VERDI et al., 1987).

A principal atividade proteolítica endógena no leite é decorrente da ação da plasmina, enzima que normalmente se encontra associada à fração de caseína (RICHARDSON, 1983). A plasmina do leite é idêntica à plasmina do sangue, diferindo apenas no peso molecular (MUIR, 1996). A proteólise de origem da plasmina perfaz aproximadamente 90% da proteólise total (BARRY e DONNELLY, 1981). Os coeficientes de correlação entre a plasmina e a α_s -caseína, e entre a plasmina e a β -caseína, descritos por Politis, Ng-Kwai-Hang e Giroux (1989), foram de -0,14 e -0,27, respectivamente. Kennedy e Kelly (1997) constataram que a atividade da plasmina no leite com 800.000 CS/mL foi aproximadamente duas vezes maior do que no leite com CCS inferior a 150.000 CS/mL.

A ação da plasmina degrada a β -, α_{s1} - e a α_{s2} -caseína, sendo que esta atividade aumenta com a severidade da mastite. A elevada atividade da plasmina no leite de vacas com mastite pode alterar as propriedades de coagulação do leite (SRINIVASAN e LUCEY, 2002). A regulação da hidrólise da caseína é crítica para a fabricação de produtos lácteos (BASTIAN e BROWN, 1996). Quando a caseína é degradada nos produtos fluidos, ou antes da coagulação nos derivados lácteos que formam gel, geralmente a qualidade do produto é afetada (BASTIAN e BROWN, 1996).

O plasminogênio, que também está presente no leite, pode ser prontamente ativado por ativadores de plasminogênio (RICHARDSON, 1983). Segundo Verdi e Barbano (1991b), qualquer fator que converta plasminogênio em plasmina, resultando em proteólise da caseína, pode ter impacto negativo na funcionalidade da proteína do leite e, visto que constituintes das células somáticas são capazes de realizar esta conversão, conclui-se que a fonte de ativação de plasminogênio no leite são as células somáticas. Isto se confirma pelo fato de os leucócitos do sangue bovino e as enzimas bacterianas extracelulares não serem capazes de converter o plasminogênio em plasmina.

No leite normal, pode-se observar uma taxa de ativação do plasminogênio para plasmina (Figura 1), no entanto uma taxa muito maior ocorre em leites com alta CCS (DE RHAM e ANDREWS, 1982). Zachos et al. (1992) também concluíram que, durante a mastite severa, há maior ação do ativador de plasminogênio. A maior atividade da plasmina pode ocorrer no final da lactação, em vacas mais velhas e no leite mastítico, no qual os maiores níveis foram observados (BASTIAN e BROWN, 1996). De acordo com Urech, Puhan e Schällibaum (1999), quartos com mastite subclínica produzem leite com 20% a mais de plasmina ativada e 30% a mais de plasminogênio, e no leite mastítico a atividade dos ativadores de plasminogênio é cerca de oito vezes maior (ZACHOS et al., 1992).

A plasmina, bem como a maior parte do plasminogênio, está intimamente associada às micelas de caseína no leite. Menores quantidades das enzimas estão presentes na fração sérica e na membrana lipídica, o que pode ser resultante da associação do plasminogênio e da plasmina a pequenas quantidades de caseína solúvel ou a micelas de caseína presentes nestas frações (POLITIS, BARBANO e GOREWIT, 1992). A mastite provoca a dissociação das micelas de caseína, transferindo a plasmina e o plasminogênio para o soro. Porém, o grau de ativação do plasminogênio é maior quando este está associado às micelas de caseína em relação àquele solúvel, tanto em leites sadios quanto em leites mastíticos devido à provável presença de inibidores de plasmina e inibidores dos ativadores de plasminogênio (SHAAR e FUNKE, 1986).

Figura 1. Representação esquemática do sistema da enzima plasmina no leite (BASTIAN e BROWN, 1996).

Com relação à estabilidade térmica da plasmina e do plasminogênio, a pasteurização do leite (72°C por 15 segundos) resulta em um decréscimo de 10% (KORYCKA-DAHL et al., 1983) a 17% na atividade da plasmina. A concentração de plasminogênio decresce durante o armazenamento do leite, sendo que a taxa de decréscimo no leite pasteurizado é maior do que no leite cru (RICHARDSON, 1983). A atividade do plasminogênio, de acordo com Verdi e Barbano (1991b), pode ser anulada pelo aquecimento do leite a 63°C por 30 minutos.

Parte da atividade proteolítica, entretanto, sobrevive à pasteurização (VERDI e BARBANO, 1988), o que se deve, segundo Bastian e Brown (1996), à característica de termorresistência da plasmina, que pode sobreviver até a tratamentos UAT. Mottar (1981) afirma que a pasteurização do leite causa aumento de cerca de 19,5% na atividade das proteases, enquanto que há diminuição desta atividade após o tratamento UAT (GILLIS et al., 1985).

O armazenamento, o tratamento térmico e o pH estão entre os mais importantes fatores afetando o sistema plasmina no leite e derivados (BURBRINK e HAYES, 2006). A estabilidade térmica da plasmina é pH dependente, sendo estável à pasteurização em pH ácido ou neutro, e rapidamente inativada em pH alcalino (MUIR, 1996). O leite pasteurizado

possui maior atividade do ativador de plasminogênio em relação ao leite cru, diferença atribuída à desnaturação de um inibidor do ativador de plasminogênio pela pasteurização. Os ativadores de plasminogênio são estáveis ao pH e à temperatura, e estão predominantemente associados à fração de caseína (RICHARDSON, 1983).

Saeman, Verdi e Galton (1988) relataram que a atividade proteolítica total do leite permanece, após a cura da infecção, significativamente maior que a observada na pré-infecção, o que provavelmente é decorrente da atividade da plasmina. Os efeitos deletérios da mastite na qualidade do leite podem, portanto, continuar após a eliminação da infecção e o retorno dos níveis de CCS a valores baixos. De acordo com Verdi e Barbano (1988), uma porção de atividade proteolítica das células somáticas sobrevive à pasteurização.

A proteólise do leite UAT durante o armazenamento à temperatura ambiente é um dos fatores limitantes de sua vida de prateleira (VIDAL-MARTINS et al., 2005), podendo causar precipitação indesejada ou gelatinização (PRADO et al., 2006). Em estudo com leite UAT, constatou-se aumento da proteólise no decorrer do armazenamento, provavelmente relacionada à presença de proteases de bactérias psicrótróficas do leite cru. As contagens de microrganismos psicrótróficos nos leites crus utilizados para a elaboração do leite UAT foram de $2,0 \times 10^9$ e $4,4 \times 10^7$ UFC/mL (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

As proteases provenientes de contaminações com bactérias psicrótróficas, porém, parecem não causar problemas até que seja alcançado um nível de, no mínimo, 10^7 UFC/mL. No leite de boa qualidade microbiológica o sistema plasminogênio-plasmina detém o maior potencial para causar quebra de proteínas (GRIEVE e KITCHEN, 1985).

O conhecimento da causa da proteólise, que pode levar à gelatinização do leite UAT, facilita ações preventivas ou paliativas para os problemas relacionados à proteólise. Como significado prático, se a proteólise é causada pela plasmina, conclui-se que as condições de processamento UAT estão muito amenas; se causada por proteinases bacterianas, a qualidade do leite cru está implicada (DATTA e DEETH, 2003).

2.5.2 Lipólise

A lipólise pode ser definida como a hidrólise enzimática da gordura, originando no leite ácidos graxos livres, que propiciam um sabor rançoso (WALSTRA et al., 2001). Fatores como a agitação mecânica do leite, nível de constituintes sanguíneos, estágio de lactação, nutrição, ciclo hormonal e mastite podem contribuir para a lipólise (DOWNEY, 1980). Várias enzimas podem provocar lipólise, mas a principal enzima lipolítica é a lipase lipoprotéica (WALSTRA et al., 2001). A secreção de enzimas lipolíticas por leucócitos no leite cru pode

contribuir para a geração de ácidos graxos livres e promover a rancidez hidrolítica no leite (AZZARA e DIMICK, 1984).

As enzimas com atividade lipolítica, como a lipase lipoprotéica (*Enzyme Commission* - 3.1.1.34), as lipases de origem das células somáticas e as microbianas, predispõem à ocorrência de sabor rançoso em função da quebra de ácidos graxos (RANDOLPH e ERWIN, 1974; MURPHY et al., 1989; RENEAU e PACKARD, 1991). De fato, a LLP catalisa a quebra dos triglicerídeos do leite, produzindo AGL, sobretudo os de cadeia curta como o butírico, caprílico e caprótico, os quais são responsáveis por alguns defeitos de sabor (DOWNEY, 1980; DEETH, 1993; MUIR, 1996) devido ao forte *flavor* que possuem (DEETH, 1993).

Em avaliação sensorial de leite com 2% de gordura, de acordo com Santos et al. (2003), aproximadamente 63% dos painelistas detectaram defeitos de sabor em níveis de AGL menores ou iguais a 0,35 meq/kg de leite. Quando a concentração de AGL atingiu 0,25 meq/kg de leite, 34% dos painelistas puderam detectar defeitos.

A distribuição da LLP no leite e a suscetibilidade da gordura à lipólise estão relacionadas ao balanço entre ativadores e inibidores no leite, assim, o leite suscetível contém um baixo número de inibidores (CARTIER e CHILLIARD, 1990). A LLP sérica, segundo Anderson (1982), é mais efetiva em promover lipólise do que a LLP ligada às micelas de caseína. A adição de LLP aos glóbulos de gordura do leite em quantidades correspondentes àsquelas presentes no leite causa liberação de 0,5 a 2,5 μmol de ácidos graxos/mL durante incubação a 4°C por 24 horas (SUNDHEIN e BENGTSSON-OLIVECRONA, 1987).

Fitz-Gerald, Deeth e Kitchen (1981) afirmam que o leite mastítico possui tendência a apresentar maiores níveis de AGL e menor atividade da LLP. No entanto, Azzara e Dimick (1985a) reportaram que a média de atividade da LLP no leite proveniente de quartos com mastite subclínica foi 27% maior do que a média de atividade da enzima no leite de quartos não mastíticos. De acordo com Azzara e Dimick (1985b), macrófagos isolados das secreções mamárias bovinas produzem enzimas que podem influenciar a atividade da LLP no leite cru no decorrer do armazenamento.

Needs, Anderson e Morant (1986) afirmam que o teor de gordura e a CCS não afetam o nível de lipólise, e que há um aumento significativo dos ácidos graxos saturados de cadeia longa no leite proveniente de quartos mamários com infecção (NEEDS e ANDERSON, 1984). Porém, Randolph e Erwin (1974) afirmam que leites positivos para mastite contêm maiores concentrações de AGL e ácidos graxos de cadeia curta, e menores concentrações de ácidos graxos de cadeia longa.

Outros autores reportaram que a concentração de AGL no leite de vacas com mastite é mais alta (TALLAMY e RANDOLPH, 1969; RANDOLPH e ERWIN, 1974), e há correlação com o nível de CCS (SALIH e ANDERSON, 1979; BACHMAN et al., 1988). Jurczak e Sciubiz (1981) afirmam que apenas em determinados níveis de CCS pode-se notar correlação com a concentração de AGL e, de acordo com Salih e Anderson (1979), a influência das células é progressivamente menor com o aumento da contagem.

A quantidade de ácidos graxos totais em leites provenientes de vacas com mastite é aproximadamente 4% menor, enquanto a de AGL é aproximadamente 47% maior do que em leites negativos para mastite (RANDOLPH e ERWIN, 1974). Adicionalmente, o acúmulo de AGL em amostras positivas no WMT é de 1,5 a 2 vezes mais rápido do que em amostras negativas (TALLAMY e RANDOLPH, 1969).

Os triglicerídeos, que estão protegidos pela MGGL (DOWNEY, 1980), sofrem alterações de acordo com a severidade da infecção (KITCHEN, 1981). A presença de grande número de células no leite afeta a composição, resultando em menor quantidade de fosfolipídios (RANDOLPH e ERWIN, 1974), bem como a estabilidade da MGGL (ANDERSON, 1977), o que pode influenciar a quantidade de substrato disponível para lipólise (SALIH e ANDERSON, 1979).

A composição da MGGL pode ser alterada por fatores relacionados ao animal, ao ambiente e ao processamento. Os fatores relacionados ao animal incluem a dieta, a estação do ano, o estágio da lactação e a raça da vaca. Fatores ambientais se referem à presença de bactérias no leite, provenientes de contaminações pré ou pós pasteurização, ou à presença de patógenos que provocam mastite. Finalmente, os fatores relacionados ao processamento incluem o resfriamento, a separação, a agitação, o aquecimento e a homogeneização (LEE e SHERBON, 2002).

Modificações na composição da MGGL do leite com alta CCS podem ocorrer como resultado direto de enzimas leucocíticas extracelulares no leite, conseqüente a uma liberação direta da célula intacta, ou da lise dos leucócitos (ANDERSON, 1977). O leite mastítico contém aproximadamente 10% a menos de MGGL comparado ao leite normal (ERWIN e RANDOLPH, 1975).

De acordo com Jurczak e Sciubisz (1981), a lipólise no leite mastítico deve-se ao fenômeno da lipólise espontânea e daquela resultante da atividade das lipases intracelulares que, infiltradas no leite como conseqüência da lise das células somáticas, degradam a gordura. A lipólise espontânea se desenvolve sem que ocorra agitação mecânica do leite cru e é iniciada pelo resfriamento do leite fresco (DOWNEY, 1980). A lipólise induzida é usualmente associada à injúria da MGGL, que pode ocorrer através da agitação, com

conseqüente incorporação de ar no leite e rompimento da MGGL (DOWNEY, 1980; DEETH, 1993).

No leite de boa qualidade microbiológica (contendo até 5×10^3 UFC/mL) ou de qualidade razoável (até 10^5 UFC/mL), enzimas lipolíticas intrínsecas do leite são primariamente responsáveis pelos defeitos que podem ser desenvolvidos durante o armazenamento sob refrigeração. Contagens acima de 10^6 ou 10^7 ufc/mL são requeridas no leite para que apenas as enzimas microbianas causem significativa lipólise (DOWNEY, 1980).

Embora os mecanismos não estejam bem determinados, está claro, segundo Murphy et al. (1989), que a mastite, e conseqüentemente a resposta inflamatória, causa aumento na lipólise espontânea. Mas uma vez que a infecção seja eliminada e os níveis de células somáticas retornem aos níveis de pré-infecção, o leite retornará às características lipolíticas de antes de a vaca ser infectada. A mudança na composição química do leite mastítico parece exercer um efeito inibitório na extensão da lipólise (JURCZAK e SCIUBISZ, 1981). Outros autores concordam que a mastite causa aumento da atividade lipolítica no leite (TALLAMY e RANDOLPH, 1969; RANDOLPH e ERWIN, 1974).

De acordo com Shipe e Senyk (1981), aumentos na lipólise são substanciais no leite pasteurizado durante o armazenamento. Processamentos a $76,7^\circ\text{C}$ por 16 segundos são adequados para proteger o leite da lipólise por sete dias após a pasteurização, porém maiores temperaturas podem ser necessárias para garantir maior tempo de prateleira em leites suscetíveis. Deeth (1993) afirma que a lipase do leite é inativada pela pasteurização, não causando lipólise no leite pasteurizado e produtos derivados. Porém, Castberg (1992) reportou que a lipase nativa não é completamente inativada em condições de pasteurização HT-ST (*high temperature–short time*), enquanto que a lipase de origem bacteriana sobrevive ao tratamento UAT.

2.6 Aspectos da Tecnologia de Fabricação do Leite UAT

A esterilização se aplica à conservação dos alimentos desde o século XIX, mas a tecnologia necessária para associar um tratamento esterilizante a um sistema de embalagem asséptica somente foi desenvolvida no final da década de 50, quando surgiram os equipamentos de tratamento a temperaturas ultra-altas. Os tratamentos UAT têm experimentado uma expansão espetacular nas últimas décadas e, atualmente, se aplicam a muitos setores da indústria alimentícia, especialmente às indústrias lácteas, para a produção de leite e creme de leite com longa duração (EARLY, 1998).

