



# **OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO LEITE E DERIVADOS**



**Ana Maria Centola Vidal**  
**Arlindo Saran Netto**

**ANA MARIA CENTOLA VIDAL (Org.)**  
**ARLINDO SARAN NETTO (Org.)**

**Obtenção e processamento do leite e  
derivados**

DOI: 10.11606/9788566404173

Pirassununga-SP  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo (FZEA-USP)  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

V648o Vidal, Ana Maria Centola  
Obtenção e processamento do leite e derivados. / Ana  
Maria Centola Vidal, Arlindo Saran Netto (Orgs). --  
Pirassununga : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de  
Alimentos da Universidade de São Paulo, 2018.  
220 p.  
  
ISBN 978-85-66404-17-3 (e-book)  
DOI: 10.11606/9788566404173  
  
1. Leite - Processamento. 2. Produção de leite.  
3. Laticínios. I. Saran Netto, Arlindo. II. Título.

Está autorizada a reprodução parcial ou total desta obra  
desde que citada a fonte. Proibido uso com fins comerciais.

## **Dedicatória**

Não poderíamos deixar de dedicar aos nossos familiares, que compreendem nossas ausências em função do comprometimento com a profissão que nos orgulha: ser professor.

## **OS ORGANIZADORES**

### **Ana Maria Centola Vidal**

Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de Marília. Possui Mestrado e Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV/Unesp – Jaboticabal, pesquisando qualidade microbiológica e físico-química de leite, associada à transmissão de patógenos. Atualmente é professora do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA/USP e tem como principal linha de pesquisa aspectos relacionados à obtenção higiênica e à qualidade do leite e derivados. Atua como docente nas disciplinas de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados e Mel; Inspeção e Tecnologia de Carne e Derivados; Higiene e Segurança dos Alimentos; e Rastreabilidade e Certificação.

### **Arlindo Saran Netto**

Graduado em Zootecnia pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP. Possui Mestrado na área de Ciências dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP e Doutorado em Qualidade e Produtividade Animal pela FZEA/USP. Realizou Pós-Doutorado em Qualidade do Leite e Saúde de Crianças. Atualmente é professor do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP e tem como principal linha de pesquisa os atributos relacionados aos produtos de origem animal e a saúde humana. Atua como docente nas disciplinas de Produção de Ruminantes, Bovinocultura de Leite e Industrialização de Produtos de Origem Animal.

## **OS AUTORES**

### **Carlos Eduardo Gamero Aguilar**

Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Unesp/Jaboticabal). Possui mestrado em Medicina Veterinária (área Medicina Veterinária Preventiva; Higiene e Inspeção Sanitária de Alimentos). Doutor na mesma área e instituição. Possui experiência na área de Medicina Veterinária Preventiva; Tecnologia, Higiene e Inspeção Sanitária de leite e derivados; Microbiologia de Alimentos e Segurança dos Alimentos.

### **Gabriel Augusto Marques Rossi**

Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Unesp/Jaboticabal). Doutor em Medicina Veterinária (área Medicina Veterinária Preventiva; Higiene e Inspeção Sanitária de Alimentos). Possui experiência nas áreas de Medicina Veterinária Preventiva; Tecnologia, Higiene e Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal; Microbiologia de Alimentos; e Segurança dos Alimentos.

### **Higor Oliveira Silva**

Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (Famev-UFU). Doutor em Medicina Veterinária (área Medicina Veterinária Preventiva; Higiene e Inspeção Sanitária de Alimentos). Possui experiência nas áreas de Medicina Veterinária Preventiva; Tecnologia, Higiene e Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal; Microbiologia de Alimentos; e Segurança dos Alimentos.

## SUMÁRIO

| <b>Assunto</b>  | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Capítulo 1 – Obtenção higiênica de leite</b>                         |               |
| 1. Introdução.....  | 1             |
| 2. Manejo de ordenha.....   | 2             |
| 3. Armazenamento e transporte do leite.....                             | 13            |
| 4. Higiene de instalações, equipamentos e utensílios da ordenha.....    | 16            |
| 5. Referências.....   | 19            |
| <b>Capítulo 2 – Composição do leite</b>                                 |               |
| 1. Leite.....   | 22            |
| 2. Proteína.....  | 27            |
| 3. Gordura.....   | 36            |
| 4. Lactose.....   | 44            |
| 5. Minerais.....  | 51            |
| 6. Vitaminas.....   | 58            |
| 7. Enzimas.....   | 61            |
| 8. Referências.....   | 63            |
| <b>Capítulo 3 – Qualidade Microbiológica do leite</b>                   |               |
| 1. Introdução.....  | 66            |
| 2. Contaminação microbiana do leite.....                                | 68            |
| 3. Microbiologia do leite.....  | 71            |
| 4. Referências.....   | 86            |
| <b>Capítulo 4 – Análises físico-químicas e microbiológicas de leite</b> |               |
| 1. Análises físico-químicas.....  | 89            |
| 2. Pesquisas de fraudes.....  | 108           |
| 3. Análises microbiológicas.....  | 120           |
| 4. Contagem de Células Somáticas (CCS).....                             | 127           |
| 5. Presença de antibióticos.....  | 131           |
| 6. Referências.....   | 134           |

## **Capítulo 5 – Tecnologias aplicadas a leite e derivados**

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introdução.....                     | 136 |
| 2. Aplicação do calor.....             | 146 |
| 3. Coagulação.....                     | 166 |
| 4. Enzimas aplicadas à tecnologia..... | 169 |
| 5. Conservação pelo frio.....          | 171 |
| 6. Referências.....                    | 172 |

## **Capítulo 6 – Fluxograma de produção de leite e derivados**

|  |     |
|--|-----|
| 1. Introdução.....                                     | 174 |
| 2. Leite pasteurizado.....                             | 175 |
| 3. Leite tratado por ultra alta temperatura (UAT)..... | 179 |
| 4. Leite em pó.....                                    | 182 |
| 5. Leites fermentados.....                             | 185 |
| 6. Queijos.....  | 190 |
| 7. Bebida láctea.....                                  | 207 |
| 8. Manteiga.....                                       | 210 |
| 9. Creme de leite.....                                 | 213 |
| 10. Doce de leite.....                                 | 215 |
| 11. Leite condensado.....                              | 217 |
| 12. Referências.....                                   | 218 |

# CAPÍTULO 1

## OBTENÇÃO HIGIÊNICA DE LEITE

Ana Maria Centola Vidal, Arlindo Saran Netto

### 1. INTRODUÇÃO

A obtenção de leite de qualidade implica a necessidade de um manejo de ordenha que reduza a contaminação física, química e microbiológica. Tais medidas de manejo envolvem todos os aspectos da obtenção do leite de forma rápida, eficiente e sem riscos para a saúde da vaca e para a qualidade do leite.

Um adequado manejo de ordenha envolve, obrigatoriamente, três fatores que devem participar do processo de forma harmônica: o ordenhador, o ambiente em que os animais permanecem antes, durante e após a ordenha e a rotina de ordenha. Geralmente, é nesse momento que o leite é contaminado. Portanto, o ordenhador deve tomar muito cuidado, pois a maior parte da contaminação é de origem externa.

A qualidade do leite cru é influenciada por múltiplas condições, entre as quais destacam-se os fatores zootécnicos, associados ao manejo, à alimentação e ao potencial genético dos rebanhos, além dos fatores já mencionados. Os primeiros são responsáveis pelas características de composição do leite e, também, pela produtividade. A obtenção e o armazenamento do leite, por outro lado, relacionam-se diretamente com a qualidade microbiológica do produto, determinando, inclusive, sua vida de prateleira.