O leite UAT difere do pasteurizado principalmente no tratamento térmico empregado para a esterilização. Os tratamentos UAT diretos se baseiam no método de injeção direta de vapor no leite para elevar a temperatura. As etapas empregadas usualmente no processo (LEWIS, 1994; VARNAM e SUTHERLAND, 1994; EARLY, 1998) estão descritas resumidamente a seguir.

Após o recebimento do leite cru refrigerado, o mesmo é submetido à pasteurização e padronização, seguindo para a etapa de pré-aquecimento, na qual é aquecido a cerca de 80°C. O leite é então bombeado para a câmara de injeção de vapor, na qual atinge cerca de 140°C e é mantido nesta temperatura por 3 a 4 segundos. O leite esterilizado segue para uma câmara de expansão com vácuo parcial, na qual a água incorporada ao injetar o vapor é evaporada e a proporção original de sólidos totais é restabelecida, e é resfriado a cerca de 80°C. Na próxima etapa o leite é homogeneizado em homogeneizador asséptico, operação na qual são obtidos glóbulos de gordura menores e de tamanho uniforme. O leite homogeneizado é resfriado a 18-25°C em placas da seção de refrigeração do trocador de calor e posteriormente segue para o tanque asséptico que alimenta a envasadora.

2.6.1 Importância da Viscosidade do Leite UAT

A viscosidade pode ser influenciada pela temperatura, pH, glóbulos de gordura e micelas de caseína. A viscosidade do leite é aproximadamente o dobro da viscosidade da água (WALSTRA et al., 2001), sendo maior quando as proteínas coagulam e quanto maior o teor de gordura. A viscosidade do leite a 20°C oscila entre 1,79 a 2,13 cP (SPREER, 1991).

Kelly e Foley (1997) reportaram que a viscosidade aparente do leite UAT obtido por processo indireto permanece relativamente constante até 100 dias após a fabricação, aumentando após este período. Vidal-Martins et al. (2005), por outro lado, constataram que a viscosidade aparente do leite UAT é constante até 30 dias de armazenamento e aumenta após 60 dias de armazenamento. Os autores atribuem este aumento da viscosidade à presença de proteases de bactérias psicrófilas do leite cru ou à associação de β -lactoglobulina desnaturada a micelas de caseína no leite UAT. Apesar do aumento da viscosidade aparente, não foi observada gelatinização do produto durante o período de armazenamento por 120 dias.

Os dados disponíveis na literatura sobre os efeitos da CCS na viscosidade do leite UAT são conflitantes. CHRISTEN e NDOMBA (1991) concluíram que quanto maior a CCS menor a viscosidade do produto. No entanto, Kohlmann, Nielsen e Ladisch (1991) reportaram que a adição de plasmina no leite UAT causa formação de gel a partir de 90 dias

de armazenamento, e esta gelatinização é acompanhada de aumento na viscosidade aparente.

A gelatinização é um dos principais fatores que podem afetar a vida de prateleira do leite UAT. Diversos são os fatores que influenciam a gelatinização do leite, incluindo a natureza do tratamento térmico, a proteólise durante o armazenamento, a composição e a qualidade do leite, a sazonalidade da produção e a temperatura de armazenamento (DATTA e DEETH, 2001).

2.6.2 Importância dos Compostos de Maillard no Leite UAT

O sabor dos produtos lácteos é, segundo Philpot (2002), o mais importante parâmetro individual de qualidade. No entanto, defeitos organolépticos podem ser evidentes no leite UAT após longo armazenamento (ZADOW, 1980). Tratamentos térmicos intensos causam severos defeitos de sabor pela ativação de grupos sulfidrilas das proteínas séricas e pela formação de compostos de Maillard, que provocam também escurecimento. A reação de escurecimento de Maillard se dá pela interação de grupamentos amino e da lactose, que pode ocorrer durante o período de armazenamento (MORR e RICHTER, 1988). Apesar de a proteólise favorecer a reação de Maillard, não foram encontradas referências sobre os possíveis efeitos da CCS sobre a formação destes compostos no leite UAT.

O primeiro composto furfural formado durante a reação de Maillard é o hidroximetilfurfural (HMF) (FERRER et al., 2000). Ainda não se sabe muito sobre a química dos componentes do escurecimento, especialmente no leite. O HMF livre é um marcador para a reação avançada de Maillard e o HMF total para produtos de Amadori, portanto da reação inicial de Maillard. A reação de Maillard tem consideráveis conseqüências para a qualidade do leite aquecido e dos derivados, principalmente em termos de cor, flavor e valor nutricional. O estágio inicial da reação de Maillard não propicia alterações na cor e flavor, como acontece com o leite aquecido por poucos segundos a 145°C, a exemplo do que ocorre no processo UAT direto. Porém, os estágios avançado e final podem ocorrer durante o subsequente armazenamento do leite UAT direto, dependendo do tempo e temperatura de armazenamento (van BOEKEL, 1998).

Um bom indicador térmico deve ser estável após sua formação e não se degradar durante o armazenamento. Isto é particularmente importante para o leite esterilizado ou para o leite obtido por processo UAT direto e indireto. Ainda, estes compostos devem ser ausentes ou ter uma concentração constante no leite cru. O HMF é um indicador bem estabelecido e de fácil determinação do progresso da reação de Maillard (MORALES, ROMERO e JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000). Morales, Romero e Jiménez-Pérez (1996) reportaram

valores de HMF de 1,1 $\mu\text{mol/L}$ e 5,2 $\mu\text{mol/L}$ (equivalentes a 13,87 e 65,58 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) para leites pasteurizado e UAT, respectivamente, comercializados na Espanha. Posteriormente, os mesmos autores (2000) observaram valores médios de HMF de 2,49 $\mu\text{mol/L}$ (equivalente a 31,40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) no leite pasteurizado e de 5,6 $\mu\text{mol/L}$ (equivalente a 70,62 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) no leite integral obtido por processo UAT direto.

De acordo com Mogensen e Poulsen (1980), não há relação direta entre cor e tempo de prateleira, mas a cor dos alimentos é a primeira característica notada pelos consumidores, sendo freqüentemente relacionada à qualidade do produto (RAMPILLI e ANDREINI, 1992). O leite UAT pode apresentar um significativo escurecimento durante o armazenamento, particularmente em temperaturas superiores a 25°C (LEWIS, 1994).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do experimento foi avaliar o efeito do nível de células somáticas no leite cru sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto, bem como verificar o efeito do tempo de armazenamento sobre as características do leite UAT.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as características físico-químicas, de composição, microbiológicas, índices de proteólise e lipólise, e formação de compostos de Maillard no leite cru utilizado como matéria-prima para a fabricação do leite UAT;
- b) Determinar as características microbiológicas, índices de proteólise e lipólise, e formação de compostos de Maillard no leite pasteurizado;
- c) Determinar as características físico-químicas, de composição, microbiológicas, reológicas (viscosidade aparente), índices de proteólise e lipólise, e formação de compostos de Maillard no leite integral obtido por processo UAT direto, produzido a partir de leite de mistura contendo diferentes níveis de células somáticas;
- d) Avaliar os efeitos do tempo de armazenamento e do nível de células somáticas sobre as características citadas do leite UAT durante o armazenamento por 120 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição da Usina de Processamento de Leite UAT

As amostras foram coletadas em usina de beneficiamento (Figura 2) localizada no Município de Casa Branca-SP, na qual o volume médio de leite UAT produzido é da ordem de 30.000 L/dia. A empresa conta com cerca de 250 produtores, sendo a coleta de leite totalmente granelizada.

Ressalta-se que o processamento de leite UAT na referida usina é realizado pelo método direto, ou seja, com injeção de vapor diretamente ao leite em sistema fechado, em volumes de 15.000 L/lote, em média.

Para se conhecer o nível de CS no leite captado das propriedades leiteiras previamente ao início do experimento, amostras de 60 mL do leite de mistura de 150 produtores foram coletadas e encaminhadas para análises de CCS através de contador eletrônico de células somáticas (Bentley®), no Laboratório de Fisiologia da Lactação / Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), em Piracicaba-SP.

Figura 2. Usina de beneficiamento de leite UAT: a-Silo de armazenamento do leite cru. b-Trocadores de calor. c-Envasadora asséptica.

4.2 Amostragem do Leite e Avaliação dos Níveis de Células Somáticas

A amostragem foi realizada no período de março de 2005 a março de 2006, seguindo-se a mesma rotina de procedimentos adotados pela usina no recebimento de leite cru, resumidos na Figura 3 e descritos a seguir. Os caminhões-tanque isotérmicos eram compostos de três compartimentos com capacidade de 5.000 L cada. Quando da chegada à usina, foi colhida uma amostra de 250 mL de cada um dos três compartimentos após rigorosa homogeneização manual com o uso de haste de aço inox. As três amostras foram misturadas para compor uma única amostra de 750 mL, representativa do lote, para fins de verificação das características do leite e aceitação do lote no experimento. O leite foi imediatamente analisado no laboratório do Laticínio, em duplicata, quanto aos parâmetros físico-químicos descritos posteriormente no item 4.3.2, e quanto ao nível de células somáticas utilizando-se o kit Somaticell® (Schering-Plough Coopers, Brasil) (Figura 4).

O leite foi considerado adequado para constituir um lote do experimento quando apresentou acidez entre 14 e 18°D, sendo estável ao teste de alizarol 78°GL e negativo no teste de resíduos de antibióticos. Os leites dos lotes experimentais foram adicionados de citrato de sódio (0,05%, p/v), transferidos para silo isotérmico específico e monitorados durante todo o processo. Os procedimentos para inclusão ou exclusão dos lotes foram repetidos 18 vezes, sendo 3 lotes excluídos por apresentar instabilidade ao teste de alizarol 78°GL. Portanto, foram utilizados 15 lotes experimentais de leite UAT, os quais foram avaliados durante todo o processamento e período de armazenamento.

Figura 3. Fluxograma da amostragem dos leites cru, pasteurizado e UAT. 1 e 2 – Amostras de leite cru; 3 – Amostras de leite pasteurizado; 4 – Amostras de leite UAT.

Figura 4. Avaliação do nível de células somáticas no leite cru.

4.3 Avaliação do Leite Cru

As amostras de leite cru colhidas diretamente dos tanques do caminhão foram submetidas às análises descritas no item 4.3.2.

Para a realização das análises microbiológicas, de compostos de Maillard, lipólise e proteólise foram colhidas duas amostras de leite cru de 500 mL cada, diretamente do silo de armazenamento. As amostras foram colhidas retirando-se cinco alíquotas de 100 mL em diferentes momentos durante o esvaziamento do silo (para transferência ao pasteurizador), em intervalos calculados de acordo com a velocidade de esvaziamento, que era de 10.000 L/h. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica e levadas ao Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) – FZEA/USP para que as análises fossem executadas.

4.3.1 Avaliação Microbiológica

As amostras de leite cru foram colhidas assepticamente em recipientes estéreis, e submetidas às contagens de mesófilos, psicrotróficos e avaliação do NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.3.2 Avaliação Físico-Química

O leite foi submetido à avaliação da composição (gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos) utilizando-se o analisador automático de leite marca AC-60® (Boeco, Germany).

Foram também realizadas análises de pH, acidez titulável, densidade, índice criscópico e alizarol 78°GL (IAL, 1985). Para os testes de detecção de resíduo de antibióticos utilizou-se o Charm SL β -lactam test™ (Charm Sciences Inc, USA).

4.3.3 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)

Para a avaliação da formação de compostos da reação de Maillard, foi determinada a concentração de HMF através de CLAE, de acordo com a metodologia descrita por Ferrer et al. (2000). Em resumo, a técnica foi executada de acordo com os seguintes passos: a) Pesagem de 15 g de leite em um tubo e adição de 5 mL de ácido oxálico 0,15 M, seguido de aquecimento em banho de água fervente por 25 minutos. b) Após resfriamento à temperatura ambiente, adição de 3 mL de solução de ácido tricloroacético 40%, agitando-se a mistura por 15 minutos, seguido de centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos (Figura 5a). c) Separação do sobrenadante e adição de 10 mL de solução de ácido tricloroacético 4% à fase sólida, agitando-se a mistura por 10 minutos, seguido de nova centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos. d) Descarte da fase sólida e ajuste do pH do sobrenadante (valor acima de 2,0), seguido de medição do volume total (Figura 5b) e filtração em membrana de 0,45 μ m (Figura 5c). e) Estocagem do extrato final da amostra em geladeira (7°C) até o momento da análise cromatográfica (período máximo de 10 dias).

Figura 5. Etapas da determinação por CLAE de hidroximetilfurfural no leite UAT: a- Centrifugação. b- Medida do volume final. c- Filtração. d- Injeção no sistema CLAE.

A identificação e quantificação de HMF foram conduzidas mediante a injeção de alíquotas de 20 μ L em um sistema CLAE (Shimadzu®) equipado com detector de luz UV (Figura 5d). Utilizou-se coluna Shim-pack C₁₈ (5 μ m) 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack (5 μ m) 4 x 10 mm. A corrida cromatográfica foi realizada nas condições operacionais preconizadas por Ferrer et al. (2000), a saber: fase móvel: acetonitrila + água (5 + 95), fluxo: 1,0 mL/minuto, comprimento de onda do detector de UV: 284 nm. A curva de calibração foi construída em cada dia de análise, utilizando-se padrões contendo 0,048, 0,096, 0,192, 0,384 e 0,768 μ g HMF/mL.

Ensaio preliminares demonstraram que o desvio padrão relativo (RSDr) das áreas obtidas para injeções repetidas dos padrões (10 replicatas, para cada nível de padrão de HMF) foi menor que 0,5%, para os níveis descritos (0,048 – 0,768 μ g HMF/mL). Deste modo, as curvas de calibração foram construídas em cada dia de análise com injeções únicas de cada padrão (ou seja, uma única replicata para cada nível). Ao todo, foram realizadas análises cromatográficas de HMF em nove diferentes dias, obtendo-se, portanto, nove diferentes curvas de calibração. Um exemplo de curva de calibração obtida nas análises encontra-se na Figura 6. O coeficiente de determinação (r^2) das curvas de HMF variou de 0,9959 a 0,9993, o que atesta a repetibilidade da técnica de preparação das curvas de calibração para HMF.

Os procedimentos de validação do referido método foram concluídos através de ensaios de recuperação utilizando-se duas amostras de leite UAT fortificadas com duas concentrações diferentes de HMF, sendo uma com adição de 19,12 μ g de HMF/ 100 mL de leite (amostra A), e outra com 38,25 μ g de HMF/ 100 mL de leite (amostra B). Cada uma das amostras fortificadas foi analisada em triplicata, ou seja: foram retiradas três alíquotas de 15 mL da amostra A e três alíquotas de 15 mL da amostra B, sendo que cada alíquota foi submetida aos mesmos procedimentos acima para análise de HMF. O leite original, do qual se obteve os dois volumes de 100 mL para o preparo das amostras A e B, também foi analisado em triplicata (ou seja: foram retiradas três alíquotas de 15 mL deste leite, sendo que cada alíquota foi submetida aos mesmos procedimentos acima para análise de HMF), com a finalidade de conhecer a concentração de HMF original no produto.

Figura 6. Exemplo de curva de calibração obtida na análise cromatográfica de hidroximetilfurfural em leite.

4.3.4 Avaliação da Lipólise

A lipólise do leite foi estimada através da alteração nas concentrações de ácidos graxos livres no produto ao longo do período de armazenamento. A determinação de AGL foi efetuada de acordo com a metodologia colorimétrica descrita originalmente por Shipe, Senyk e Fountain (1980), incluindo as modificações propostas por Ma, Barbano e Santos (2003).

Uma alíquota de 1 mL da amostra foi transferida para um tubo de vidro contendo 0,2 mL de ácido clorídrico 0,7 N, permanecendo refrigerada e em repouso por 24 horas. Após o período de repouso, 0,2 mL de solução Triton-X 100 foi adicionado ao tubo, que foi brevemente agitado em vortex. Em seguida, 4 mL do reagente cobre (trietanolamina e nitrato de cobre com pH 8,3) foram adicionados ao tubo, seguido de nova agitação em vortex. Após esta etapa, 12 mL do solvente CHM (clorofórmio:heptano:metanol 49:49:2) foram adicionados ao tubo e este foi submetido a agitação por 30 minutos a 240 rpm. As amostras foram então centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos (Figura 7a) para retirada de 3,5 mL do sobrenadante (Figura 7b), o qual foi transferido a um novo tubo contendo 0,1 mL de reativo de cor (Figura 7c), constituído de álcool N-butílico e dietiltiocarbamato de sódio. A leitura da absorbância foi efetuada a 440 nm, em espectrofotômetro (Figura 7d), e os valores convertidos em meq de AGL /kg de leite utilizando-se a equação obtida através da construção da curva de calibração. Esta foi construída utilizando-se ácido palmítico como padrão. A equação e a curva de calibração podem ser observadas na Figura 8.

Figura 7. Etapas da análise de ácidos graxos livres: a- Amostras após a centrifugação. b- Retirada do sobrenadante. c- Amostra com reativo de cor. d- Leitura em espectrofotômetro.

Figura 8. Exemplo de curva de calibração obtida para a avaliação de ácidos graxos livres (AGL).

4.3.5 Avaliação da Proteólise

O índice de proteólise do leite foi calculado quantitativamente através da relação caseína (C) / proteína verdadeira (PV), cujos valores foram obtidos conforme descrito abaixo:

$$PV = [\text{Nitrogênio Total (NT)} - \text{Nitrogênio Não Protéico (NNP)}] \times 6,38$$

$$C = [\text{Nitrogênio Total (NT)} - \text{Nitrogênio Não Caseinoso (NNC)}] \times 6,38$$

Este índice expressa a diminuição dos teores de caseína em relação à proteína verdadeira. Para a determinação do NT, utilizou-se o método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela AOAC (1995). A determinação do NNP foi efetuada após prévia precipitação das proteínas do leite UAT com ácido tricloroacético a 15%, seguido de filtração e análise do filtrado através do método de Kjeldahl. O NNC foi determinado através do procedimento descrito por Lynch e Barbano (1998), os quais preconizam a precipitação da caseína com solução de ácido acético e acetato de sódio (pH = 4,6), seguida de filtração e análise da concentração de N no filtrado mediante o método de Kjeldahl. O resultado final (NNC) foi subtraído do valor de NT, fornecendo assim a concentração de caseína na amostra.

Adicionalmente, o grau de proteólise individual das frações de caseína do leite foi determinado através de CLAE, de acordo com a metodologia preconizada por Bobe et al. (1998). O método inicia-se com a transferência de alíquotas de 500 µL de leite para um tubo de vidro e congelamento em freezer a - 20° C. Este procedimento foi realizado, para todas as amostras de leite UAT armazenado, exatamente no dia previsto para análise (dias 8, 30, 60, 90 e 120 após a fabricação de cada lote).

Ao tubo contendo a amostra congelada, acrescentou-se 500 µL de solução contendo 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de cloridrato de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotreitol (pH 7), seguido de agitação por 10 segundos em temperatura ambiente. Após permanecerem 1 hora em repouso (Figura 9a), os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 16.000 x g (Figura 9b). Removeu-se a camada de gordura com uma espátula e o restante da amostra foi diluído com uma solução contendo 4,5 M de cloridrato de guanidina e mistura de solventes (solvente A, composto por acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 + 900 + 1, pH 2,0). Esta solução continha, aproximadamente, 4 mg/mL de proteínas totais, sendo utilizada para a determinação das frações no cromatógrafo. Os extratos finais filtrados das amostras (Figura 9c) foram estocados em geladeira (7°C) até o momento da análise cromatográfica (período máximo de cinco dias).

A separação e a identificação preliminar das proteínas foram realizadas no mesmo sistema CLAE descrito anteriormente (Figura 9d), equipado com detector de luz UV e coluna Júpiter C₁₈ (4 µm, 4,6 X 150 mm) (Phenomenex, Torrance, USA). As amostras foram filtradas através de membrana de PTFE 0,45 µm (Millipore, USA), sendo que 20 µL da solução foram injetadas no sistema CLAE. A corrida cromatográfica foi realizada em temperatura ambiente, nas condições preconizadas por Bobe et al. (1998), detalhadas a seguir: Fases móveis: misturas de solventes A (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 : 900 : 1) e B (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 900 + 100 + 1). O programa de gradiente foi iniciado com 25% do solvente B, aumentando-se gradativamente a proporção do solvente B imediatamente após a injeção da amostra [34% (4 min.), 48% (11 min.), 50% (13 min.), 10% (17 min.)], retornando em seguida às condições iniciais após 2 min; Fluxo: 1,0 mL/minuto; Comprimento de onda do detector: 220 nm.

Figura 9. Etapas da determinação por CLAE de frações protéicas no leite UAT. a- Amostras em repouso. b- Centrifugação. c- Filtração. d- Injeção no sistema CLAE.

A quantificação das frações (caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ) nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, nas equações de regressão das curvas de calibração, construídas utilizando-se padrões de proteínas do leite bovino purificadas (Sigma, USA), preparados nas mesmas condições descritas para as amostras de leite, nas seguintes concentrações: caseína α_{s1} : 0,375, 0,75,

1,50 e 3,00 mg/mL; α_{s2} : 0,125, 0,25, 0,50 e 1,00 mg/mL; caseína β : 0,375, 0,75, 1,50 e 3,0 mg/mL; e caseína κ : 0,187, 0,375, 0,75 e 1,50 mg/mL.

Preliminarmente, os referidos padrões foram injetados 10 vezes no sistema CLAE (10 vezes cada um, separadamente), sendo que o desvio padrão relativo (RSDr) das áreas obtidas (consideradas, portanto, como replicatas) foi menor que 0,8%, para os níveis descritos de proteínas. Deste modo, as curvas de calibração foram construídas com injeções únicas de cada padrão (ou seja, uma única replicata para cada nível, de cada fração protéica). As curvas de calibração foram construídas em cada dia de análise. Ao todo, foram realizadas análises cromatográficas de proteínas em oito diferentes dias, obtendo-se, portanto, oito diferentes curvas de calibração. O coeficiente de determinação (r^2) das curvas variou de 0,9627 a 0,9998, sendo a repetibilidade da técnica de preparação das curvas de calibração para frações protéicas considerada como adequada para os fins propostos no experimento. Exemplos de curvas de calibração das frações protéicas encontram-se na Figura 10.

Figura 10. Exemplos de curvas de calibração obtidas na análise cromatográfica das frações de proteínas do leite.

Para a validação da metodologia analítica no laboratório, antes do início das análises das amostras experimentais, realizou-se um ensaio com uma amostra constituída por uma mistura de leite UAT (previamente analisada em triplicata) e padrões de caseína α_{s1} , caseína α_{s2} , caseína β e caseína κ nas concentrações finais de 8,84, 2,02, 8,99 e 1,33 mg/mL,

respectivamente. Esta amostra foi analisada em triplicata, ou seja, foram retiradas três alíquotas de 500 μL da amostra, sendo que cada alíquota foi submetida aos mesmos procedimentos acima para determinação das frações protéicas na mistura.

4.4 Processamento do Leite UAT

O leite foi processado de acordo com a seqüência descrita a seguir e ilustrada na Figura 11.

4.4.1 Tratamento térmico do Leite

O leite cru foi submetido à pasteurização rápida (HT-ST) em trocadores de calor a placas, sendo pré-aquecido a 50°C, clarificado em centrífuga, aquecido a 72-75°C por 15 segundos, imediatamente resfriado a 4°C e estocado temporariamente em balão isotérmico até o início do processamento para obtenção do leite UAT.

Figura 11: Fluxograma das operações para o processamento do leite UAT.

A esterilização industrial do leite pasteurizado foi realizada em um sistema contínuo construído pela empresa Tetra-Pak. Neste sistema, o leite tratado resfriado foi previamente aquecido a 85°C em trocadores tubulares, seguindo posteriormente na linha para injeção de vapor superaquecido até atingir a temperatura de 142-145°C, por 2 segundos. Em seguida, o leite foi submetido à evaporação em câmara de vácuo parcial, onde sofreu um 1º resfriamento até cerca de 70°C e homogeneizado em homogeneizadora de dois estágios, retornando ao trocador tubular para um 2º resfriamento à temperatura de cerca de 20°C.

4.4.2 Envase

O produto foi envasado automaticamente em embalagens assépticas cartonadas de 1 L, em sistema de torre construído pela mesma empresa. Todas as unidades produzidas em cada lote ficaram retidas na usina até o término do período de observação (sete dias) de amostras do lote mantidas em estufa a 35°C. Após o processamento dos lotes, e de acordo com os procedimentos de rotina da empresa, algumas unidades do produto foram submetidas ao teste de condutividade elétrica, para a verificação da existência de microfuros na embalagem, os quais poderiam interferir negativamente na qualidade do leite processado.

Após o período de observação de cada lote, foram reservadas 25 unidades do produto, as quais foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) da FZEA/USP, em Pirassununga/SP, onde foram armazenadas à temperatura ambiente durante 120 dias. Estas unidades constituíram as amostras destinadas às análises.

4.5 Avaliação do Leite Pasteurizado

Duas amostras, de 500 mL cada, de leite pasteurizado foram colhidas do silo de armazenamento, em diferentes momentos durante o seu esvaziamento (para transferência ao sistema UAT), em intervalos calculados de acordo com a velocidade de esvaziamento, que era de 6.000 L/h. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica e levadas ao LMMA – FZEA/USP para que se procedesse às análises descritas a seguir.

4.5.1 Avaliação Microbiológica

As amostras de leite pasteurizado, colhidas em recipientes estéreis, foram submetidas às contagens de mesófilos, psicrotróficos e avaliação do NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.5.2 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)

A quantificação de HMF no leite foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.

4.5.3 Avaliação da Lipólise

A concentração de AGL no leite foi determinada seguindo os procedimentos descritos no item 4.3.4.

4.5.4 Avaliação da Proteólise

A proteólise no leite pasteurizado foi avaliada pelo método de Kjeldahl e pelo sistema CLAE, conforme descrito no item 4.3.5.

4.6 Avaliação do Leite UAT

As amostras de leite UAT foram armazenadas a temperatura ambiente no LMMA – FZEA/USP. Cinco amostras por lote do produto (ou seja, cinco embalagens originais de leite UAT contendo, cada uma, 1 L do produto) foram utilizadas em cada dia de análise (dias 8, 30, 60, 90 e 120) para a execução das análises a seguir.

4.6.1 Avaliação Microbiológica

A qualidade microbiológica do leite UAT foi avaliada através da contagem de mesófilos, psicrotróficos e determinação do NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.6.2 Avaliação Físico-Química

As análises de pH, acidez titulável, gordura, ST e SNG foram executadas de acordo com as técnicas descritas pelo IAL (1985).

A avaliação da cor do leite UAT (Figura 12) foi realizada com o uso do colorímetro portátil MiniScan XE (HunterLab), sendo que a escala L* corresponde à luminosidade, com os valores de 0 (preto) a 100 (branco), a* é o componente vermelho-verde (-80 é verde e 100 é vermelho), e b* é o componente amarelo-azul, sendo -70 azul e 70 amarelo (RAMPILLI e ANDREINI, 1992).

Figura 12. Avaliação da cor do leite UAT através dos componentes L^* , a^* e b^* .

4.6.3 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroximetilfurfural)

A quantificação de HMF no leite UAT foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.

4.6.4 Avaliação da Lipólise

A concentração de AGL no leite UAT foi determinada seguindo os procedimentos descritos no item 4.3.4.

4.6.5 Avaliação da Viscosidade

A viscosidade aparente do leite UAT foi determinada a 25°C, com um viscosímetro rotacional (Figura 13), usando-se uma sonda cilíndrica número 1, a uma velocidade de 100 rpm. As leituras, em duplicata, foram efetuadas após 30 segundos de funcionamento da sonda e os resultados expressos em centipoise (KOHLMANN, NIELSEN e LADISCH, 1991).

Figura 13. Equipamento utilizado para a avaliação da viscosidade aparente do leite UAT.

4.6.6 Avaliação da Proteólise

A proteólise no leite UAT foi avaliada pelo método de Kjeldahl e pelo sistema CLAE, conforme descrito no item 4.3.5.

O Quadro 1 resume as análises laboratoriais executadas para os leites cru, pasteurizado e UAT, e a metodologia utilizada.

Quadro 1. Resumo das análises laboratoriais executadas no experimento.

<i>Análises</i>	<i>Cru</i>	<i>Pasteurizado</i>	<i>UAT</i>	<i>Metodologia</i>
CCS	X			Somaticell
Densidade	X			IAL (1985)
Índice crisocópico	X			IAL (1985)
Alizarol	X			IAL (1985)
Antibióticos	X			Charm test
pH	X		X	IAL (1985)
Acidez titulável	X		X	IAL (1985)
Gordura	X		X	Analizador; IAL (1985)
ST	X		X	Analizador; IAL (1985)
SNG	X		X	IAL (1985)
HMF	X	X	X	Ferrer et al. (2000)
AGL	X	X	X	Shipe et al. (1980); Ma, Barbano e Santos (2003)
PT, PV, C, IP	X	X	X	AOAC (1995)
Frações protéicas	X	X	X	Bobe et al. (1998)
Viscosidade			X	Kohlmann et al. (1991)
Cor			X	Rampilli e Andreini (1992)
Microbiologia	X	X	X	APHA (1992)

ST: sólidos totais; SNG: sólidos não gordurosos; HMF: hidroximetilfurfural; AGL: ácidos graxos livres; PT: proteína total; PV: proteína verdadeira ; C: caseína ; IP: índice de proteólise.

4.7 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais para os leites cru, pasteurizado e UAT em cada dia de análise foram utilizados para a determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r), entre os valores do log da CCS e as características avaliadas. O teste t de Student com distribuição normal foi utilizado na comparação dos coeficientes de correlação ao nível de 5% de significância (GACULA e SINGH, 1984).

Complementarmente, as 15 repetições foram divididas em três grupos, constituindo os grupos de baixa, intermediária e alta CCS. Deste modo, o delineamento utilizado para avaliar os efeitos da CCS sobre as características avaliadas no leite UAT durante o armazenamento foi o de blocos casualizados (cinco repetições) com medidas repetidas no tempo em cinco ocasiões (8, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento). A análise estatística das características avaliadas foi realizada utilizando-se o procedimento *proc mixed* do SAS® (SAS, 2004) e o posterior estudo de regressão foi feito através de contrastes ortogonais. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do Leite Cru

A CCS dos leites utilizados na fabricação dos 15 lotes de leite UAT amostrados variou de 197.000 a 800.000 CS/mL, ou 5,29 a 5,90 log CS/mL. O grupo com baixa CCS foi constituído por lotes com 197.000, 261.000, 282.000, 284.000 e 316.000 CS/mL; o grupo de CCS intermediária por lotes com 379.000, 418.000, 485.000, 500.000 e 560.000 CS/mL; e o grupo de alta CCS constituiu-se de lotes com 600.000, 630.000, 700.000, 700.000 e 800.000 CS/mL. Ressalta-se que o limite estabelecido na Instrução Normativa 51 para o leite cru refrigerado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste é de no máximo 1.000.000 CS/mL, devendo atingir o máximo de 750.000 CS/mL a partir de julho de 2008. Para o leite tipo B, o limite é de no máximo 600.000 CS/mL (MAPA, 2003).

Os resultados físico-químicos e microbiológicos do leite cru dos 15 lotes avaliados estão apresentados individualmente nos Anexos 1 e 2. As médias destas variáveis, correspondentes aos três grupos de CCS (baixa, intermediária e alta), encontram-se na Tabela 1. Todos os lotes foram estáveis no teste de alizarol e negativos no teste de resíduos de antibióticos. Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as características avaliadas nos leites dos três grupos de CCS. De fato, alguns autores afirmam que pode não haver relação entre a CCS e a concentração de gordura no leite (SCHULTZ, 1977; MUNRO, GRIEVE e KITCHEN, 1984). Os resultados obtidos concordam com Klei et al. (1998) e Marques, Balbinotti e Fischer (2002), que reportaram não haver influência da CCS nos teores de sólidos totais do leite.