Para obtenção do leite de qualidade começa-se ordenhando apenas vacas sadias. Alguns procedimentos fundamentais precisam ser adotados, como higienização no processo de obtenção, resfriamento e controle sanitário do rebanho, principalmente da mastite. A qualidade do leite é muito importante para as indústrias e os produtores, tendo impactos diretos tanto na produção de derivados lácteos quanto na segurança alimentar. Por isso, é necessário

conhecer alguns conceitos sobre a qualidade do leite referentes às condições higiênico-sanitárias e à sua composição.

Com base nesses aspectos, serão apresentados os principais fatores que afetam a qualidade do leite, relacionados ao manejo, à obtenção e à conservação do produto em propriedades rurais.

## **2. MANEJO DE ORDENHA**

Um bom manejo de ordenha reduz o risco de mastite e de contaminação do leite. Entre as etapas da rotina de ordenha, destacam-se: condução dos animais para a ordenha, sala de espera e de ordenha adequadas, boa preparação dos tetos antes da ordenha (*pré-dipping*), procedimento de ordenha correto, realização do *pós-dipping*, bem como higiene do ambiente e dos utensílios e equipamentos de ordenha.

A figura-chave do processo é o ordenhador. Sem a sua efetiva colaboração, os investimentos em equipamentos ou em animais de alta produção se tornam nulos; também têm sua eficiência diminuída os investimentos em infraestrutura, pastagens, silos ou quaisquer melhorias introduzidas na propriedade.

É recomendado que, ao realizar a ordenha, o ordenhador use roupas claras e limpas, de preferência um uniforme específico (gorro, macacão ou jaleco, calça e botas) usado apenas para essa finalidade. Os cabelos devem estar presos e cobertos. Após a ordenha, é necessário lavar a roupa e a guardar em local limpo para ser usada na próxima ordenha. As roupas usadas na lida com animais ficam contaminadas e não são próprias para a ordenha. Todo o pessoal que trabalha na ordenha deve apresentar hábitos higiênicos. O operador do equipamento de ordenha deve, no seu manuseio, conservar as mãos sempre limpas. No momento da ordenha, o ordenhador deve se concentrar apenas nessa função, não realizando outros trabalhos ao mesmo tempo, para evitar o risco de contaminação.

A condução dos animais para a ordenha deve ser realizada de forma calma e sem agressões. Na maioria das vezes, os animais destinados à produção leiteira são dóceis e, quando submetidos a condições de manejo rotineiras, não apresentam qualquer resistência à condução para a sala de

ordenha, dispensando até mesmo o uso de peias. As preferências e a individualidade de cada animal devem ser respeitadas na hora de escolher o local para ser ordenhada. Não se deve carregar qualquer instrumento de agressão (pau, corda, ferrão, bastão elétrico, cano ou chicote) quando se estiver conduzindo as vacas.

O estresse dos animais momentos antes da ordenha leva à liberação de adrenalina, cuja ação é antagônica à da ocitocina. A adrenalina, como é sabido, é o hormônio responsável pela ejeção do leite, atuando na contração de células que envolvem os alvéolos da glândula mamária. Esse hormônio impede a liberação da ocitocina ou evita a chegada dela às células que envolvem os alvéolos. A falta ou a redução da liberação de ocitocina faz que quantidade menor de leite seja obtida, diminuindo a produção do animal e, conseqüentemente, o lucro da propriedade.

Os cuidados dispensados não devem se restringir apenas ao local da ordenha propriamente dito, mas também aos locais em que os animais permanecem antes e depois dela. A sala de espera deve ser sombreada, com disponibilidade de 1,7 m<sup>2</sup> a 2,0 m<sup>2</sup> por vaca, com 3% de desnível em relação à entrada da sala de ordenha. Esta última deve ser limpa, arejada e confortável, bem dimensionada e funcional, tanto para o animal como para o ordenhador.

O local da ordenha deve ser bem arejado, com acomodações adequadas ao serviço, que permita higienização completa e respeite o limite físico de lotação de 3,0 m<sup>2</sup> por vaca. As salas de ordenha devem dispor de piso cimentado e água em abundância.

Na entrada ou na saída da sala de ordenha, deve-se evitar o excesso de curvas, dando-se preferência aos trajetos retilíneos. Os locais de produção de leite não devem conter substâncias nocivas que possam impregnar ou afetar a qualidade do produto. Além disso, o leite deve ser protegido de excrementos, secreções ou resíduos de origem animal. Outro fator que influencia diretamente a qualidade do produto final é a água de abastecimento. Portanto, é de extrema importância a análise periódica e a manutenção da qualidade da água, para que esta não constitua risco de contaminação para o leite. Deve haver controle de pragas, com o emprego de agentes químicos, biológicos ou físicos, desde que sejam aplicados sob a supervisão direta de pessoal treinado.

Uma prática importante é organizar uma linha de ordenha onde as vacas sadias são ordenhadas primeiro e, por último, as vacas com mastite. O leite dos animais com mastite clínica e em tratamento deve ser descartado, sempre respeitando o período de carência dos medicamentos. Após saber quais animais estão infectados e quais as bactérias envolvidas, organiza-se a linha de ordenha, estabelecendo a ordem de entrada das vacas na sala de ordenha, a partir dos resultados de bacteriologia:

a) primeiro lote – os animais com CMT negativo e CMT traço;

b) segundo lote – os animais com CMT baixo (um ou dois tetos com uma cruz no CMT) e com infecções por agentes ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e outros coliformes); as vacas recém-paridas que ainda não têm bacteriologia podem ficar neste segundo lote.

Após o parto, durante 5 a 8 dias, a vaca secreta um líquido de cor amarelada, de sabor ácido e densidade alta, que coagula ao ser fervido e na prova do alizarol. É o colostro, que deve ser utilizado apenas pela cria, por conter substâncias essenciais à saúde e favorecer a eliminação das primeiras fezes. Esse tipo de leite não deve ser misturado ao leite normal, por ser de fácil deterioração.

c) terceiro lote – os animais com CMT alto e positivo para infecções por agentes infecciosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*). No caso de mastite clínica, o animal deve ser retirado do recinto e ordenhado posteriormente, depois dos animais sadios. Dependendo da gravidade da mastite, o animal deve ser ordenhado fora do local de ordenha para não contaminar o ambiente.

Se a mastite não for curada com nenhum medicamento, o animal deve ser descartado. As mastites podem ser tratadas por três dias com produtos que incluam antibióticos e anti-inflamatórios. Mas apenas no período seco é que se realizam tratamentos mais efetivos e baratos.

A ordenha deve ser tranquila e em ambiente calmo, de preferência em horários fixos e em períodos com temperatura mais amena. Recomenda-se que ela seja realizada de acordo com a rotina descrita a seguir.

É necessário que o ordenhador faça a higienização das mãos e que as vacas sejam ordenhadas com os tetos limpos e secos; para isso, inicialmente

realiza-se o *pré-dipping*, que é recomendado a fim de reduzir patógenos ambientais. Na maioria das vezes, o procedimento é realizado com produtos à base de cloro, que devem permanecer em contato com os tetos por no mínimo 30 segundos. Existem várias recomendações, com diferentes concentrações de produtos; quando se utiliza o hipoclorito de sódio, a concentração pode ser de 2% a 10%. Posteriormente, os tetos devem ser secos com papel toalha descartável; no entanto, quando necessário (teto apresentar sujidades aderidas), eles devem ser lavados antes da desinfecção— a intensidade dos jatos de água não deve ser grande, utilizando-se mangueira de baixa pressão e alcançando apenas os tetos. Após a higienização dos tetos e antes de iniciar a retirada do leite, o ordenhador deve fazer nova higienização de suas mãos.

É possível monitorar o grau de limpeza dos tetos com base em uma classificação: escore igual a 1 quando não existe material orgânico aderido a nenhum dos tetos; 2, quando é possível fazer a limpeza sem o uso de água; e 3, quando há necessidade de água para retirar a sujidade. O rebanho deve manter um escore médio inferior a 1,5. Quando ultrapassado, esse valor indica a necessidade de troca ou reposição de cama. O grau de limpeza pode não só ser observado nos tetos como também em outras áreas do corpo do animal, como pode ser observado na figura 1.