Os valores médios de acidez titulável, densidade, índice crioscópico, sólidos não gordurosos e gordura estiveram de acordo com a legislação, apresentando variações dentro dos limites esperados. Os valores preconizados pela Instrução Normativa 51 para o leite cru refrigerado são: densidade de 1,028 a 1,034 g/mL; acidez titulável de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL; índice crioscópico máximo de $-0,530^{\circ}\text{H}$; mínimo de 3,0 g de gordura/100 g de leite; mínimo de 8,4 g de sólidos não gordurosos/100 g; e, mínimo de 2,8 g de proteína/100 g (MAPA, 2003).

Todos os lotes apresentaram valores de coliformes a 30°C acima de 110 NMP/mL. Com relação aos coliformes a 45°C, os níveis variaram de 46,64 NMP/mL (grupo de baixa CCS) a 110,0 NMP/mL (grupo de intermediária CCS). Os níveis de mesófilos observados foram elevados considerando-se o limite de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (6,0 log UFC/mL) recomendado na legislação para o leite cru refrigerado (MAPA, 2003). Diversas causas

podem ter contribuído para as altas contagens de mesófilos, entre elas, as condições higiênico-sanitárias durante a ordenha e a manutenção da cadeia do frio desde a obtenção do leite até a chegada ao laticínio. Além disso, é possível que o período de chuvas tenha contribuído para os altos níveis destes microrganismos nas amostras, uma vez que as amostras colhidas nos meses com maior precipitação pluviométrica (fevereiro, março e abril) apresentaram maiores contagens de mesófilos (Figura 14). Ressalta-se que Rossi Júnior et al. (2006) também encontraram contagens de mesófilos entre 10^7 e 10^8 UFC/mL (7,0 e 8,0 log UFC/mL, respectivamente) no leite cru destinado à fabricação de leite UAT em usina no Estado de São Paulo. Os níveis de microrganismos psicotróficos observados no leite cru foram semelhantes aos observados por Vidal-Martins et al. (2005) em leite UAT produzido em usina do Estado de São Paulo.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru¹.

Variáveis	CCS (x 1.000/mL)			Erro padrão
	197 - 316	379 - 560	600 - 800	
Acidez titulável (°D)	15,20	15,20	15,60	0,38
pH	6,81	6,84	6,79	0,03
Densidade (g/cm ³)	1,0321	1,0317	1,0318	0,0002
Índice crioscópico (°H)	-0,5472	-0,5454	-0,5360	0,0049
Sólidos totais (%)	12,40	12,24	12,22	0,14
Sólidos não gordurosos (%)	9,02	8,82	8,88	0,07
Gordura (%)	3,55	3,42	3,47	0,11
AGL (meq/kg) ²	0,43	0,47	0,45	0,06
HMF (µg/100g)	8,79	6,11	4,62	1,86
Mesófilos (log UFC/mL)	8,94	8,17	9,14	0,28
Psicotróficos (log UFC/mL)	5,88	7,25	5,84	0,81
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	46,64	110,00	89,86	18,95

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

² Expressos em meq de ácido palmítico/kg de leite.

AGL: ácidos graxos livres; HMF: hidroximetilfurfural.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Os valores de AGL variaram de 0,43 a 0,45 meq/kg de leite para os grupos de baixa e alta CCS, respectivamente. Estes valores podem ser considerados elevados, uma vez que no estudo de Santos et al. (2003), 63% dos painelistas detectaram defeitos sensoriais em níveis menores ou iguais a 0,35 meq/kg de leite pasteurizado. O HMF detectado em amostras não aquecidas, ou seja, no leite cru, apresentou variação de 0,91 a 16,99 µg/100g

(Anexo 2) e foi derivado da degradação da lactose causada pelas condições de hidrólise aplicadas durante a análise, da qual uma das etapas é a fervura com ácido oxálico (MORALES, ROMERO e JIMÉNEZ-PÉREZ, 1996).

Figura 14. Contagem de microrganismos mesófilos no leite cru de 15 lotes experimentais, de acordo com o mês de colheita das amostras.

Os resultados das análises de proteínas do leite cru de cada lote estão no Anexo 3. As médias obtidas para os grupos de CCS encontram-se na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as médias dos grupos para as variáveis proteína total, proteína verdadeira, caseína e índice de proteólise. Estes resultados concordam com os autores que afirmam não haver diferenças entre os teores de proteína total no leite cru com diferentes CCS (HAENLEIN, SCHULTZ e ZIKAKIS, 1973; MITCHELL, FEDRICK e ROGERS, 1986; VERDI et al., 1987), mas discordam dos que reportaram menores valores de caseína no leite com maiores CCS (HAENLEIN, SCHULTZ e ZIKAKIS, 1973). A concentração de α_{s2} -caseína foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo com alta CCS, quando comparado ao grupo de CCS intermediária, porém não houve diferenças entre o grupo de baixa CCS e os demais.

As correlações obtidas entre a CCS e as variáveis estudadas no leite cru estão apresentadas na Figura 15. Não houve correlação significativa entre CCS e teores de gordura ($P > 0,05$), o que discorda dos dados reportados por Marques, Balbinotti e Fischer (2002), que afirmaram haver maiores concentrações de gordura no leite cru com o aumento da CCS. Entretanto, El-Deeb e Hassan (1987) reportaram o inverso, ou seja, a concentração de gordura foi menor nos leites com maior CCS. No que se refere aos sólidos totais, Klei et al. (1998) e Marques, Balbinotti e Fischer (2002) afirmam não haver correlação com a CCS,

assim como observado no presente estudo. Porém, deve-se ressaltar que o nível máximo de CS neste estudo foi de 800.000 CS/mL e outros autores reportaram correlação negativa entre CCS e sólidos totais somente com níveis acima de 1.000.000 CS/mL (FERNANDES, OLIVEIRA e TAVOLARO, 2004).

Tabela 2. Resultados de proteínas do leite cru¹.

Variáveis	CCS (x 1.000/mL)			Erro padrão
	197 - 316	379 - 560	600 - 800	
Proteína total (%)	3,40	3,26	3,16	0,16
Proteína verdadeira (%)	3,17	3,07	2,96	0,15
Caseína (%)	2,64	2,50	2,48	0,16
Índice de proteólise	0,83	0,81	0,84	0,02
α_{s1} -caseína (mg/mL)	9,98	10,26	9,19	0,47
α_{s2} -caseína (mg/mL)	1,26 ^{ab}	1,39 ^a	0,98 ^b	0,10
β -caseína (mg/mL)	10,82	10,33	9,43	0,47
κ -caseína (mg/mL)	3,16	3,65	3,24	0,14

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

^{a,b} Médias, em uma mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem significativamente (P<0,05).

Não foram observadas correlações significativas (P>0,05) entre a CCS e as contagens de mesófilos, psicrotróficos e NMP de coliformes a 45°C. Estes resultados contrariam os dados obtidos por Packard e Ginn (1991), os quais observaram que os valores de CCS estão diretamente relacionados ao aumento dos níveis de psicrotróficos no leite. No presente trabalho, é possível que os níveis de psicrotróficos no leite cru tenham sido causados por falhas na cadeia do frio durante o armazenamento e transporte do leite.

As correlações entre CCS e teores de proteína verdadeira e caseína não foram significativas (P>0,05), fato este que está de acordo com os achados de Verdi et al. (1987), segundo os quais as porcentagens de proteína verdadeira e caseína no leite não são afetadas pelo nível de CS. No entanto, com relação às frações protéicas no leite cru, foram constatadas correlações negativas significativas entre a CCS e a concentração de α_{s2} -caseína (P=0,04) e β -caseína (P=0,04). A diminuição das concentrações de α_{s2} e β -caseína no leite pode ser atribuída à ação de proteases de origem dos leucócitos e da plasmina, já que estas hidrolisam preferencialmente as frações citadas (GRIEVE e KITCHEN, 1985).

Figura 15. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos, microbiológicos e proteínas do leite cru.

ST: sólidos totais; SNG: sólidos não gordurosos; AGL: ácidos graxos livres; HMF: hidroximetilfurfural; PV: proteína verdadeira.

* $P=0,0994$; ** $P=0,04$.

5.2 Avaliação do Leite Pasteurizado

A Tabela 3 contém os resultados das variáveis físico-químicas e microbiológicas avaliadas no leite pasteurizado, sendo que os respectivos dados individuais dos lotes analisados encontram-se no Anexo 4. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre os grupos quanto às concentrações de AGL e HMF. Os valores médios de mesófilos foram compatíveis com o limite definido para o leite tipo C pasteurizado, que é de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL (5,0 log UFC/mL) (MAPA, 2003). Rossi Júnior et al. (2006) relataram valores entre 10^2 e 10^4 UFC/mL (2,0 e 4,0 log UFC/mL, respectivamente) no leite pasteurizado destinado ao processamento UAT. Com relação aos níveis de psicrotróficos, foram observados, no presente estudo, 10 lotes com níveis abaixo de 3,50 log UFC/mL.

Os valores médios de proteína total, proteína verdadeira, caseína, índice de proteólise e frações protéicas dos leites pasteurizados dos três grupos encontram-se na Tabela 4, e os resultados individuais dos lotes no Anexo 5. Assim como observado no leite

cru, os percentuais de proteínas no leite pasteurizado não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre os grupos. O mesmo ocorreu quanto ao índice de proteólise e as concentrações das frações protéicas dos três grupos.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado¹.

Variáveis	CCS (x 1.000/mL)			Erro padrão
	197 - 316	379 - 560	600 - 800	
AGL (meq/kg) ²	0,47	0,41	0,49	0,60
HMF (µg/100g)	13,64	4,35	9,18	3,59
Mesófilos (log UFC/mL)	5,46	5,26	4,97	0,39
Psicrotróficos (log UFC/mL)	3,14	3,66	3,16	0,43
Coliformes a 30°C (NMP/mL)	35,02	1,09	29,42	0,49
Coliformes a 45°C (NMP/mL)	1,00	0,50	1,97	0,39

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

² Expressos em meq de ácido palmítico/kg de leite.

AGL: ácidos graxos livres; HMF: hidroximetilfurfural.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 4. Resultados de proteínas do leite pasteurizado¹.

Variáveis	CCS (x 1.000/mL)			Erro padrão
	197 - 316	379 - 560	600 - 800	
Proteína total (%)	3,33	3,00	3,04	0,13
Proteína verdadeira (%)	3,12	2,81	2,85	0,13
Caseína (%)	2,64	2,31	2,40	0,13
Índice de proteólise	0,84	0,82	0,84	0,01
α_{s1} -caseína (mg/mL)	9,82	9,64	9,55	0,57
α_{s2} -caseína (mg/mL)	1,15	1,07	0,99	0,13
β -caseína (mg/mL)	11,52	11,55	10,35	0,68
κ -caseína (mg/mL)	3,02	3,28	3,41	0,22

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Observou-se correlação negativa (Figura 16), embora não significativa ($P>0,05$), entre CCS e níveis de psicrotróficos, contrariando a afirmação de Packard e Ginn (1991) de que os valores de CCS estão diretamente relacionados ao aumento dos níveis de

psicrotróficos no leite. Foi constatada correlação negativa, porém não significativa ($P>0,05$), entre CCS e teores de proteína verdadeira e caseína. As correlações entre CCS e α_{s2} -caseína e β -caseína, apesar de permanecerem negativas, não foram significativas ($P>0,05$) no leite pasteurizado.

Figura 16. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos, microbiológicos e proteínas do leite pasteurizado.

ST: sólidos totais; SNG: sólidos não gordurosos; AGL: ácidos graxos livres; HMF: hidroximetilfurfural; PV: proteína verdadeira.

Não foram observadas correlações significativas a 5%.

5.3 Avaliação do Leite UAT

5.3.1 Avaliação Microbiológica

Todas as amostras de leite UAT revelaram-se negativas nas análises microbiológicas, em todos os dias de análise. Uma vez que na contagem de mesófilos e psicrotróficos não houve crescimento bacteriano na menor diluição utilizada em nenhuma placa, pode-se considerar o resultado <25 UFC/mL para todos os lotes. Para coliformes a 30°C e 45°C constatou-se ausência em todos os lotes em todos os dias de análise. Estes resultados indicam que o processo UAT foi eficaz para eliminar os microrganismos remanescentes do processo de pasteurização.

5.3.2 Avaliação Físico-Química

Os resultados físico-químicos (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) do leite UAT produzido nos 15 lotes avaliados estão apresentados individualmente no Anexo 6. As médias destas variáveis, correspondentes aos três grupos de CCS (baixa, intermediária e alta), encontram-se nas Tabelas 5 a 12. Não houve efeito da CCS ($P>0,05$) e não foram observadas interações ($P>0,05$) entre CCS e tempo de armazenamento para nenhuma das variáveis físico-químicas estudadas.

Os resultados das análises de pH e acidez titulável estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os valores de pH e acidez titulável dos 15 lotes variaram de 6,63 a 6,79 e de 16,8 a 20,2^oD, respectivamente (Anexo 6). Não foi observado efeito da CCS ($P>0,05$) sobre o pH e a acidez. Houve efeito linear do tempo de armazenamento ($P<0,05$) sobre o pH e a acidez (Figuras 17 e 18, respectivamente). Foram observados, no grupo de alta CCS, valores de acidez (Tabela 6) superiores a 18^oD, máximo preconizado na legislação (MAPA, 2006), a partir do dia 30 de armazenamento para o grupo de alta CCS, a partir do dia 60 no grupo de baixa CCS e do dia 90 para o grupo de CCS intermediária. A acidez do leite pode ter sido determinada pelo aumento na concentração de ácido láctico, formado pela degradação da lactose, ou por outros componentes como citratos, fosfatos e proteínas (FONSECA e SANTOS, 2000).

Tabela 5. Resultados de pH do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	pH				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	6,70	6,73	6,67	6,63	6,62
379 - 560	6,78	6,74	6,73	6,70	6,68
600 - 800	6,77	6,70	6,70	6,67	6,66
Erro padrão	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,31				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,50				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 17. Evolução do pH do leite UAT durante o armazenamento.

Tabela 6. Resultados de acidez titulável do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Acidez titulável (°D)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	16,60	17,00	18,40	18,80	20,20
379 - 560	17,40	17,60	17,60	19,20	22,00
600 - 800	16,80	18,00	18,40	19,20	22,00
Erro padrão	0,64	0,64	0,64	0,64	0,64
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,50				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,19				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 18. Evolução da acidez titulável do leite UAT durante o armazenamento.

Os valores médios obtidos nas análises de gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Os teores de gordura variaram de 2,4 a 3,5%, e de sólidos totais e não gordurosos de 10,61 a 12,08% e 7,34 a 9,66%, respectivamente (Anexo 6). Não houve efeito da CCS ($P > 0,05$) e do dia de armazenamento ($P > 0,05$) para as variáveis gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos. Nos dias 30, 90 e 120 de armazenamento, o grupo de baixa CCS apresentou médias de teor de gordura (Tabela 7) abaixo de 3,0%, valor mínimo exigido pela legislação (MAPA, 2006). O grupo de baixa CCS apresentou valores de sólidos não gordurosos (Tabela 9) abaixo do valor da legislação, que é de no mínimo 8,2% (MAPA, 2006), nos dias 8 e 120, e o grupo de alta CCS nos dias 8, 90 e 120 de armazenamento.

Tabela 7. Resultados percentuais da gordura do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Gordura (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	3,22	2,86	2,88	2,80	3,16
379 - 560	3,24	3,24	3,20	3,08	3,08
600 - 800	3,34	3,26	3,14	3,24	3,04
Erro padrão	0,08	0,20	0,16	0,17	0,15
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,32				
Dia	0,06				
CCS*Dia	0,43				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

Tabela 8. Resultados percentuais de sólidos totais do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Sólidos totais (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	11,29	11,60	11,84	11,13	10,87
379 - 560	12,14	11,51	11,61	11,34	11,55
600 - 800	11,18	11,86	11,86	10,41	10,70
Erro padrão	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,28				
Dia	0,06				
CCS*Dia	0,62				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.Tabela 9. Resultados percentuais de sólidos não gordurosos do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Sólidos não gordurosos (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	8,07	8,74	8,96	8,33	7,71
379 - 560	8,90	8,27	8,41	8,26	8,47
600 - 800	7,84	8,60	8,72	7,17	7,66
Erro padrão	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,26				
Dia	0,14				
CCS*Dia	0,46				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

As Tabelas 10, 11 e 12 contêm as médias obtidas nas análises dos componentes de cor L*, a* e b*, respectivamente, dos grupos de leite UAT. Os valores individuais (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) das análises de cor para cada lote estão apresentados no Anexo 7. Os valores médios encontrados para L*, a* e b* durante o armazenamento por 120 dias variaram de 91,72 a 92,80, -1,32 a -1,72 e 10,65 a 12,42, respectivamente. Rampilli e Andreini (1992) observaram valor semelhante para L* (92,56) no leite integral submetido ao processo UAT direto. Porém, para a* e b*, os valores obtidos por aqueles autores foram -

3,41 e 6,85, respectivamente, portanto menores do que os encontrados no presente trabalho. A diferença nos resultados de ambos os estudos pode estar relacionada às variações na composição dos pigmentos do leite dos rebanhos, devido, sobretudo às diferenças na alimentação dos animais em cada região.

Não houve efeito da CCS ($P > 0,05$) sobre os componentes L^* e b^* (Tabelas 10 e 12). Observou-se efeito linear do tempo de armazenamento ($P < 0,05$) sobre L^* e a^* (Figuras 19 e 20, respectivamente). A diminuição nos valores de L^* e o aumento nos valores a^* indicam um significativo escurecimento do leite no período de armazenamento, assim como relatado por LEWIS (1994). Para o componente a^* , houve também efeito significativo da CCS ($P < 0,05$) (Tabela 11), com diferença ($P = 0,02$) entre os grupos com CCS intermediária e alta (Figura 21). Isto significa que o leite com alta CCS apresentou coloração com maior tendência ao vermelho do que o leite com CCS intermediária. No entanto, a diferença entre os valores de a^* dos grupos de CCS baixa e alta não foi significativa ($P = 0,08$), o que sugere o envolvimento de outros fatores na coloração dos leites, principalmente nutricionais.

Tabela 10. Resultados do componente L^* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	L^*				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	92,74	92,71	92,39	92,10	91,94
379 - 560	92,79	92,52	92,50	92,17	91,90
600 - 800	92,87	92,34	92,78	92,25	92,54
Erro padrão	0,17	0,18	0,20	0,22	0,27
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,64				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,20				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 19. Evolução da luminosidade (L*) do leite UAT durante o armazenamento.

Tabela 11. Resultados do componente a* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	a*				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	-1,89	-1,73	-1,55	-1,27	-1,38
379 - 560	-2,01	-1,76	-1,59	-1,44	-1,22
600 - 800	-1,87	-1,54	-1,43	-1,19	-1,08
Erro padrão	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,02*				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,38				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 20. Evolução do componente a^* do leite UAT durante o armazenamento.

Figura 21. Valores médios do componente a^* do leite UAT de acordo com a CCS.

Tabela 12. Resultados do componente b* do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	b*				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	11,59	11,61	11,55	11,45	11,74
379 - 560	11,41	11,04	11,18	11,21	11,34
600 - 800	11,81	11,89	11,91	11,98	12,00
Erro padrão	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,09				
Dia	0,48				
CCS*Dia	0,73				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

Os coeficientes de correlação entre a CCS no leite cru e os parâmetros físico-químicos avaliados no leite UAT durante 120 dias de armazenamento encontram-se na Tabela 13. Não foram observadas correlações significativas ($P > 0,05$) entre CCS e as características físico-químicas estudadas, assim como observado no leite cru utilizado para a produção do leite UAT.

Tabela 13. Correlações entre CCS e parâmetros físico-químicos do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Acidez titulável	0,02	0,19	- 0,08	0,07	0,37
pH	0,27	- 0,35	0,00	0,20	0,32
Gordura	0,37	0,38	0,32	0,41	- 0,09
Sólidos totais	- 0,15	0,29	0,04	- 0,36	0,09
Sólidos não gordurosos	- 0,22	0,06	- 0,09	- 0,43	0,12
L*	0,08	- 0,32	0,49*	0,23	0,39
a*	0,03	0,34	0,28	0,19	0,42
b*	0,26	0,18	0,19	0,32	0,13

* $P = 0,0632$.

5.3.3 Avaliação de Compostos de Maillard (Hidroxiacetilfurfural)

5.3.3.1 Validação do Método de Análise

O tempo de retenção de HMF na corrida cromatográfica foi de aproximadamente 10,8 minutos. As Figuras 22a e 22b apresentam cromatogramas típicos obtidos para o padrão de HMF contendo 0,096 $\mu\text{g/mL}$ e para uma amostra de leite contendo 13,0 μg de HMF/100 mL, respectivamente. Os resultados obtidos nos ensaios de validação do método de análise de HMF encontram-se na Tabela 14. Excluindo-se a concentração de HMF no leite original (18,25 $\mu\text{g}/100$ mL de leite), as médias de recuperação obtidas nas amostras fortificadas foram 84,5% e 91,6%, respectivamente, para as amostras adicionadas com 19,12 $\mu\text{g}/100$ mL (amostra A) e 38,25 $\mu\text{g}/100$ mL (amostra B). Os coeficientes de variação obtidos para as amostras A (19,12 $\mu\text{g}/100$ mL) e B (38,25 $\mu\text{g}/100$ mL) foram 9,0% e 9,8%, respectivamente. Considerando a variabilidade destas grandezas em análise cromatográfica realizadas neste nível (no caso, partes por milhão), os resultados obtidos foram excelentes quanto à eficiência do método, de acordo com Horwitz (1982).

Figura 22. Cromatogramas obtidos na análise de hidroximetilfurfural (HMF): a- Padrão contendo 0,096 μg HMF/mL. b- Amostra de leite contendo 13,0 μg de HMF/100 mL.

Tabela 14. Recuperação média e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de hidroximetilfurfural (HMF).

HMF Adicionado ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)	HMF Observado ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$) ¹	HMF Médio ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
	14,48			
19,12	16,88	16,15	84,5	9,0
	17,08			
	33,68			
38,25	32,48	35,04	91,6	9,8
	38,96			

¹ Cada linha desta coluna se refere a um resultado obtido em análise individual de cada amostra contendo HMF adicionado (excluindo-se o HMF natural contido no leite utilizado para preparar a amostra), em triplicata.

5.3.3.2 Hidroximetilfurfural nas Amostras de Leite UAT

Os valores médios de HMF no leite UAT dos três grupos de CCS durante o armazenamento encontram-se apresentados na Tabela 15. Não houve efeito da CCS ($P>0,05$) e não foi constatada interação ($P>0,05$) entre CCS e dias de armazenamento. Pode-se observar, comparando-se o dia 120 ao dia 8, um aumento na concentração de HMF no leite UAT durante o armazenamento, porém este aumento não foi significativo ($P>0,05$). O armazenamento de leites UAT em temperaturas superiores a 30°C promove a formação de HMF após poucas semanas (JIMÉNEZ-PÉREZ et al., 1992). No entanto, deve-se ressaltar que os leites utilizados no presente experimento foram armazenados em temperatura ambiente, a qual não excedeu 30°C.

Os resultados individuais de HMF nos lotes de leite UAT (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) variaram de 11,55 a 28,24 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ (Anexo 6). Morales, Romero e Jiménez-Pérez (2000) reportaram valores médios muito acima dos obtidos no presente estudo, sendo 5,6 μmol de HMF/L (equivalente a 70,62 $\mu\text{g}/100\text{mL}$) no leite integral obtido por processo UAT direto, e de 5,2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (equivalente a 65,58 $\mu\text{g}/100\text{mL}$) para leites UAT comercializados na Espanha (MORALES, ROMERO e JIMÉNEZ-PÉREZ, 1996).

Os coeficientes de correlação entre a CCS no leite cru e o nível de HMF no leite UAT durante os 120 dias de armazenamento encontram-se na Tabela 16. As correlações foram negativas, porém não significativas ($P>0,05$), nos dias 30, 60 e 120 após a fabricação. No dia 60, o valor de “r” foi - 0,47 ($P=0,0751$), indicando uma possível associação entre o aumento da CCS e a diminuição dos níveis de HMF nas amostras de leite UAT durante o período do armazenamento do produto.

Os dados de ocorrência de HMF em função da CCS, obtidos no presente experimento, são inéditos, não sendo conhecidas as possíveis causas específicas desta correlação negativa. Sabe-se que as reações de Maillard ocorrem no leite envolvendo a lactose e resíduos de aminoácidos, principalmente lisina de origem das caseínas (Van BOEKEL, 1998). Portanto, a quantificação de lisina no leite com diferentes níveis de CS poderá ser de interesse para auxiliar no esclarecimento deste tema em futuras pesquisas.

Tabela 15. Resultados de hidroximetilfurfural (HMF) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	HMF (µg/100g)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	13,91	22,39	25,18	20,20	32,73
379 - 560	15,17	10,99	12,26	15,14	34,90
600 - 800	14,15	14,93	14,90	23,28	20,57
Erro padrão	2,78	2,31	4,24	5,41	9,90
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,31				
Dia	0,11				
CCS*Dia	0,26				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

Tabela 16. Correlações entre CCS e hidroximetilfurfural (HMF) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
HMF	0,08	- 0,32	- 0,47*	0,20	- 0,22

* P=0,0751.

5.3.4 Avaliação da Lipólise

Na Tabela 17 estão apresentados os valores médios de AGL no leite UAT para os três grupos de CCS durante o armazenamento. As concentrações individuais de AGL nos 15 lotes de leite UAT (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) variaram de 0,38 a 0,76 meq/kg de leite (Anexo 6). Não houve efeito da CCS ($P>0,05$) sobre a concentração de AGL e não houve interação ($P>0,05$) entre CCS e dias de armazenamento.

A concentração de AGL aumentou durante 120 dias após a produção, observando-se um efeito linear do dia de armazenamento ($P<0,05$) (Figura 23). Este efeito evidencia o aumento da lipólise no leite UAT durante o armazenamento, similarmente ao que ocorre com

o leite pasteurizado, conforme reportado por Shipe e Senyk (1981). A ocorrência de lipólise no leite UAT durante o armazenamento indica que as lipases do leite sobreviveram ao tratamento térmico. Choi e Jeon (1993) detectaram atividade residual de lipase em amostras de leite UAT, sendo que a atividade da enzima não foi afetada pelo tempo de armazenamento (BLAKE et al., 1995).

Tabela 17. Resultados da concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	AGL (meq/kg) ²				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	0,33	0,51	0,58	0,73	0,78
379 - 560	0,35	0,46	0,53	0,59	0,64
600 - 800	0,44	0,45	0,63	0,64	0,66
Erro padrão	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,65				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,17				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

² Expressos em meq de ácido palmítico/kg de leite.

* Significativo.

Figura 23. Evolução da concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante o armazenamento.

Em estudo sensorial com leite pasteurizado, constatou-se que 34% dos painelistas puderam detectar defeitos sensoriais quando a concentração de AGL foi de 0,25 meq/kg de leite. Aproximadamente 63% dos painelistas detectaram defeitos em níveis menores ou iguais a 0,35 meq/kg de leite com 2% de gordura (SANTOS et al., 2003). No presente trabalho, as concentrações de AGL nos leites UAT dos grupos baixa, intermediária e alta CCS foram 0,33, 0,35 e 0,44 meq/kg, respectivamente, já a partir do dia 8 de armazenamento, concordando com a afirmação de que esta concentração no leite de vacas com alta CCS é maior (RANDOLPH e ERWIN, 1974). Este fato indica que, de acordo com o estudo de Santos et al. (2003), os leites contendo intermediária e alta CCS poderiam apresentar defeitos sensoriais já no início da vida de prateleira. Porém, deve-se destacar que a concentração de AGL foi alta também no leite cru (Tabela 1), mantendo-se elevada no leite pasteurizado (Tabela 3), e posteriormente aumentando durante o armazenamento do leite UAT (Tabela 17). Esta tendência de aumento de AGL nos leites cru e seus respectivos derivados lácteos durante o armazenamento foi também observada em estudos com outros produtos fabricados a partir de leite com diferentes níveis de CS, como o iogurte batido (FERNANDES, OLIVEIRA e LIMA, 2007) e queijos Minas Frescal e Mussarela (ANDREATTA, 2006).

As correlações entre CCS e AGL no leite UAT encontram-se na Tabela 18. Foram observadas correlações positivas nos dias 8 e 60 e negativas nos dias 30, 90 e 120 após a fabricação, porém não significativas ($P>0,05$). Estes resultados contrariam resultados de estudos nos quais foi constatada correlação positiva entre a concentração de AGL e o nível de CS (SALIH e ANDERSON, 1979; BACHMAN et al., 1988). É importante lembrar que, no presente trabalho, não houve correlação significativa ($P>0,05$) entre AGL e CCS nos leites cru (Figura 15) e pasteurizado (Figura 16). Este fato indica que as altas concentrações de AGL no leite podem ter sido causadas por outros fatores, que não a CCS, tais como a agitação mecânica do leite, nutrição dos animais ou ação de enzimas bacterianas (DOWNEY, 1980). No entanto, as correlações de log de mesófilos e psicrotróficos com a concentração de AGL foram de 0,43 e -0,47 no leite cru ($P>0,05$) e de 0,16 e -0,06 no leite pasteurizado ($P>0,05$), respectivamente (dados não apresentados).

Tabela 18. Correlações entre CCS e concentração de ácidos graxos livres (AGL) do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
AGL	0,25	- 0,12	0,23	- 0,26	- 0,24

Não foram observadas correlações significativas a 5%.

5.3.5 Avaliação da Viscosidade

A Tabela 19 contém os valores médios de viscosidade aparente no leite UAT durante o armazenamento para os grupos de CCS. Não foi observado efeito da CCS ($P>0,05$) sobre a viscosidade e não houve interação ($P>0,05$) entre CCS e dias de armazenamento. As correlações entre a CCS e viscosidade aparente, apresentadas na Tabela 20, foram negativas nos dias 30, 60 e 120 de armazenamento, porém não foram significativas ($P>0,05$).

Os valores individuais de viscosidade aparente dos 15 lotes de leite UAT (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) variaram de 1,41 a 1,55 (Anexo 6), com exceção do lote contendo 418.000 CS/mL, cuja média foi 4,39 cP. Este lote apresentou sinais visíveis de gelatinização no terço final do período de armazenamento, apresentando valores de 8,57 e 9,16 cP nos dias 90 e 120, respectivamente. Por este motivo, estes valores foram excluídos da análise estatística. Topçu, Numanoğlu e Saldamli (2006) também observaram gelatinização em leites com mais de 315.000 CS/mL, porém somente após 150 dias de armazenamento.

Tabela 19. Resultados de viscosidade aparente do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Viscosidade aparente (cP)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	1,44	1,48	1,46	1,46	1,61
379 - 560	1,42	1,39	1,41	1,50	1,60
600 - 800	1,52	1,44	1,44	1,49	1,52
Erro padrão	0,03	0,04	0,03	0,82	0,88
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,73				
Dia	0,0001*				
CCS*Dia	0,24				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Tabela 20. Correlações entre CCS e viscosidade aparente do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
Viscosidade aparente	0,47*	- 0,20	- 0,03	0,15	- 0,38

* $P=0,0764$.