**Figura 1.** Escore de grau de limpeza dos animais.

| ÁREA DE OBSERVAÇÃO  | ESCORE  |   |  |   |   |
|---|---|---|--|---|---|
|   | 1   | 2   | 3  | 4   | 5   |
|  <p>Base da cauda: Raio imaginário da inserção da cauda até a base da vulva.</p> |  |  |  |  |  |
|  <p>Área da base da vulva até o jarrete.</p>                                     |  |  |  |  |  |
|  <p>Parte ventral do abdome: região anterior ao úbere</p>                        |  |  |  |  |  |
|  <p>Úbere: Toda a região do úbere e tetos</p>                                    |  |  |  |  |  |
|  <p>Toda a região abaixo do jarrete</p>  |  |  |  |  |  |

Fonte: Reneau et al. 2005.

Para facilitar a limpeza, os animais deveriam ter o úbere tosquiado ou flambado; há trabalhos mostram redução de até 75% na carga bacteriana do leite em animais com úberes tosquiados.

Após a realização do *pré-dipping*, os primeiros três a cinco jatos de leite devem ser descartados em caneca de fundo preto ou telado para o diagnóstico de mastite clínica. O diagnóstico positivo é confirmado pela presença de grumos sobre o fundo escuro da caneca. O teste da caneca deve ser realizado em todas as ordenhas e em todos os animais. Além de servir de diagnóstico da forma clínica da mastite, estimula a descida do leite e retira os primeiros jatos, que apresentam maior concentração de microrganismos.

O outro teste utilizado antes do início da ordenha é o CMT, para o diagnóstico da mastite subclínica, pois faz a estimativa do número de células somáticas do leite. O CMT não é o único teste disponível para diagnosticar a mastite subclínica, mas é o mais utilizado, além de ser reconhecido como simples e eficaz. Recomenda-se realizá-lo, no mínimo, uma vez ao mês. Para isso, são necessários o reagente de CMT e uma raquete. O reagente é composto de um detergente e de um indicador de pH e atua sobre os leucócitos e outras células presentes no leite, causando o rompimento da parede celular. Esse rompimento faz que seja liberado material genético das células, promovendo a formação de viscosidade da mistura do leite com o reagente. Quanto maior for a quantidade de células somáticas no leite, maior será a viscosidade da mistura.

Pode ser citado como inconveniente do CMT o fato de ser um teste subjetivo. Daí decorre a necessidade de, durante a ordenha, o teste ser realizado pela mesma pessoa, preferencialmente. Além disso, reações falso-positivas podem acontecer em vacas que se encontram nos primeiros dias após o parto e naquelas prestes a entrar no período seco. O estágio de lactação deverá sempre ser considerado quando o leite de todos os quartos mamários das vacas apresentarem reação positiva ao mesmo tempo ao entrarem em contato com o reagente.

Para a realização do CMT deve-se segurar a raquete sob o úbere do animal e ordenhar os quartos mamários em cada receptáculo da raquete até a marca que representa aproximadamente 2 mL. Cada receptáculo deve receber o leite de um quarto mamário, tomando-se o cuidado para que o leite de um

quarto mamário não se misture ao leite de outro quarto. Imediatamente após esse procedimento, adiciona-se ao leite ordenhado o reagente do CMT até atingir a segunda marca contida na raquete, também equivalente a 2 mL. A mistura de reagente e leite deve ser homogeneizada com movimentos circulares durante aproximadamente 30 segundos e, posteriormente, verifica-se o grau de reação, observando-se a formação de viscosidade.

Existem diferentes maneiras de se classificar as reações do teste, todas bastante semelhantes. A tabela 1 apresenta uma delas.

**Tabela 1.** Escore de CMT e reações observadas no teste.

| <b>Escore do CMT</b>      | <b>Reações observadas na prova</b>   |
|---------------------------|--|
| Negativo                  | Não há formação de gel na mistura de leite com a solução.  |
| Traço (falso-positivo)    | Há instantânea formação de gel na solução, desaparecendo rapidamente. Não há alteração da consistência da solução.                     |
| Fracamente positivo (+)   | Há rápida formação de gel no centro da solução, que desaparece em seguida, há uma leve alteração na consistência da solução.           |
| Positivo (++)             | Há formação de gel bem visível na solução, tendendo a ficar mais fraca se continuar agitando. Há alteração na consistência da solução. |
| Fortemente positivo (+++) | Há forte formação de gel na solução, não desaparecendo mesmo após algum tempo. Há forte alteração na consistência da mistura.          |

Após o *pré-dipping*, teste da caneca de fundo preto e CMT, quando for o caso, é realizada a ordenha das vacas, que pode ser manual ou mecânica.

## 2.1 Ordenha manual

Este é o sistema mais antigo de ordenha e ainda muito frequente, principalmente em pequenos produtores de leite. O investimento em equipamentos é baixo, mas exige maior esforço do ordenhador. A estrutura para realizar a ordenha manual geralmente é bastante simples, podendo ser feita em um piquete, curral ou em um galpão. Há situações em que as vacas ficam soltas, sem nenhum tipo de contenção e, outras, em que as vacas ficam presas com correntes ou com canzís. É comum “pear as vacas” (amarrar as pernas traseiras) no momento da ordenha manual.

Para iniciar a ordenha com bezerro ao pé, primeiro deve-se levar o bezerro até a mãe e depois permitir que ele mame todos os tetos, estimulando a descida do leite. A melhor forma de fazer isso é condicionar o bezerro a responder ao chamado pelo nome. Ele aprenderá rapidamente e ficará mais fácil conduzi-lo até o local da ordenha. Com a porteira aberta, o bezerro deve ser chamado até que saia do bezerreiro; não se deve entrar nesse local nem puxar o bezerro pelas orelhas ou bater nele. O momento da ordenha deve ser prazeroso para o bezerro e para a vaca.

Após estimular a descida do leite, o bezerro deve ser afastado do úbere, mas mantendo contato com o corpo da mãe. É importante a vaca sentir o bezerro próximo, assim ela ficará mais tranquila e será mais fácil ordenhá-la. O *pré-dipping* dos tetos deve ser realizado antes de iniciar a ordenha, fazendo-se o teste da caneca, procedendo-se com a ordenha sem interrompê-la. Deve-se ordenhar os tetos de modo cruzado: uma mão pega o teto anterior direito e a outra, o teto posterior esquerdo. Em seguida, uma mão pega o teto anterior esquerdo e a outra, o posterior direito. Os dedos deverão envolver todo o teto e a pressão deve ser feita de cima para baixo, com movimentos uniformes e sem puxar.

Logo após a ordenha, deve-se soltar o bezerro e permitir que ele mame diretamente na vaca; se possível, a vaca deverá ser alimentada após a ordenha, para que permaneça em pé por pelo menos uma hora, tempo necessário para que ocorra o fechamento do esfíncter do teto. Os animais devem ser mantidos juntos por pelo menos 20 minutos, até que o bezerro pare de mamar naturalmente; isso será importante para a ingestão de leite pelo bezerro e o esvaziamento completo do úbere. Os bezerros devem ser apartados e, de preferência, a desinfecção dos tetos (*pós-dipping*) deve ser feita da maneira que for mais fácil em função da estrutura da propriedade.

O leite que foi retirado nos baldes deverá ser acondicionado em latões, com coador na boca, para depois serem refrigerados, como será descrito posteriormente.

## **2.2 Ordenha mecânica**

A ordenha mecânica possibilita a retirada do leite mais rapidamente do que a ordenha manual e, quando bem realizada, tem menor risco de

contaminação. Geralmente, é feita em um local específico, a sala de ordenha, que pode variar tanto no tipo (tabela 2) quanto na dimensão.