No estudo de Datta e Deeth (2003), as viscosidades dos leites gelatinizados foram altas, mas não houve correlação entre viscosidade e proteólise nestes leites. De acordo com os autores, a viscosidade é alta quando o leite está se aproximando do ponto de gelatinização, mas decresce posteriormente, quando o gel é quebrado pela ação proteolítica. Em seguida, a proteólise aumenta progressivamente e atinge níveis mais altos, enquanto a viscosidade do leite retorna a baixos níveis.

Kohlmann, Nielsen e Ladisch (1991) afirmam que a adição de plasmina no leite UAT causa formação de gel a partir de 90 dias de armazenamento, e esta gelatinização é acompanhada de aumento na viscosidade aparente. Christen e Ndomba (1991), também em estudo com leite UAT, concluíram que quanto maior a CCS, menor a viscosidade do produto. Apesar da controvérsia, Hill (1988) afirma que a mastite constitui um dos fatores que afetam a gelatinização do leite. No presente estudo, a CCS não influenciou significativamente a viscosidade do leite UAT.

De modo geral, ocorreu um aumento significativo ($P < 0,05$) da viscosidade do produto durante o armazenamento (Figura 24). O aumento da viscosidade aparente pode também estar relacionado à associação de β -lactoglobulina desnaturada às micelas de caseína no leite UAT. De acordo com Vidal-Martins et al. (2005), em até 30 dias de armazenamento a viscosidade do leite UAT permanece constante. Hill (1988) constatou que, após o tratamento UAT, a viscosidade do leite diminui durante os primeiros dias de armazenamento, permanecendo constante por um período relativamente longo e, finalmente, aumenta rapidamente para a gelatinização, sinalizando o final da vida de prateleira.

Em síntese, a qualidade do leite cru pode ocasionar a gelatinização do leite UAT durante o armazenamento, porém, outros fatores também podem estar relacionados a este processo, como a intensidade e duração do tratamento térmico, o grau de proteólise durante o armazenamento, a sazonalidade da produção e a temperatura de armazenamento (DATTA e DEETH, 2001).

Figura 24. Evolução da viscosidade aparente do leite UAT durante o armazenamento.

5.3.6 Avaliação da Proteólise

5.3.6.1 Método Kjeldahl

Os valores obtidos para proteína total, proteína verdadeira, caseína e índice de proteólise, utilizando o método Kjeldahl, encontram-se nas Tabelas 21, 22, 23 e 24, respectivamente. Os resultados individuais das análises de proteínas dos lotes de leite UAT (médias dos dias 8, 30, 60, 90 e 120) estão apresentados no Anexo 8. Não foi observado efeito da CCS ($P > 0,05$) sobre os parâmetros citados e não houve interação ($P > 0,05$) entre CCS e dia de armazenamento.

Não houve efeito do dia de armazenamento ($P > 0,05$) sobre a concentração de proteína total no leite (Tabela 21). Com relação à proteína verdadeira e caseína do leite UAT dos três grupos de CCS (Tabelas 22 e 23, respectivamente), observou-se um efeito linear de diminuição ($P < 0,05$) em função do tempo de armazenamento. As evoluções das concentrações de proteína verdadeira e caseína no leite UAT durante o armazenamento encontram-se nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Tabela 21. Resultados percentuais de proteína total do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Proteína total (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	3,36	2,93	3,13	3,21	3,22
379 - 560	3,36	2,98	2,81	2,78	2,93
600 - 800	3,19	3,13	3,26	2,96	2,99
Erro padrão	0,13	0,21	0,17	0,17	0,07
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,28				
Dia	0,08				
CCS*Dia	0,41				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.Tabela 22. Resultados percentuais de proteína verdadeira do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Proteína verdadeira (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	3,15	2,75	2,93	2,97	2,99
379 - 560	3,13	2,77	2,61	2,56	2,73
600 - 800	3,01	2,95	3,05	2,74	2,75
Erro padrão	0,12	0,20	0,16	0,16	0,08
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,24				
Dia	0,05*				
CCS*Dia	0,41				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 25. Evolução do percentual de proteína verdadeira do leite UAT durante o armazenamento.

Tabela 23. Resultados percentuais de caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Caseína (%)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	2,91	2,48	2,57	2,64	2,65
379 - 560	2,87	2,45	2,29	2,23	2,41
600 - 800	2,78	2,62	2,74	2,37	2,35
Erro padrão	0,12	0,18	0,19	0,16	0,07
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,24				
Dia	0,0003*				
CCS*Dia	0,54				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 26. Evolução do percentual de caseína do leite UAT durante o armazenamento.

Os resultados do índice de proteólise do leite UAT encontram-se na Tabela 24. O índice de proteólise do leite UAT dos três grupos diminuiu durante o armazenamento, ou seja, houve efeito linear do tempo de armazenamento ($P < 0,05$) sobre esta variável (Figura 27). Deve-se ressaltar que este índice foi calculado a partir do percentual de caseína em relação ao percentual de proteína verdadeira. Portanto, a diminuição deste índice indica que ocorreu um aumento da proteólise do leite UAT durante o armazenamento. Este resultado concorda com o estudo de Vidal-Martins et al. (2005), no qual foi reportado um aumento na proteólise do leite UAT durante o armazenamento, estimada a partir da determinação de ácido siálico liberado da fração κ -caseína. Verdi et al. (1987) e Barbano, Rasmussen e Lynch (1991) observaram que a caseína, expressa como porcentagem da proteína verdadeira, é menor no leite cru com alta CCS. Esta tendência também foi observada no presente estudo para o leite UAT no terço final do armazenamento por 120 dias, embora as diferenças entre as médias não tenham sido significativas ($P > 0,05$).

As correlações entre a CCS e os percentuais de proteínas e o índice de proteólise estão apresentadas na Tabela 25. Observou-se uma correlação negativa não significativa ($P > 0,05$) entre CCS e os percentuais de proteína total, proteína verdadeira e caseína no leite UAT nos dias 8, 90 e 120 de armazenamento. O índice de proteólise teve correlação negativa com a CCS nos dias 30, 90 e 120 de armazenamento, porém a correlação foi significativa ($P < 0,05$) somente no 120º dia após a fabricação, o que corrobora a tendência referida no parágrafo anterior. Estes resultados concordam com os dados reportados por Verdi et al. (1987), os quais sugerem atividade proteolítica associada à alta CCS. Senyk, Barbano e Shipe (1985) afirmaram que a proteólise do leite pasteurizado aumenta com o

incremento da CCS, prejudicando a qualidade do produto ao longo da vida de prateleira. O presente estudo constata que este fato é também verdadeiro para o leite UAT, sobretudo no final de sua vida de prateleira.

Tabela 24. Resultados do índice de proteólise, expresso como quantidade de caseína em relação à proteína verdadeira, do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	Índice de proteólise				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	0,92	0,90	0,87	0,89	0,89
379 - 560	0,92	0,88	0,87	0,87	0,88
600 - 800	0,92	0,89	0,89	0,86	0,86
Erro padrão	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,55				
Dia	0,0001*				
CCS*Dia	0,22				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 27. Evolução do índice de proteólise do leite UAT durante o armazenamento.

Tabela 25. Correlações entre CCS e resultados de análises de proteínas do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia120
Proteína total	- 0,17	0,17	0,25	- 0,25	- 0,35
Proteína verdadeira	- 0,17	0,18	0,25	- 0,24	- 0,35
Caseína	- 0,14	0,14	0,28	- 0,27	- 0,49*
Índice de proteólise	0,07	- 0,30	0,31	- 0,29	- 0,67**

* P=0,0654; ** P=0,0067.

5.3.6.2 Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Na análise das frações protéicas por CLAE, os tempos de retenção de α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína foram 10,9 min, 9,3 min, 11,4 min e 8,3 min, respectivamente. Na Figura 28, pode-se observar um exemplo de cromatograma obtido para o padrão de proteínas, contendo 4,0 mg/mL de α_s -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína. Os resultados obtidos no ensaio de validação do método para análise de proteínas encontram-se na Tabela 26. As concentrações teóricas na amostra constituída por uma mistura de leite UAT (previamente analisado em triplicata) e padrões de α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína foram 8,84, 2,02, 8,99 e 1,33 mg/mL, respectivamente. Considerando estes valores como referência, as médias de recuperação obtidas nesta amostra foram 91,0%, 94,2%, 91,9% e 91,2%, respectivamente, para as caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ . Os coeficientes de variação obtidos para a α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína foram 8,0%, 12,5%, 6,5% e 12,7%, respectivamente.

Figura 28. Cromatograma obtido na análise das frações protéicas. Padrão contendo 4,0 mg/mL de α_s -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína.

κCN: κ -caseína; αCNs1: α_{s1} -caseína; αCNs2: α_{s2} -caseína; βCN: β -caseína; βLG: β -lactoglobulina; αLA: α -lactoalbumina.

Tabela 26. Recuperação média e coeficientes de variação obtidos nos ensaios de validação do método de análise de proteínas.

Fração Protéica	Concentração Teórica (mg/mL) ¹	Concentração Observada (mg/mL) ²	Recuperação Média (%)	Coeficiente de Variação (%)
α_{s1} -caseína	8,84	8,64	91,0	8,0
		7,36		
		8,15		
α_{s2} -caseína	2,02	1,79	94,2	12,5
		2,18		
		1,75		
β -caseína	8,99	8,82	91,9	6,5
		7,75		
		8,21		
κ -caseína	1,33	1,34	91,2	12,7
		1,27		
		1,04		

¹ Concentração calculada de cada fração protéica na amostra constituída por uma mistura de leite UAT (previamente analisado em triplicata) e padrões de caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ ;

² Cada linha desta coluna se refere a um resultado obtido em análise individual da amostra constituída por uma mistura de leite UAT e padrões de caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ .

5.3.6.3 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As Tabelas 27, 28, 29 e 30 apresentam as concentrações médias das frações α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e κ -caseína nos grupos de leite UAT, respectivamente. Não foram observadas interações ($P>0,05$) entre CCS e dias de armazenamento para nenhuma das frações protéicas avaliadas. Os valores individuais das frações protéicas dos 15 lotes de leite UAT (médias dos dias 8, 3, 60, 90 e 120) encontram-se no Anexo 8.

Não houve efeito da CCS ($P>0,05$) sobre a concentração de α_{s1} -caseína no leite UAT (Tabela 27). Entretanto, observou-se um efeito linear do tempo de armazenamento ($P<0,05$) sobre a α_{s1} -caseína, sendo que os valores diminuíram para todos os grupos durante os 120 dias (Figura 29). Com relação à concentração de α_{s2} -caseína no leite de cada grupo de CCS (Tabela 28), não foram observados efeitos da CCS ($P>0,05$) e do tempo de armazenamento ($P>0,05$) sobre esta fração.

Tabela 27. Resultados da concentração de α_{s1} -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	α_{s1} -caseína (mg/mL)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	11,27	8,94	9,21	7,10	6,99
379 - 560	10,24	9,76	9,06	7,50	6,95
600 - 800	8,69	9,32	8,37	7,16	6,65
Erro padrão	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,67				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,21				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 29. Evolução da concentração de α_{s1} -caseína do leite UAT durante o armazenamento.

Tabela 28. Resultados da concentração de α_{s2} -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	α_{s2} -caseína (mg/mL)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	1,75	1,66	1,87	1,53	1,56
379 - 560	1,83	1,91	1,95	1,86	1,63
600 - 800	1,49	1,53	1,26	1,41	1,37
Erro padrão	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,15				
Dia	0,49				
CCS*Dia	0,72				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

A Tabela 29 contém os valores médios obtidos para β -caseína nos três grupos de CCS durante o armazenamento. Comparado aos demais grupos, o leite de alta CCS apresentou menores concentrações de β -caseína em todos os dias de análise, evidenciando um efeito da CCS ($P < 0,05$) sobre os valores médios de β -caseína. Deste modo, observou-se uma diferença significativa ($P = 0,03$) entre os grupos de baixa e alta CCS, conforme apresentado na Figura 30. Contudo, as diferenças entre os grupos de CCS baixa e intermediária, e CCS intermediária e alta, não foram significativas, apresentando valores de $P = 0,81$ e $0,08$, respectivamente. Adicionalmente, observou-se efeito linear de diminuição, em função do tempo de armazenamento ($P < 0,05$), sobre a concentração desta fração protéica (Figura 31).

Tabela 29. Resultados da concentração de β -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	β -caseína (mg/mL)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	11,54	11,24	10,56	9,43	7,45
379 - 560	11,32	10,53	9,88	8,47	7,81
600 - 800	9,58	8,27	8,38	6,97	6,39
Erro padrão	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,02*				
Dia	< 0,0001*				
CCS*Dia	0,80				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 30. Concentração média de β -caseína do leite UAT de acordo com a CCS.

Figura 31. Evolução da concentração de β -caseína do leite UAT durante o armazenamento.

Os resultados das concentrações médias de κ -caseína no leite UAT para os grupos de CCS encontram-se na Tabela 30. Não houve efeito da CCS ($P > 0,05$) sobre a κ -caseína. Observou-se somente diminuição da concentração da fração protéica ao longo do armazenamento, ou seja, houve efeito linear do tempo de armazenamento ($P < 0,05$) sobre esta fração (Figura 32).

Tabela 30. Resultados da concentração de κ -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento¹.

CCS (x 1.000/mL)	κ -caseína (mg/mL)				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
197 - 316	3,37	3,26	3,14	2,60	2,41
379 - 560	3,57	3,76	3,75	3,68	3,13
600 - 800	3,61	3,95	3,52	3,22	3,25
Erro padrão	0,32	0,32	0,50	0,42	0,37
Fonte de variação	----- P valor (nível descritivo do teste) -----				
CCS	0,41				
Dia	0,0004*				
CCS*Dia	0,50				

¹ Médias de amostras analisadas em duplicatas.

* Significativo.

Figura 32. Evolução da concentração de κ -caseína do leite UAT durante o armazenamento.

A Tabela 31 contém os coeficientes de correlação entre a CCS no leite cru e a concentração de cada fração de caseína no leite UAT nos dias 8, 30, 60, 90 e 120 após a fabricação. Foram constatadas correlações negativas para a α_{s1} -caseína ($P=0,03$) e β -caseína ($P=0,03$) no dia 8, e para a α_{s2} -caseína ($P=0,005$) no dia 60 após a fabricação. A fração β -caseína apresentou correlação negativa com a CCS durante todo o período de armazenamento, com valores de P iguais a 0,09, 0,06 e 0,06 nos dias 30, 60 e 90, respectivamente. A κ -caseína apresentou correlação positiva, porém não significativa ($P>0,05$), com a CCS durante todo o período de armazenamento. Estes resultados são coerentes com as concentrações de caseínas no leite cru obtidas por Randolph, Erwin e Richter (1974), os quais reportaram que o leite considerado positivo para mastite pelo teste WMT apresentou maiores teores de κ -caseína e menores concentrações de β -caseína (22%), em comparação ao leite normal.

Tabela 31. Correlações entre CCS e concentrações das frações protéicas do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.

Variável correlacionada à CCS	Coeficiente (r), n=15				
	Dia 8	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia120
α_{s1} -caseína	- 0,56**	0,11	- 0,26	0,05	0,03
α_{s2} -caseína	- 0,24	- 0,05	- 0,69***	- 0,12	- 0,23
β -caseína	- 0,57**	- 0,46*	- 0,49*	- 0,49*	- 0,19
κ -caseína	0,09	0,41	0,07	0,09	0,22

* $P<0,10$; ** $P=0,03$; *** $P=0,0045$.

A atividade proteolítica pode estar associada em grande parte à CCS (SAEMAN, VERDI e GALTON, 1988; BALLOU et al., 1995), o que predispõe o leite a uma substancial hidrólise da α_s - e β -caseína por proteases, havendo diminuição nos níveis destas frações no leite (RANDOLPH, ERWIN e RICHTER, 1974; VERDI et al., 1987). A taxa de proteólise das caseínas pelas proteases de diferentes fontes ocorre de acordo com a seguinte ordem: proteases originárias de leucócitos: α_{s1} - > β - > κ -caseína; plasmina: β - > α_{s1} - > κ -caseína (GRIEVE e KITCHEN, 1985); e, proteases de origem de microrganismos psicrótrófos: β - $\approx$ κ - > α_{s1} -caseína (GRIEVE e KITCHEN, 1985; GASSEM e FRANK, 1991).

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que houve atividade proteolítica no leite UAT durante o armazenamento, com conseqüente diminuição de β -caseína e de α_s -caseína, similar à ordenação da taxa de proteólise encontrada para plasmina: β -caseína > α_{s1} -caseína > κ -caseína, descrita por Grieve e Kitchen (1985). De acordo com Manji, Kakuda e Arnott (1986), o plasminogênio é convertido em plasmina no leite UAT durante o armazenamento, o que justifica a ordenação da atividade proteolítica nos leites UAT avaliados.

Observou-se gelatinização em um dos lotes de leite UAT, contendo 418.000 CS/mL, a partir do dia 90 de armazenamento. Neste lote, o percentual de caseína em relação à proteína verdadeira foi inferior aos demais lotes avaliados, apresentando um valor de 86,0%, o que corresponde a um índice de proteólise de 0,86 (Anexo 8). Isto indica que a proteólise durante o armazenamento e a composição do leite podem ter influenciado na gelatinização deste lote (DATTA e DEETH, 2001). As amostras deste lote também apresentaram alterações nítidas nas frações protéicas, o que foi evidenciado nos picos cromatográficos, como se pode observar na Figura 33.

A partir do dia 60, os picos cromatográficos apresentaram-se fragmentados, indicando degradação das frações protéicas, principalmente α_{s1} e β -caseína. Ao avaliar a qualidade do leite UAT durante o armazenamento, Hill (1988) afirmou que a gelatinização do produto pode ocorrer após um mês de armazenamento, mas raramente ocorre antes de três meses, o que concorda com os dados reportados no presente trabalho.

Figura 33. Cromatogramas das frações protéicas de leite cru e UAT. a-Cru; b-UAT dia 8; c-UAT dia 30; d-UAT dia 60; e-UAT dia 90; f-UAT dia 120.

κCN: κ-caseína; aCNs1: α_{s1}-caseína; aCNs2: α_{s2}-caseína; bCN: β-caseína; bLG: β-lactoglobulina; aLA: α-lactoalbumina.

No presente estudo, observou-se que durante o armazenamento do leite UAT por 120 dias houve aumento da proteólise da caseína. Constatou-se também que a CCS influenciou na proteólise da β -caseína, e que quanto maior a CCS, maior foi a proteólise no período final de armazenamento. A degradação das frações majoritárias de caseína constitui um dos principais fatores que afetam a qualidade do leite UAT. A proteólise associada ao aumento da CCS no leite promove a desestabilização das micelas de caseína, o que provavelmente contribui para aumentar a suscetibilidade do leite UAT à gelatinização. Além disso, a hidrólise enzimática da caseína associada à CCS pode ocasionar importantes alterações sensoriais no leite, principalmente o sabor amargo, devido à liberação de peptídeos. Por estas razões, recomenda-se a produção de leite UAT a partir de leite cru com baixa CCS, com a finalidade de evitar os possíveis efeitos da proteólise, obtendo-se um produto com qualidade adequada e estável ao longo da vida de prateleira.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- a-** O aumento da CCS é acompanhado de uma diminuição dos níveis de α_{s2} e β -caseína no leite cru.
- b-** O aumento da CCS correlaciona-se negativamente com os níveis de α_{s1} e β -caseína no leite UAT aos 8 dias de armazenamento do produto, e aos 60 dias para a fração α_{s2} -caseína.
- c-** A CCS está correlacionada à diminuição da caseína em relação à proteína verdadeira no leite UAT no final da vida de prateleira.
- d-** Independentemente da CCS, a viscosidade aparente, a concentração de AGL e a proteólise no leite UAT aumentam durante o armazenamento, além de ocorrer um escurecimento do produto ao longo de 120 dias.
- e-** Os percentuais de proteína verdadeira e caseína, bem como as concentrações de frações protéicas, independentemente da CCS, sofrem redução no leite UAT durante o armazenamento, com exceção da α_{s2} -caseína.
- f-** A CCS não influencia as características microbiológicas e físico-químicas estudadas no leite UAT durante 120 dias de armazenamento, causando somente ligeiro efeito sobre a cor do leite.
- g-** A CCS exerce efeito de diminuição da fração β -caseína do leite UAT durante 120 dias de armazenamento.
- h-** O aumento da CCS no leite cru utilizado para a fabricação de leite UAT pode prejudicar a qualidade do produto, devido, sobretudo às alterações decorrentes da proteólise no final da vida de prateleira.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ABLV] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em: 15 out. 2006.

ALLISON, J.R.D. Antibiotics residues in milk. **British Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 141, p. 9-16, 1995.

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

ANDERSON, M. Source and significance of lysosomal enzymes in bovine milk fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 60, p. 1217-22, 1977.

_____. Factors affecting the distribution of lipoprotein lipase activity between serum and casein micelles in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, p. 51-9, 1982.

_____.; ANDREWS, A.T. Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, p. 223-35, 1977.

ANDREATTA, E. **Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

ANDREWS, A.T. Breakdown of caseins by proteinases in bovine milks with high somatic cell counts arising from mastitis or infusion with bacterial endotoxin. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 50, p. 57-6, 1983.

[AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, VA: AOAC, 1995.

AULDIST, M.J. et al. Changes in the compositional of milk from normal and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 35, p. 427-36, 1995.

_____. et al. Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 63, p. 377-86, 1996.

_____.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 53, p. 28-36, 1998.

AZZARA, C.D.; DIMIK, P.S. Leukocytes: a source of Lipolytic enzyme activity in normal and subclinically mastitic bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 67, suppl. 1, p. 241, 1984.

_____.; _____. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 3171-5, 1985a.

_____.; _____. Lipolytic enzyme activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 1804-12, 1985b.

- BACHMAN, K.C. et al. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 925-31, 1988.
- BALLOU, L.U. et al. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, p. 2186-95, 1995.
- BARBANO, D.M.; MA, Y.; SANTOS, M.V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, E.Suppl., E 15-E19, 2006.
- _____.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk SCC and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 369-88, 1991.
- BARRY, J.G.; DONNELLY, W.J. Casein compositional studies. II. the effect of secretory disturbance on casein composition in freshly drawn and aged bovine milks. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 437-46, 1981.
- BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 6, p. 435-57, 1996.
- BIBALKE, D. The effect of high somatic cell count on the quality of dairy products. **Dairy Food Sanitation**, v. 4, p. 67-8, 1984.
- BLAKE, M.R. et al. Sensory and microbial quality of milk processed for extended shelf life by direct steam injection. **Journal of Food Protection**, Des Moines, 58: 1007-13, 1995.
- BOBE, G. et al. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, 46: 458-63, 1998.
- BRAMLEY, A.J. **Current concepts on bovine mastitis**. 4. ed. Arlington, VA: National Mastitis Council USA, 1996.
- BROWN, R.J. Milk coagulation and protein denaturation. In: WONG, N.P. et al. **Fundamentals of dairy chemistry**. 3. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p. 583-607
- BUENO, V.F.F. et al. Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no estado de Goiás. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Anais do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Editora UPF, p. 301-6, 2004.
- BURBRINK, C.N.; HAYES, KD. Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 580-5, 2006.
- CAFFIN, J.P.; POUTREL, B.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine α -lactoglobulin concentrations in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 1087-94, 1985.
- CARTIER, P.; CHILLIARD, Y. Spontaneous lipolysis in bovine milk: combined effects of nine characteristics in native milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 73, p. 1178-86, 1990.
- CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos, estratégias e validação**, São Carlos: Editora da UFSCar. 2001. 77 p.

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

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

CHRISTEN, G.L.; NDOMBA, A.A.J. Evaluation of procedures to predict the keeping quality of ultra-high temperature processed skim milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, suppl. 1, p. 303, 1991.

COONEY, S. et al. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, p. 301-7, 2000.

CUNHA, M.F. Revisão: Leite UHT e o fenômeno da gelatinização. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, p. 341-52, 2001.

DAGLEISH, D. G. Sedimentation of casein micelles during the storage of UHT milk products. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, p. 371-9, 1992.

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

_____.; _____. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Wädenswil, v. 36, p. 173-82, 2003.

DE RHAM, O.; ANDREWS, A.T. Qualitative and quantitative determination of proteolysis in mastitic milks. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 49, p. 587-96, 1982.

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

DOWNEY, W.K. Review of the progress of dairy science: flavour impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, p. 237-52, 1980.

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

EL-DEEB, S.A.; HASSAN, H.N. Changes in the cow's milk composition as affected with mastitis infection. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, Alexandria, v. 32, p. 163-74, 1987.

ERWIN, R.E.; RANDOLPH, H.E. Influence of mastitis on properties of milk XI. fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 58, p. 9-12, 1975.

FERRER, E. et al. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cow's milk. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, 881: 599-606, 2000.

FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A.F.; TAVOLARO, P. The relationship between composition and somatic cell counts of milk from individual Holstein cows. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 163-6, 2004.

_____.; _____.; LIMA, C.G. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 17, p. 111-5, 2007.

FITZ-GERALD, C.H.; DEETH, H.C.; KITCHEN, B.J. The relationship between the levels of free fatty acids, lipoprotein lipase, carboxylesterase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cell count and other mastitis indices in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 253-65, 1981.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Contagem de células somáticas. In: **Qualidade do leite e controle de mastite**, São Paulo: Lemos, 2000. p. 44-58.

FOX, P.F. et al. **Fundamentals of cheese science**. New York: Aspen, 2000. 587 p.

GACULA, J.R.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. Orlando, Academic Press, 1984.

GASSEM, M.; FRANK, J.F. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 1503-11, 1991.

GILLIS, W.T. et al. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 2875-9, 1985.

GRANDISON, A.S.; FORD, G.D. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield, composition and quality of *cheddar* cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 645-55, 1986.

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

HAENLEIN, G.F.W.; SCHULTZ, L.H.; ZIKAKIS, J.P. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 56, p. 1017-24, 1973.

HILL, A.R. Quality of ultra-high-temperature processed milk. **Food Technology**, Chicago, v. 42, p. 92-7, 1988.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, Columbus, v. 54, p. 67A-76A, 1982.

HUTH, P.J.; DIRIENZO, D.B.; MILLER, G.D. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 1207-21, 2006.

[IAL] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 1. 3. ed. São Paulo: IAL, 1985.

[IDF] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis: definition and guidelines for diagnosis. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, v. 211, p. 7, 1987.

JIMÉNEZ-PÉREZ, S.; CORZO, N.; MORALES, F.J.; DELGADO, T.; OLANO, A. Effect of storage temperature on lactulose and 5-hydroxymethylfurfural formation in UHT milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, p. 304-306, 1992.

JURCZAK, M.E.; SCIUBISZ, A. Studies on the lipolytic changes in milk from cows with mastitis. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 36, p. 217-9, 1981.

KELLY, A.L.; FOLEY, J. Proteolysis and storage stability of UHT milk as influenced by milk plasmin activity, plasmin/ β -lactoglobulin complexation, plasminogen activation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 7, p. 411-20, 1997.

KENNEDY, A.; KELLY, A.L. The influence of somatic cell count on the heat stability of bovine milk plasmin activity. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 7, p. 717-21, 1997.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 167-88, 1981.

KLEI, L. et al. Effects of milk SCC on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 1205-13, 1998.

KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; LADISCH, M.R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 1151-6, 1991.

KORYCKA-DAHL, M. et al. Plasmin activity in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 66, p. 704-11, 1983.

LARSEN, L.B. et al. Variation in activity and heterogeneity of bovine milk proteases with stage of lactation and somatic cell count. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 1-8, 2006.

LE ROUX, Y.; COLIN, O.; LAURENT, F. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, p. 1289-97, 1995.

LEE, S.J.; SHERBON, J.W. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 69, p. 555-67, 2002.

LEITNER, G. et al. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 648-54, 2006.

LEWIS, M.J. Heat treatment of milk. In: Robinson, R.K. **Modern Dairy Technology**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1994, p. 1-60.

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

MA, Y. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 264-74, 2000.

_____.; BARBANO, D.M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 1616-31, 2003.

MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G.; RIBEIRO, A. CCS: leite com mais qualidade e melhor rendimento industrial. **Indústria de laticínios**, São Paulo, v. 2, p. 65-8, 1998.

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**, Savoy, v. 69, p. 2994-3001, 1986.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília: MA, 1980.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/index.htm>. Acesso em: 24 out. 2003.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UAT (UHT). Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4349>. Acesso em: 05 nov. 2006.

MARQUES, L.T.; BALBINOTTI, M.; FISCHER, V. Variations in the milk chemical composition according to somatic cell count. In: **II Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**, 2., Ribeirão Preto: IFC & Milkpoint, 2002.

MAZAL, G. et al. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, p. 630-6, 2007.

MILLER, R.H. et al. Relationships of somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Oxfordshire, v. 33, p. 209-23, 1983.

MITCHELL, G.E.; FEDRICK, I.A.; ROGERS, S.A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 2. cheddar cheese from farm bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 41, p. 12-4, 1986.

MOGENSEN, G.; POULSEN, P.R. Quality of UHT milk, stored at refrigerated and ambient temperatures as compared to HTST pasteurized milk. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 35, p. 552-6, 1980.

MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Anais do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Editora UPF, p. 11-37, 2004.

MORR, C. V.; RICHTER, R.L. Chemistry of processing. In: Wong, N.P.; Jenness, R.; Keeney, M.; Marth, E.H. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. p. 739-66, 3. ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 1988.

MORALES, F.-J.; ROMERO, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hidroxymethylfurfural and available lysine content. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 31, p. 411-8, 1996.

_____.; _____.; _____. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 35, p. 193-200, 2000.

MOTTAR, J. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 36, p. 87-91, 1981.

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

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 39, p. 7-16, 1984.

MURPHY, S.C. et al. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, p. 620-6, 1989.

NEEDS, E.C.; ANDERSON, M. Lipid composition of milks from cows with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 51, p. 239-49, 1984.

NEEDS, E.C.; ANDERSON, M.; MORANT, S.V. Interaction of factors which influence the extent of lipolysis during milking and storage of raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 203-10, 1986.

NEVILLE, M.C.; WATTERS, C.D. Secretion of calcium into milk: review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 66, p. 371-80, 1983.

NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v. 15, p. 11-8, 1994.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Composition and sensory evaluation of whole yogurt produced from milk with different somatic cell count. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 57, p. 192-6, 2002.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Fatores relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, p. 10-6, 1999.

PACKARD, V.S.; GINN, R.E. Interrelationships between select quality test and levels of milk components. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 11, p. 577-81, 1991.

PHILPOT, W.N. Milk quality and mastitis control: past, present and future. In: **Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**, 2., Ribeirão Preto: IFC & Milkpoint, 2002.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Origem e significado das células somáticas. In: **Vencendo a luta contra a mastite**. Naperville: Milkbuzz, 2002. p. 28-37.

POLITIS, I.; BARBANO, D.M.; GOREWIT, R.C. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, p. 1402-10, 1992.

_____.; NG-KWAI-HANG, K.F. Effects of somatic cell counts and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 1711-9, 1988a.

_____.; _____. Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 1740-6, 1988b.

_____.; _____.; GIROUX, R.N. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, p. 1713-8, 1989.

POUTREL, B.; CAFFIN, J.P.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 66, p. 535-41, 1983.

PRADO, B.M. et al. Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 593-9, 2006.

RAMPILLI, M.; ANDREINI, R. Evaluation of colour components in sterilized milk. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 4, p. 285-90, 1992.

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E. Influence of mastitis on properties of milk. X. fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 57, p. 865-9, 1974.

_____.; ERWIN, R.E.; RICHTER, R.L. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 57, p. 15-8, 1974.

RECIO, I. et al. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 44, p. 3955-9, 1996.

RENEAU, J.K.; PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 11, p. 4-11, 1991.

RICHARDSON, B.C. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Palmerston North, v. 18, p. 233-45, 1983.