**Tabela 2.** Tipos de ordenha mecânica.

| <b>Tipos de ordenha</b>        | <b>Descrição</b>  |
|--------------------------------|---|
| <b>Balde ao pé</b>             | É o tipo mais simples e mais barato de ordenha mecânica, podendo ser empregada tanto em galpões simples (mais comum) quanto em salas com fosso. Seu uso é mais frequente em rebanhos pequenos. Quando realizada em locais sem o fosso, o posicionamento do ordenhador durante o procedimento de ordenha é dificultado, podendo resultar em problemas de saúde.              |
| <b>Espinha de peixe</b>        | Os animais ficam posicionados diagonalmente em relação ao fosso de ordenha, o que facilita a visualização do úbere e dos tetos. Além disso, as vacas ocupam menor espaço na lateral do fosso. A sala espinha de peixe pode ser unilateral, com as vacas posicionadas em apenas um dos lados do fosso; ou bilateral, quando elas ficam posicionadas nos dois lados do fosso. |
| <b>Tandem (fila indiana)</b>   | As vacas ficam dispostas uma à frente da outra, em posição paralela ao fosso. É o único modelo que possibilita a ordenha mecanizada com bezerro ao pé. Nesse tipo de sala de ordenha, as vacas ocupam espaço maior na lateral do fosso, o que torna difícil adotá-lo em rebanhos grandes, pois exige uma sala muito comprida, que dificulta o trabalho do ordenhador.       |
| <b>Lado a lado ou paralela</b> | As vacas ficam em posição perpendicular ao fosso, uma ao lado da outra. Com esse posicionamento há redução no espaço ocupado por vaca durante a ordenha. Mas, por outro lado, as vacas ficam com o posterior para o fosso, o que dificulta a visualização completa do úbere e dos tetos.  |

Há ainda outros tipos de ordenhas mecânicas, como as ordenhas em **carrossel** e **robotizada**, que são sistemas mais sofisticados e, portanto, mais caros, o que faz que sejam raras em no Brasil.

Fonte: Simão da Rosa et al., 2009.

Assim, como já descrito anteriormente, as vacas serão conduzidas até a sala de ordenha, onde será realizado o *pré-dipping* e o teste da caneca de fundo escuro, estando as vacas aptas a serem ordenhadas.

Na ordenha mecânica, a colocação das teteiras é considerada o momento crucial. Caso ela não seja bem-feita, pode comprometer todas as etapas posteriores, inclusive a qualidade do leite. O tempo decorrido entre o momento em que o animal entra na sala de ordenha e a colocação das teteiras deve ser o menor possível. O recomendável é que o tempo entre a estimulação dos tetos e a colocação das unidades de ordenha seja de aproximadamente um minuto, pelo fato de a meia-vida (duração na corrente sanguínea) da

ocitocina ser curta (no máximo oito minutos). A concentração sanguínea da ocitocina atinge o pico cerca de um a três minutos após o início da estimulação dos animais.

Para tanto, o ideal seria que a pressão de vácuo no coletor fosse de 40 kPa a 42 kPa no pico de fluxo de leite e que a teteira fosse retirada quando o fluxo baixasse para 0,5 litro a 1,0 litro por minuto.

O registro de vácuo deve ser aberto no momento da colocação das teteiras no animal para impedir a entrada de ar no sistema de ordenha e a consequente flutuação do nível de vácuo. Essa flutuação é prejudicial em função do “gradiente de pressão reversa” que pode ocorrer. A formação desse gradiente faz com que o leite, ao chegar ao copo coletor, siga o sentido contrário ao da sua saída da glândula mamária.

A ordenha deve ser constantemente observada, na tentativa de evitar a queda ou o deslizamento das teteiras, o que também poderá ocasionar o “gradiente de pressão reversa”. Durante a ordenha, o nível de vácuo do sistema deve ser aferido para verificar se esse nível se encontra dentro dos limites normais. Esses limites dependem do tipo de equipamento de ordenha, ou seja, se é de linha alta, se possui garrafão central, se é de linha baixa ou se é de balde ao pé.

No copo coletor da unidade de ordenha, poderá haver redução do nível de vácuo nas seguintes situações:

- vacas com grande fluxo de leite;
- linhas de leite excessivamente grandes;
- quando o orifício para a entrada de ar no copo coletor estiver fechado, fazendo com que o leite preencha todo o copo e as mangueiras. Quanto maior for a mangueira de leite e quanto menor for o seu diâmetro, maior será a possibilidade de redução do nível de vácuo. Assim, a instalação de uma ordenhadeira mecânica deve ser realizada por técnicos especializados, para evitar problemas de dimensionamento. O nível de vácuo excessivamente elevado também pode causar consequências negativas aos animais. Inicialmente, há o risco de ocorrência de lesões, atingindo a camada de queratina que compõe a face interna dos tetos. Isso pode, conseqüentemente, levar a injúrias da barreira primária de proteção da glândula mamária. Além disso, os tetos podem tornar-se congestionados, em

razão do acúmulo de sangue nas extremidades, e então haver redução na velocidade de ordenha.

As possíveis causas de danos ao esfíncter dos tetos, provocadas pelo equipamento de ordenha, são:

- ordenha prolongada, especialmente com fluxo de leite menor do que um litro por minuto, causado tanto pela fisiologia do animal como também pela máquina de ordenha com nível de vácuo reduzido ou por rotina de ordenha inadequada. Funcionamento contínuo das teteiras após o término da saída do leite;
- teteiras gastas ou inadequadas para os animais;
- nível de vácuo excessivamente alto;
- defeitos na pulsação do equipamento de ordenha.

Quando o vácuo estiver muito intenso e as teteiras forem de boca larga, o conjunto de ordenha pode subir em direção ao corpo do animal e causar o estrangulamento da cisterna do teto. A consequência é o aumento da quantidade de leite residual (sobreordenha) no úbere e a necessidade de se forçar o copo coletor para baixo. Essa é uma ação que deve ser evitada. Assim como a colocação das teteiras deve ser feita com todo o cuidado, a retirada delas também deverá ser cercada de atenção. O registro de vácuo deve ser desligado imediatamente antes da retirada das teteiras.

Ainda nos casos em que a ordenha é mecânica, necessita-se trocar periodicamente as borrachas que entram em contato com o leite, como as mangueiras curtas, as mangueiras longas e, principalmente, as teteiras, que, quando gastas e envelhecidas, podem fazer com que os tetos não sejam massageados corretamente, causando congestão e edema com consequente aparecimento de lesões. O uso constante de produtos químicos durante a lavagem do sistema provoca pequenas rachaduras nas borrachas, que aumentam progressivamente. Nessas rachaduras, alojam-se microrganismos, cuja retirada é difícil, o que, por sua vez, acarreta perda de qualidade do leite.

A verificação de uma boa ordenha pode ser feita por meio da quantificação do leite ainda existente na glândula, após a retirada manual, sem o uso de ocitocina, não devendo haver mais do que 500 mL em novilhas e 750 mL em vacas. Imediatamente após a ordenha, deve ser realizada a desinfecção dos tetos, o pós-*dipping*, cobrindo-se toda a superfície dos tetos

com a solução desinfetante, cuja função é reduzir as novas infecções causadas por microrganismos ambientais.

O hábito de higienizar os tetos após a ordenha (*pós-dipping*) é antigo e a sua disseminação resultou na redução significativa dos casos de mastite subclínica nos últimos anos. A atividade bactericida não deve ser afetada pela presença de matéria orgânica representada por leite, fezes ou urina e não deve ser irritante ou tóxica para a pele do teto. Os princípios ativos mais usados são o iodo, a clorexidina, o ácido sulfônico, o cloro, a lauricidina, o ácido láctico, os fenóis e o ácido cloroso. Esses produtos são encontrados em diferentes concentrações, isolados ou combinados com outros antissépticos.