ROGERS, S.A.; MITCHELL, G.E. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 6. cheddar cheese and skim milk yoghurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 49, p. 70-4, 1994.

_____. et al. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 3. individual proteins. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 44, p. 49-52, 1989.

_____.; MITCHELL, G.E.; BARTLEY, J.P. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 4. non-protein constituents. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 44, p. 49-52, 1989.

ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, p. 27-32, 2006.

SAEMAN, A.I.; VERDI, R.J.; GALTON, D.M. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 505-12, 1988.

SALIH, A.M.A.; ANDERSON, M. Observations on the influence of high cell count on lipolysis in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, p. 453-62, 1979.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 2491-503, 2003.

_____. et al. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, p. 1601-7, 2003.

SAS Institute. SAS® user's guide: statistics. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2004.

SCHULTZ, L.H. Somatic cell in milk: physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, p. 125-31, 1977.

SENYK, G.F.; BARBANO, D.M.; SHIPE, W.F. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 2189-94, 1985.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. 1^a ed., São Paulo:Varela, 1996. 517 p.

SHAAR, J.; FUNKE, H. Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitrypsin and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 515-28, 1986.

SHARMA, K.K.; RANDOLPH, H.E. Influence of mastitis on properties of milk: VIII. distribution of soluble and micellar casein. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 57, p. 19-23, 1974.

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

_____.; SENYK, G.F.; FOUNTAIN, K.B. Modified copper soap solvent extraction for measuring free fatty acids in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 63, p. 193-8, 1980.

SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 3763-74, 1991.

SINGH, L.N.; GANGULI, N.C. Alterations in the micellar, soluble and other casein fractions in the abnormal bovine milk secretions. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 28, p. 151-8, 1975.

SOMERS, J.M.; O'BRIEN, B.; MEANEY, W.J.; KELLY, A.L. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 70, p. 45-50, 2003.

SPREER, E. **Lactologia industrial**. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 1991. 617 p.

SRIVIVASAN, M.; LUCEY, J.A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1070-8, 2002.

SUNDHEIN, G.;BENGTSSON-OLIVECRONA, G. Isolated milk fat globule as substrate for lipoprotein lipase: study of factors relevant to spontaneous lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 70, p. 499-505, 1987.

TALLAMY, P.T.; RANDOLPH, H.E. Influence of mastitis on properties of milk. IV. hydrolytic rancidity. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 52, p. 1569-72, 1969.

_____.; _____. Influence of mastitis on properties of milk. V. total and free concentrations of major minerals in skim milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 53, p. 1386-8, 1970.

TOPÇU, A.; NUMANOĞLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 633-8, 2006.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, p. 2402-11, 1998.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 62, p. 403-14, 1998.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leches y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, España. 1994. 476 p.

VERDI, R.J. et al. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 70, p. 230-42, 1987.

_____.; BARBANO, D.M. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 534-8, 1988.

_____.; _____. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leucocytes. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 2077-81, 1991a.

_____.; _____. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, p. 772-82, 1991b.

VIDAL-MARTINS, A.M.C. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 698-704, 2005.

WALSTRA, P. et al. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, España. 2001. 730 p.

WEAVER, J.C.; KROGER, M. Protein, casein and noncasein protein percentages in milk with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 60, p. 878-81, 1976.

ZACHOS, T. et al. Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 59, p. 461-7, 1992.

ZADOW, J.G. UHT milk – Standards and quality assurance. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 35, p. 140-4, 1980.

8 ANEXOS

Os Anexos a seguir contêm os resultados médios das análises executadas nos 15 lotes de leite cru, pasteurizado e UAT. Para o leite UAT, estão apresentados os valores médios obtidos para os dias 8, 30, 60, 90 e 120 de análise.

Anexo 1. Resultados físico-químicos e microbiológicos do leite cru, de acordo com a CCS¹.

CCS (x1.000/mL)	Densidade (g/cm ³)	Índice crioscópico (°H)	Alizarol	Antibiótico	Mesófilos (log UFC/mL)	Psicrotróficos (log UFC/mL)	Coliformes a 30°C (log NMP/mL)	Coliformes a 45°C (log NMP/mL)
197	1,0325	-0,551	negativo	negativo	8,87	4,00	2,04	-0,52
261	1,0322	-0,545	negativo	negativo	9,48	8,84	2,04	2,04
282	1,0313	-0,536	negativo	negativo	8,48	5,48	2,04	2,04
284	1,0327	-0,545	negativo	negativo	8,37	5,30	2,04	0,97
316	1,0319	-0,559	negativo	negativo	9,48	5,76	2,04	0,56
379	1,0311	-0,555	negativo	negativo	7,48	7,08	2,04	2,04
418	1,0313	-0,532	negativo	negativo	7,70	7,18	2,04	2,04
485	1,0324	-0,558	negativo	negativo	8,41	7,78	2,04	2,04
500	1,0318	-0,531	negativo	negativo	8,68	9,60	2,04	2,04
560	1,0318	-0,551	negativo	negativo	8,60	4,60	2,04	2,04
600	1,0318	-0,531	negativo	negativo	8,26	6,85	2,04	0,97
630	1,0311	-0,535	negativo	negativo	9,74	8,64	2,04	2,04
700	1,0326	-0,555	negativo	negativo	8,30	4,30	2,04	2,04
700	1,0314	-0,534	negativo	negativo	9,48	4,30	2,04	2,04
800	1,0320	-0,525	negativo	negativo	9,90	5,11	2,04	2,04

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata;² Resultados expressos em ácido palmítico.

Anexo 2. Resultados físico-químicos do leite cru, de acordo com a CCS¹.

CCS (x1.000/mL)	Acidez titulável (°D)	pH	Gordura (%)	Sólidos totais (%)	Sólidos não gordurosos (%)	AGL ² (meq/kg)	HMF (µg/100mL)
197	14	6,83	3,67	12,70	9,09	0,46	7,41
261	15	6,79	3,57	12,55	9,02	0,47	6,15
282	15	6,73	3,15	11,86	8,76	0,35	0,91
284	16	6,92	3,81	12,50	9,22	0,49	12,48
316	16	6,80	3,57	12,40	9,02	0,40	16,99
379	14	6,97	3,24	11,90	8,68	0,41	11,23
418	15	6,73	3,20	11,93	8,73	0,30	2,47
485	15	6,90	3,34	12,30	9,01	0,42	4,13
500	16	6,77	3,66	12,57	8,77	0,66	6,76
560	16	6,83	3,65	12,50	8,91	0,55	5,95
600	15	6,82	3,80	12,41	8,91	0,39	3,07
630	16	6,72	3,50	12,24	8,74	0,73	2,79
700	15	6,84	3,43	12,60	9,09	0,42	6,24
700	15	6,80	3,50	11,86	8,76	0,30	6,59
800	17	6,76	3,10	11,98	6,88	0,42	4,40

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata;² Resultados expressos em ácido palmítico.

Anexo 3. Resultados de análises de proteínas do leite cru, de acordo com a CCS¹.

CCS (x1.000/mL)	PT ² (%)	PV ³ (%)	C ⁴ (%)	IP ⁵	α s ₁ -caseína (mg/mL)	α s ₂ -caseína (mg/mL)	β -caseína (mg/mL)	κ -caseína (mg/mL)
197	2,99	2,78	2,24	0,81	9,84	1,46	10,61	2,63
261	3,62	3,42	2,83	0,83	11,00	1,43	10,91	3,52
282	3,16	2,95	2,51	0,85	10,56	1,05	12,79	3,25
284	3,57	3,37	2,78	0,83	8,51	1,09	9,46	3,03
316	3,66	3,33	2,82	0,85	9,97	1,28	10,33	3,37
379	2,89	2,70	2,01	0,75	11,50	1,48	10,46	3,87
418	3,54	3,35	2,86	0,85	11,10	1,32	10,47	3,80
485	3,28	3,11	2,61	0,84	10,62	1,52	10,87	4,07
500	3,82	3,56	3,03	0,85	8,45	1,22	9,57	3,14
560	2,77	2,63	1,99	0,76	9,65	1,41	10,26	3,37
600	3,26	3,09	2,51	0,81	9,92	1,44	11,51	2,95
630	3,69	3,40	3,03	0,89	7,78	0,70	8,27	3,10
700	2,89	2,73	2,15	0,79	9,51	1,14	8,75	3,48
700	2,91	2,70	2,32	0,86	8,69	0,88	9,01	3,25
800	3,06	2,88	2,41	0,84	10,07	0,74	9,59	3,40

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata nos dias 8, 30, 60, 90 e 120;

² Proteína total; ³ Proteína verdadeira; ⁴ Caseína; ⁵ Índice de proteólise.

Anexo 4. Resultados físico-químicos e microbiológicos do leite pasteurizado, de acordo com a CCS no leite cru¹.

CCS (x1.000/mL)	AGL ² (meq/kg)	HMF (µg/100mL)	Mesófilos (log UFC/mL)	Psicrotróficos (log UFC/mL)	Coliformes a 30°C (log NMP/mL)	Coliformes a 45°C (log NMP/mL)
197	0,70	12,87	5,23	3,00	2,04	0,72
261	0,42	19,30	5,95	2,65	2,04	ausência
282	0,35	5,54	4,00	3,00	2,04	-0,52
284	0,48	1,39	6,16	4,40	-0,44	ausência
316	0,39	29,12	5,95	2,65	2,04	-0,44
379	0,34	4,68	5,26	4,30	-0,52	ausência
418	0,30	2,75	4,90	2,90	-0,44	ausência
485	0,37	7,60	4,00	4,40	-0,44	ausência
500	0,55	3,80	6,18	3,40	2,04	ausência
560	0,48	2,91	5,96	3,30	-0,44	ausência
600	0,34	3,16	4,48	5,30	-0,44	ausência
630	0,74	23,42	4,78	3,51	2,04	0,15
700	0,53	6,97	4,00	3,00	2,04	-0,52
700	0,44	7,98	6,30	2,00	2,04	0,54
800	0,42	4,37	5,30	2,00	1,66	0,97

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata;² Resultados expressos em ácido palmítico.

Anexo 5. Resultados de análises de proteínas do leite pasteurizado, de acordo com a CCS no leite cru¹.

CCS (x1.000/mL)	PT ² (%)	PV ³ (%)	C ⁴ (%)	IP ⁵	α S ₁ -caseína (mg/mL)	α S ₂ -caseína (mg/mL)	β -caseína (mg/mL)	κ -caseína (mg/mL)
197	3,06	2,84	2,39	0,84	9,26	0,96	12,94	2,65
261	3,54	3,34	2,80	0,84	10,80	1,34	11,03	3,45
282	3,32	3,10	2,65	0,85	11,01	1,24	14,28	2,75
284	2,98	2,79	2,29	0,82	7,86	0,94	8,37	2,68
316	3,77	3,53	3,07	0,87	10,18	1,29	10,96	3,57
379	2,85	2,69	2,20	0,82	10,78	1,26	11,18	3,83
418	2,91	2,73	2,31	0,84	9,89	1,17	10,90	3,53
485	2,99	2,77	2,25	0,81	10,45	1,23	11,06	3,92
500	3,50	3,30	2,73	0,83	8,22	0,77	11,75	2,38
560	2,76	2,56	2,08	0,81	8,86	0,92	12,86	2,75
600	3,27	3,10	2,52	0,81	11,15	1,28	11,79	3,14
630	3,18	2,99	2,72	0,91	8,13	0,85	9,68	3,70
700	2,68	2,49	1,94	0,78	10,28	1,56	11,15	3,47
700	2,90	2,71	2,31	0,85	7,98	0,63	9,01	3,09
800	3,16	2,96	2,50	0,84	10,19	0,64	10,13	3,64

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata nos dias 8, 30, 60, 90 e 120;

² Proteína total; ³ Proteína verdadeira; ⁴ Caseína; ⁵ Índice de proteólise.

Anexo 6. Resultados físico-químicos do leite UAT, de acordo com a CCS no leite cru¹.

CCS (x1.000/mL)	Acidez titulável (°D)	pH	Gordura (%)	Sólidos totais (%)	Sólidos não gordurosos (%)	Viscosidade aparente (cP)	AGL ² (meq/kg)	HMF (µg/100mL)
197	19,4	6,67	3,2	11,29	8,05	1,55	0,46	21,54
261	17,6	6,67	3,3	11,06	7,80	1,43	0,71	27,79
282	19,8	6,63	3,1	10,61	7,55	1,41	0,49	17,31
284	16,8	6,75	2,4	12,08	9,66	1,52	0,58	19,59
316	17,4	6,64	2,9	11,70	8,76	1,53	0,68	28,18
379	19,2	6,79	3,2	11,80	8,62	1,44	0,49	20,18
418	19,0	6,76	3,0	11,42	8,46	4,39	0,38	12,34
485	18,6	6,77	3,2	11,70	8,46	1,49	0,57	13,60
500	18,6	6,63	3,1	11,67	8,53	1,51	0,70	28,24
560	18,4	6,68	3,3	11,56	8,24	1,42	0,42	14,09
600	18,6	6,74	3,1	11,11	8,05	1,53	0,43	11,73
630	20,2	6,64	3,3	10,64	7,34	1,43	0,76	19,12
700	17,4	6,70	3,1	11,48	8,42	1,53	0,60	11,55
700	19,0	6,73	3,1	10,98	7,90	1,44	0,58	27,25
800	19,2	6,69	3,5	11,80	8,28	1,48	0,45	16,13

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata nos dias 8, 30, 60, 90 e 120;

² Resultados expressos em ácido palmítico.

Anexo 7. Resultados físico-químicos do leite UAT, de acordo com a CCS no leite cru¹.

CCS (x1.000/mL)	L*	a*	b*
197	92,72	-1,65	11,95
261	92,52	-1,41	11,44
282	91,72	-1,51	11,92
284	92,56	-1,72	11,19
316	92,25	-1,44	11,45
379	92,21	-1,57	11,38
418	91,80	-1,56	11,97
485	92,42	-1,53	11,35
500	92,80	-1,70	10,83
560	92,66	-1,65	10,65
600	92,67	-1,32	11,31
630	92,35	-1,40	12,01
700	92,35	-1,45	11,61
700	92,63	-1,40	12,24
800	92,80	-1,53	12,42

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata nos dias 8, 30, 60, 90 e 120.

Anexo 8. Resultados de análises de proteínas do leite UAT, de acordo com a CCS no leite cru¹.

CCS (x1.000/mL)	PT ² (%)	PV ³ (%)	C ⁴ (%)	IP ⁵	α S ₁ -caseína (mg/mL)	α S ₂ -caseína (mg/mL)	β -caseína (mg/mL)	κ -caseína (mg/mL)
197	2,90	2,75	2,42	0,88	9,76	2,10	10,58	3,52
261	3,39	3,16	2,86	0,90	9,42	1,51	9,17	2,15
282	2,83	2,63	2,37	0,90	7,02	1,68	9,61	3,08
284	3,39	3,14	2,79	0,89	9,62	1,91	10,52	2,70
316	3,33	3,11	2,81	0,90	7,69	1,17	10,35	3,34
379	3,02	2,81	2,48	0,88	8,66	1,87	9,92	3,78
418	2,92	2,70	2,34	0,86	6,73	1,82	7,80	4,66
485	2,82	2,58	2,31	0,89	8,67	1,85	10,12	3,52
500	3,10	2,90	2,58	0,89	10,66	1,78	9,88	2,32
560	3,00	2,80	2,53	0,90	8,79	1,88	10,29	3,62
600	3,18	2,97	2,69	0,91	8,70	1,49	8,28	4,88
630	2,84	2,64	2,26	0,86	5,78	1,14	6,54	2,65
700	3,19	2,96	2,65	0,89	8,85	1,94	9,54	3,42
700	3,16	2,96	2,65	0,89	7,80	0,88	6,18	3,13
800	3,16	2,97	2,60	0,88	9,08	1,62	9,05	3,47

¹ Valores referem-se à média de amostras analisadas em duplicata nos dias 8, 30, 60, 90 e 120;

² Proteína total; ³ Proteína verdadeira; ⁴ Caseína; ⁵ Índice de proteólise.