Muitas vezes são utilizados emolientes para reduzir a irritação e para melhorar o condicionamento da pele do teto, como a glicerina, a lanolina, o propilenoglicol, o sorbitol e o colágeno, além de óleos vegetais e minerais. No Brasil, o iodo ocupa a segunda posição no mercado de antissépticos para tetos, ficando atrás apenas do cloro. O nível de iodo nos antissépticos pode variar entre 500 ppm (0,05%) e 10.000 ppm (1%). Existem mais de 500 formulações de antissépticos à base de iodo disponíveis em todo o mundo, cuja composição e propriedades emolientes variam amplamente.

Concluída a higiene do teto após a ordenha, o animal é solto. Porém, os esfíncteres dos tetos ainda não estão completamente fechados e as vacas podem se deitar após a sua liberação, tornando inútil a realização do *pós-dipping*. Microrganismos do ambiente (solo, fezes ou cama) podem tornar o antisséptico ineficiente e invadir o úbere. Por isso, recomenda-se o oferecimento de alimento aos animais após a ordenha, por um período mínimo de uma hora, até o fechamento do esfíncter.

Na Tabela 3, encontram-se exemplos de princípios ativos e de sua respectiva concentração para uso na antissepsia no pré e *pós-dipping*.

**Tabela 3.** Concentrações recomendadas para antissepsia pré e *pós-dipping*.

| <b>Aplicação</b>   | <b>% cloro</b> | <b>% iodo</b> | <b>% clorexidine</b> |
|--------------------|----------------|---------------|----------------------|
| <b>Pré-dipping</b> | 0,8 – 1,2      | 0,1           | –                    |
| <b>Pós-dipping</b> | 4,0            | 0,5 – 1,0     | 0,5 – 1,0            |

Fonte: Ribeiro, 1999.

### 3. ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DO LEITE

Atualmente, o leite é armazenado nas propriedades rurais e transportado sob refrigeração, podendo, ainda, ser mantidos e transportados em temperatura ambiente, em latões de 50 litros, desde que a indústria aceite trabalhar com esse tipo de matéria-prima, que ele atenda aos padrões estabelecido para leite cru refrigerado e que chegue na indústria no máximo até duas horas após a conclusão da ordenha. É importante salientar que a baixa temperatura não melhora a qualidade do leite e que um produto de má qualidade, com alta quantidade de bactérias, continuará a estragar, mesmo em baixa temperatura.

A refrigeração apresenta inúmeras vantagens na cadeia produtiva do leite. Para o produtor, representa a diminuição do custo do transporte (carreto), uma vez que pode entregar o leite de dois em dois dias; é menor o esforço físico despendido na atividade; os horários de trabalho são mais cômodos; e a quantidade de produtos de limpeza e de escovas apropriadas e a mão de obra utilizada nos cuidados higiênicos são mais simples do que quando se utilizam latões.

Para a indústria, a matéria-prima refrigerada implica a redução de custos operacionais em torno de 25% no processamento e a flexibilidade do horário de recepção do leite, além de melhor qualidade e maior vida de prateleira dos produtos. Todos os segmentos se beneficiam com a eliminação do leite ácido, que representa grandes prejuízos na cadeia.

O resfriamento na propriedade rural, imediatamente após a ordenha, é uma das medidas de maior impacto sobre a qualidade do leite, uma vez que o resfriamento a 4 °C, inibe a multiplicação de microrganismos presentes no leite. O resultado da multiplicação desses microrganismos, principalmente mesófilos, é a alteração das características de qualidade do leite, como fermentação da lactose. Outro ponto importante a ser ressaltado é com relação ao controle da temperatura de refrigeração, pois, se ela não for respeitada, ocorrerá multiplicação de microrganismos psicrótróficos, que são capazes de degradar a proteína e a gordura, chamada de refrigeração marginal.

A forma mais eficiente de resfriamento rápido do leite é o uso de tanques de expansão direta (individual ou comunitário). Esses equipamentos

apresentam grande superfície de contato com o leite e possuem um agitador, o que favorece o rápido abaixamento da temperatura. Assim, a utilização de resfriadores de imersão, nos quais os latões são imersos na água gelada, não oferece a mesma eficiência, pois as trocas de calor são muito mais lentas. Como não há agitação durante o resfriamento, o leite não é resfriado uniformemente; esse resfriamento marginal não inibe a multiplicação de algumas bactérias na parte mais interna do latão.

A aquisição de um refrigerador para a propriedade não representa alternativa para a classe de pequenos produtores (menos de 100 litros/dia). Para alcançar os padrões estabelecidos na Instrução Normativa n. 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2011), os produtores podem se unir em associações e, assim, adquirir tanques de resfriamento comunitários; caso contrário, o mercado pode levá-los a desistir da atividade leiteira.

A Instrução Normativa n. 62 especifica como deve ser o local que abriga os tanques de refrigeração (expansão direta ou imersão). Esse local deve ser coberto, arejado, pavimentado e de fácil acesso ao veículo coletor; bem iluminado natural ou artificialmente; ter ponto de água corrente de qualidade para a lavagem dos latões e demais utensílios, que devem estar sobre uma bancada de apoio às operações de coleta de amostras.

O tempo gasto para a refrigeração do leite deve ser de, no máximo, três horas após o término da ordenha. Nesse período, estão incluídos o deslocamento da propriedade até o tanque, no caso de tanques comunitários, e o tempo que o tanque gasta para baixar a temperatura do leite. A Instrução Normativa n. 62 estabelece que o leite deve atingir a temperatura de 4 °C quando estocado em tanques refrigeradores por expansão direta e a 7 °C, quando mantido em tanques refrigeradores por imersão em água gelada.

O tanque de expansão não deve ser desligado durante a noite, pois essa prática, além de não trazer significativa economia de energia elétrica, resulta em aumento da multiplicação microbiana no leite e, conseqüentemente, menor qualidade do produto. Uma estratégia para aumentar a eficiência do resfriamento do leite é o uso do pré-resfriamento. Os pré-resfriadores são boas alternativas para rebanhos com grandes produções de leite, pois reduzem

significativamente o consumo de energia do tanque de expansão, e o leite já chega ao tanque em uma temperatura reduzida.

O produtor que utiliza tanques resfriadores comunitários não pode ordenhar os animais duas vezes e levar a produção acumulada ao tanque apenas uma vez por dia. O leite recém-ordenhado deve ser imediatamente transportado até o resfriador. Dependendo da quantidade de microrganismos inicial, ela pode quadruplicar no período de 48 horas. Após esse período, o aumento de microrganismos pode ser dez vezes maior. Independentemente de ser em tanque comunitário, a coleta do produto pelo caminhão deve ser feita em, no máximo, 48 horas após o início da ordenha, sendo recomendado o tempo ideal de coleta de até 24 horas. O tempo máximo de conservação do leite na propriedade é de 48 horas.

Além do monitoramento da temperatura do leite, é importante que seja feita a limpeza e sanitização rigorosa das superfícies do tanque e das conexões logo após a coleta do produto, de forma a assegurar a produção de leite de alta qualidade.

A granelização tem como objetivo maior a redução dos custos de transporte e a obtenção de um leite com qualidade. O transporte a granel consiste em coletar o leite já resfriado na propriedade, em tanque isotérmico, próprio para o recolhimento do produto. Esse tanque é dividido internamente e acoplado em um veículo, provido de bomba de sucção a fim de transferir o leite do tanque de resfriamento para o de transporte. Os produtores já se conscientizaram da necessidade da granelização e muitos conseguiram financiamento para a compra dos equipamentos de refrigeração.

Esses aspectos são relevantes em relação à qualidade do leite, porém em nenhum momento pode-se descuidar daqueles relacionados à higiene em todos os segmentos da cadeia produtiva do leite. As indústrias e cooperativas devem se preocupar em orientar os produtores ou os responsáveis pela administração, principalmente no que diz respeito ao controle da saúde dos animais, ao preparo das salas de ordenha e dos pontos de coleta, à limpeza do material, ao treinamento dos caminhoneiros e ordenhadores e ao armazenamento do leite para a realização desse tipo de coleta.

A empresa coletora do leite fica responsável pela identificação do usuário desse sistema, pelo recebimento da matéria-prima de cada produtor,

pela coleta e identificação das amostras, pelo controle de temperatura, pela prova do alizarol, pela higiene do equipamento e do ambiente. O leite que apresentar qualquer anormalidade não será transferido para o caminhão-tanque, devendo permanecer na propriedade.

Nas propriedades cujos resultados dos testes apresentaram algum tipo de problema, o leite deverá ser submetido a nova análise no dia seguinte à coleta. O produtor será comunicado, porém o leite só será transferido para o caminhão-tanque quando se enquadrar nos padrões exigidos. Até que esteja apto a ser transportado no caminhão-tanque, a decisão quanto ao destino e ao transporte separado desse leite é da indústria ou do produtor, conforme estabelecido previamente.

O caminhoneiro deve receber treinamento básico sobre higiene, coleta de amostra e análise do leite. O próprio motorista do caminhão-tanque pode ser treinado para essa função, cujas responsabilidades principais são as seguintes: apresentar-se sempre com roupas limpas e fazer uso de avental ou jaleco, boné ou touca durante a coleta; realizar a prova do alizarol após a homogeneização do leite, com agitador próprio; processar a coleta de amostras e a transferência do leite para o caminhão-tanque na sala de armazenagem do leite; anotar a temperatura e o volume do leite em formulários próprios.

As amostras que serão submetidas às análises laboratoriais devem ser guardadas e transportadas em caixas térmicas adequadas com gelo; também deve ser realizada a higienização do engate da mangueira e da saída do tanque de expansão ou da ponteira de sucção do leite dos latões antes da coleta e após cada uso. Deve-se ter sempre na propriedade rural reagentes, soluções, detergentes, sanitizantes e escovas próprias para a realização dessas práticas.

#### **4. HIGIENE DE INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS UTILIZADOS NA ORDENHA**

Compreender os conceitos básicos de limpeza e sanitização é fundamental para a obtenção de leite com alta qualidade. O objetivo básico da limpeza dos equipamentos utilizados no processo produtivo é remover da superfície os resíduos orgânicos e minerais provenientes do leite. Essa

remoção deverá ser promovida logo após a utilização do equipamento, pois a demora na limpeza acarreta maior multiplicação microbiana e, conseqüentemente, maior será a dificuldade de remoção. A limpeza deve ser compreendida como a remoção de sujidade, um processo complexo que depende de muitas variáveis.

Na área de permanência das vacas, deve-se evitar o acúmulo de lama, barro e esterco, o que inclui boa ventilação e drenagem. Nos sistemas de *free stall*, é importante o correto dimensionamento de baias e corredores.

O ambiente da ordenha, manual ou mecânica, deverá estar sempre limpo. Os cuidados começam com a escolha do local da instalação; lugares baixos e mal drenados devem ser evitados. A posição da sala de ordenha deve permitir a incidência solar pela manhã e à tarde, para facilitar a secagem e a sanitização do ambiente. O ideal é que o local seja pavimentado e coberto, para que a ordenha seja realizada livre de poeira e de barro e ao abrigo das chuvas.

O leite que permanece em utensílios e em equipamentos oferece excelente oportunidade para o desenvolvimento de microrganismos. Para evitar o problema, todas as partes que entram em contato com o leite devem ser muito bem higienizadas imediatamente após o término da ordenha, iniciando o processo com um enxágue bem feito, para facilitar a limpeza química. Por fim, o uso de sanitizantes completa o processo da boa higienização.

Os principais fatores que afetam a eficiência da limpeza de equipamentos e utensílios de ordenha são: tempo, temperatura, volume, concentração do detergente, velocidade e turbulência das soluções de limpeza e drenagem adequada. A limpeza deve começar imediatamente após a ordenha, enquanto as tubulações estão mornas e não ocorreu formação de depósito de resíduos. Deve-se desconectar a tubulação de leite do tanque resfriador e drenar todo o resíduo da unidade final e da bomba de leite. Para sistemas de ordenha com limpeza por circulação, recomenda-se a limpeza manual externa das unidades finais e mangueiras, antes de acoplar as unidades de ordenha na linha de limpeza, fechando o circuito (CIP – *Clean in place*) por onde as soluções de limpeza serão circuladas, a partir do tanque de limpeza, utilizando-se os seguintes ciclos de limpeza:

a) Enxágue inicial: o enxágue com água morna (pelo menos 35 °C). Não recircular esse enxágue e descartar a água após a passagem pelo equipamento.

b) Limpeza com detergente alcalino clorado: a temperatura inicial deve ser de 70 °C e, no final do ciclo, não menor de 40 °C.

- Duração de aproximadamente 10 minutos.
- Alcalinidade recomendada: para a solução é de 250 ppm a 500 ppm (expressos como Na<sub>2</sub>O) para ordenhadeiras e 400 ppm para tanques resfriadores.
- O conteúdo de compostos clorados varia de 75 ppm a 200 ppm de NaClO (hipoclorito de sódio) para equipamentos de ordenha e de 100 ppm a 200 ppm de NaClO para tanques.

c) Limpeza com detergente ácido: a água deve ser fria e a duração é de cerca de 5 minutos.

- Frequência de utilização: depende da qualidade da água (dureza) usada para limpeza, sendo normalmente recomendada pelo menos duas vezes por semana.
- pH menor ou igual a 3,5.

d) Desinfecção ou sanitização: a solução deve apresentar de 100 ppm a 200 ppm de cloro disponível. O produto mais usado é o hipoclorito de sódio (NaClO) e o tempo de ação deve ser de no mínimo 5 minutos. Após essa etapa, não deve ser feito enxágue e deve-se aguardar 30 minutos para iniciar a ordenha.

**Tabela 4.** Ordem da limpeza relacionada à remoção dos componentes do leite.

| <b>Ordem de limpeza</b> | <b>Componentes do leite</b> | <b>Solubilidade</b>                           |
|-------------------------|-----------------------------|---|
| <b>Etapa 1</b>          | Lactose                     | Água morna (35 °C a 45 °C)                    |
| <b>Etapa 2</b>          | Gordura                     | Água a 70 °C e detergente alcalino clorado    |
| <b>Etapa 3</b>          | Proteína                    | Cloro presente no detergente alcalino clorado |
| <b>Etapa 4</b>          | Minerais                    | Detergentes ácidos                            |

Para a higienização do tanque de expansão, devem ser realizados os mesmos procedimentos aplicados ao equipamento de ordenha e na mesma sequência, com o cuidado de que o material utilizado para esfregar o interior do

tanque não provoque ranhuras, nas quais poderá ocorrer depósito de microrganismos cuja remoção será trabalhosa.

Para a limpeza manual do tanque, recomenda-se as seguintes etapas:

- a) Enxágue: após o esvaziamento do tanque, deve-se enxaguar a superfícies com água morna (35 °C).
- b) Limpeza com detergente: deve-se preparar cerca de 5 a 10 litros de solução de detergente alcalino clorado a 50 °C, de acordo com recomendação do fabricante, e esfregar todas as superfícies com escova apropriada, especialmente a pá do agitador e o registro da saída do leite. Recomenda-se a desmontagem da torneira de saída para uma completa limpeza dos vários componentes.
- c) Enxágue e sanitização: após a limpeza com detergente alcalino, pode-se utilizar uma solução de detergente ácido para reduzir a formação de pedra do leite. Antes da próxima utilização do tanque, é importante aplicar uma solução desinfetante a base de cloro para reduzir a contaminação, tomando-se o cuidado para drenar completamente todo o conteúdo do desinfetante.

Existem diversos fatores que facilitam ou dificultam a higienização das linhas de ordenha, incluindo a falta de capacitação de pessoal e de planejamento operacional adequado. Suprimento irregular de produtos de higienização, excesso de improvisação nas instalações de ordenha e falta de tratamento da água são outros problemas evidenciados.

Portanto, a higiene dos sistemas de ordenha é de grande relevância para garantir a qualidade do leite que será utilizado para consumo na forma de leite pasteurizado ou derivados lácteos.

## 5. REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. Leite e derivados, caracterização físico-química, qualidade e legislação. 151 f. il. – Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância – Processamento e Controle de Qualidade de Carne, Leite e Ovos. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2005.

ALVARES, B. L. Limpeza de equipamentos de ordenha e tanques. *Balde Branco*, 489 A, 27 jan. 2006. Disponível em: <[www.cienciadoleite.com.br](http://www.cienciadoleite.com.br)>. Acesso em: 10 out. 2016.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n. 251, p. 6-11, 30 dez. 2011. Seção1.
- BRITO, J. R. F. et al. Segurança e qualidade do leite. In: SANTOS, C. A. dos et al. (Ed.). *Embrapa Gado de Leite: 30 anos de pesquisa e conquistas para o Brasil*. Juiz de Fora: Embrapa, 2006. p. 155-172.
- CANI, P. C.; FRANGILO, R. F. *Como produzir leite de qualidade*. Vitória: ACPLES/Seag, 2008. 36 p.
- CARDOSO, I. dos S.; BRENER, S; COSTA, U. S. *Ordenha mecânica*. Brasília: SENAR, 2001. (Senar, 12).
- CARVALHO, L. de A. et al. Sistema de produção de leite (Cerrado). *Embrapa Gado de Leite*, Sistema de Produção, 2. Embrapa, 2002. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/index.html>>. Acesso em: 8 ago. 2016.
- DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 224 p.
- DÜRR, J. W. *Como produzir leite de alta qualidade*. Brasília: Senar, 2005.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. *Higiene Alimentar*, 9(36): 12-16, 1995.
- JUNQUEIRA, F. J. A. L.; FILHO, M. T. C. (Org.). Tecnologias para melhoria da produção de leite da Zona da Mata Mineira. *Embrapa Gado de Leite*, 2006, p. 55-62.
- MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; MCBEAN, L. D. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, FL.: CRC Press, 1999.
- OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. G. B. *Leite: obtenção e qualidade do produto fluido e derivados*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. cap.3, p. 27-43: Controle de qualidade do leite.
- REINEMANN, D. J. System design and performance testing for cleaning milking systems. In: *Design a Modern Milking Center*. NRAES-73, 1995.
- RENEAU, J. K. et al. 2005. Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227:1297–1301.
- RIBEIRO, A. R. Desinfecção e desinfetante no pré e pós-*dipping*. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. Anais... Botucatu: [s. ed.], 1999. p. 63-69.
- RODRIGUES, E. et al. Qualidade do leite e derivados – Processos, processamento tecnológico e índices – Manual técnico, 37. Niterói: Programa Rio Rural, 2013. 55 f.
- ROSA, M. S.; COSTA, M. P. da; SANT'ANNA, A. C.; MADUREIRA, A. P. *Boas práticas de manejo de ordenha*. Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.

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

SILVA M. A. P. et al.. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, 68(3):381-7,2009.

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

TORRES, R. A.; VEIGA, V. M. O.; SOUZA, G. N. Dicas de manejo de ordenha para obtenção de um leite de qualidade. In: TORRES, R. A.; VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. (Ed.). *Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil: qualidade e segurança alimentar*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001.

## **CAPÍTULO 2**

### **COMPOSIÇÃO DO LEITE**

Arlindo Saran Netto, Ana Maria Centola Vidal

#### **1. LEITE**

De acordo com a Instrução Normativa (IN) 62/2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. Também é definido como emulsão de coloração branca, opaco, duas vezes mais viscoso que a água, de sabor ligeiramente adocicado e de odor pouco acentuado, sendo uma secreção nutritiva produzida pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos.

Se considerarmos a histologia, o leite é produzido na glândula mamária, que é uma evolução por hipertrofia das glândulas sudoríparas apócrinas associadas ao pelo. A glândula mamária ativa é composta de lóbulos, cada um dos quais possui numerosos alvéolos e estes, por sua vez, são revestidos por células epiteliais cúbicas altas ou baixas, dependendo do ciclo de atividade, que são as encarregadas de produzir o leite. Entre estas e a lâmina basal do alvéolo, encontram-se algumas células mioepiteliais estriadas. O epitélio dos dutos entre os alvéolos é um bom exemplo de epitélio biestratificado cúbico.

Atualmente, o leite que mais se utiliza na produção de laticínios é o de vaca em razão das propriedades físico-químicas que possui, das quantidades que se obtém, agradável sabor, fácil digestão, assim como a grande quantidade de derivados obtidos. Contudo, não é o único que se consome, sendo também consumido o leite de cabra, de jumenta, de égua, de camela, entre outros. O consumo de determinados tipos de leite depende da região e do tipo de animais de produção.

A composição do leite varia de acordo com a espécie, raça, alimentação, individualidade, fase da lactação, entre outros fatores. Geralmente é composto

de 87% de água e de 13% de sólidos, denominados Extrato Seco Total (EST) e representam a parte nutritiva do leite, como apresentado na tabela 1, inclusive com diferenças entre algumas espécies.

**Tabela 1.** Composição química do leite em algumas raças e espécies.

| Espécie/raça | Gordura (%) | Proteína (%) | Relação Proteína/Gordura | Lactose (%) | Cinzas (%) | Sólidos totais (%) |
|--------------|-------------|--------------|--------------------------|-------------|------------|--------------------|
| Holandês     | 3,5         | 3,1          | 0,9                      | 4,9         | 0,7        | 12,2               |
| Jersey       | 5,5         | 3,9          | 0,7                      | 4,9         | 0,7        | 15                 |
| Vaca Zebu    | 4,9         | 3,9          | 0,8                      | 5,1         | 0,8        | 14,7               |
| Cabra        | 3,5         | 3,1          | 0,9                      | 4,6         | 0,8        | 12                 |
| Ovelha       | 5,3         | 5,5          | 1,0                      | 4,6         | 0,9        | 16,3               |
| Búfala       | 10,4        | 5,9          | 0,6                      | 4,3         | 0,8        | 21,5               |
| Égua         | 1,6         | 2,7          | 1,7                      | 6,1         | 0,5        | 11                 |
| Rata         | 14,8        | 11,3         | 0,8                      | 2,9         | 1,5        | 31,7               |
| Humano       | 4,5         | 1,1          | 0,2                      | 6,8         | 0,2        | 12,6               |

Fonte: Adaptado de Jensen, 1995. *Handbook of milk composition*.

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. O conhecimento dessa estabilidade é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia levantar suspeitas de adição fraudulenta de água, após a ordenha. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, facilmente detectáveis em laboratório.

## 1.1 Variabilidade dos componentes do leite

### Variação por espécie animal

A quantidade de gordura pode variar desde 1% até mais de 50%. Os mamíferos aquáticos têm tipicamente altas quantidades de gordura; por exemplo, a foca tem 53,2% de gordura no leite.

O percentual de lactose pode variar desde traços até menos de 7%. Algumas espécies têm pouca lactose no leite, como o urso e o canguru. Essas

espécies têm outras substâncias para manter o equilíbrio osmótico do leite com o plasma sanguíneo — geralmente outros açúcares, como trissacarídeos, por exemplo, no caso do canguru.

O conteúdo de proteína varia consideravelmente entre as espécies, porém em menor grau que a gordura. A proporção de proteína pode variar de 1% até 14%. Geralmente, o percentual de proteína do leite está positivamente correlacionado com o percentual de gordura.

### **Variação por raça**

A composição do leite varia também dentro da espécie. A vaca leiteira é um bom exemplo. As diferenças são especialmente em gordura e proteína, sendo esses componentes as bases de pagamento diferenciado para os produtores de leite. A gordura nas raças Jersey e Guernsey é maior que na Holandês, por exemplo. A lactose, por outro lado, se mantém praticamente constante entre as diferentes raças. A composição do leite também pode variar entre indivíduos da mesma raça. Por exemplo, a gordura do leite em vacas Jersey, que tem médias de 5% a 5,5%, podendo variar de menos de 4% a mais de 7%.

### **Variação durante a ordenha**

Mesmo durante a ordenha, a composição do leite pode variar. A gordura do leite de vaca é um bom exemplo, sendo menor no leite do início da ordenha, aumentando gradualmente em percentagem quando o leite é retirado da glândula. O leite que sai por último da glândula é o mais alto em teor de gordura. A contagem de células somáticas (CCS), que corresponde à concentração de leucócitos no leite, segue um padrão similar, sendo menor a contagem no leite inicial (exceto nas primeiras gotas de leite) e maior no leite que é retirado da glândula por último. Esses dados são importantes quando se coletam amostras de leite para testes, de forma que a melhor amostra está representada pela ordenha total da glândula mamária.

### **Variação no estágio da lactação**

A composição do leite varia consideravelmente durante a lactação, e as maiores mudanças ocorrem logo após o início da lactação. A primeira secreção

coletada da glândula mamária é chamada de colostro, que ocorre por um período entre cinco e sete dias após o parto e possui altas concentrações de proteínas, minerais e vitaminas. A composição da secreção gradualmente muda para aquela que denominamos leite, que também pode sofrer alterações em função da fase de lactação.

### **Variação pela nutrição**

A concentração de gordura do leite é o componente com maior facilidade de alteração em função da nutrição das vacas. A quantidade e a qualidade da fibra fornecida, a proporção de volumoso/concentrado, a taxa de degradabilidade e a composição de ácidos graxos da dieta são exemplos de fatores que têm efeito no teor de gordura e até mesmo na composição dos ácidos graxos constituintes da gordura do leite.

A formação do leite demanda um enorme trabalho metabólico. Em uma vaca leiteira é requerida a passagem de 450 litros de sangue pela glândula mamária para produzir 1 litro de leite. A quantidade de leite produzido varia muito em função da espécie e da raça, além da variação individual. Algumas espécies, como a vaca, a cabra e a ovelha, foram selecionadas geneticamente para produzir leite para o consumo humano em quantidades que estão além de suas necessidades biológicas.

## **1.2 Composição do leite**

O leite é, portanto, uma combinação de várias substâncias na água, podendo ser classificado como uma emulsão de glóbulos de gordura dispersos na fase aquosa ou uma suspensão de micelas de caseína, proteínas globulares e partículas lipoproteicas. Além disso, essa solução contém lactose, proteínas hidrossolúveis, minerais e outros compostos.

**Água:** É o componente que existe no leite em maior quantidade e onde se encontram dissolvidos, suspensos ou emulsionados os demais componentes. A água comum é igual à água do leite em todos os aspectos. Isso é praticamente comprovado quando se dissolve leite em pó na água e se obtém o leite líquido com algumas modificações pequenas nos sólidos.

**Gordura:** A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada constituída por um componente da gordura denominado fosfolípido. Essa camada forma uma membrana que impede a união de todos os glóbulos. Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de suspensão.

**Lactose:** Também conhecida como açúcar do leite, sendo praticamente o único que nele existe e se apresenta no leite de todos os mamíferos. A lactose é um hidrato de carbono, mais especificamente um dissacarídeo, que é composto de dois monossacarídeos: glicose e galactose.

**Proteínas:** Embora seja muito difícil alterar a concentração de proteína no leite, nos últimos anos intensificaram-se estudos relacionados aos fatores nutricionais que interferem no teor de proteína do leite. Entre estes destacam-se: aumento de proteína na dieta, aminoácidos limitantes, energia da dieta, suplementação com gordura. O teor de proteína do leite depende do perfil de aminoácidos absorvidos no intestino delgado do animal, e a proteína microbiana constitui a fonte de maior valor biológico disponível ao ruminante.

**Sais minerais:** no leite existem principalmente fosfatos, citratos, carbonato de sódio, cálcio, potássio e magnésio. A ação fisiológica dos diferentes sais do leite é importante, principalmente do fosfato de cálcio, na formação de ossos e dentes. Daí a necessidade de se alimentar as crianças com maior quantidade de leite.

**Vitaminas:** O leite constitui uma importante fonte de vitaminas necessárias ao organismo. São encontradas no leite principalmente as vitaminas lipossolúveis A, D e E e as vitaminas hidrossolúveis C e do complexo B.

Na tabela 2, estão apresentados os valores médios da composição do leite da mulher em relação ao leite de vaca.

**Tabela 2.** Composição média do leite de vaca e do leite da mulher.

| <b>Composição média</b>    | <b>Leite da mulher</b> | <b>Leite de vaca</b> |
|----------------------------|------------------------|----------------------|
| Água (g/L)                 | 870                    | 870                  |
| Proteínas (g/L)            | 16                     | 35                   |
| Caseínas (g/L)             | 5 a 7                  | 27                   |
| Lipídeos (g/L)             | 35                     | 35 a 40              |
| Ác. graxos essenciais(g/L) | 3,5                    | 1                    |
| Carboidratos (g/L)         | 76                     | 51                   |
| Lactose (g/L)              | 70                     | 49                   |
| Minerais (g/L)             | 2,1                    | 7,0                  |
| <b>Vitaminas</b>           |                        |                      |
| C mg/100 mL                | 4                      | 2,1                  |
| B1 µg/100 mL               | 16                     | 40                   |
| B2 µg/100 mL               | 40                     | 150                  |
| B12 µg/100 mL              | 0,18                   | 0,5                  |
| A UI/100 mL                | 250                    | 160                  |
| D UI/100 mL                | 0,4 a 5,0              | 0,3 a 4,0            |
| E µg/100 mL                | 1.000                  | 60 a 150             |

Fonte: Adaptado de Fernandes et al., 2014.

## **2. PROTEÍNA**

### **2.1 Síntese das proteínas do leite**

As principais proteínas do leite, que incluem as caseínas, a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactalbumina, são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e produzidas exclusivamente nesse tecido. As imunoglobulinas e a albumina sérica não são sintetizadas pelas células epiteliais, mas são absorvidas do sangue. Uma exceção são as limitadas quantidades de imunoglobulina que são sintetizadas pelos linfócitos presentes no tecido mamário (células plasmáticas). Essas células provêm a glândula mamária de imunidade local.

Os precursores para a síntese das proteínas do leite são aminoácidos livres do sangue em 90% e proteínas séricas em 10%. Entre estas últimas estão às imunoglobulinas. A maior parte do nitrogênio utilizado para a síntese das proteínas do leite procede dos aminoácidos livres absorvidos pela glândula mamária.

Os aminoácidos essenciais arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, treonina e valina são absorvidos a partir do sangue em quantidade

suficiente para sintetizar as proteínas da glândula mamária. Os aminoácidos não essenciais são absorvidos como aminoácidos livres, a partir do sangue, e outros são sintetizados na glândula mamária (tabela 3).

O controle da síntese proteica é feito mediante inibição por *feedback* e inibição por repressão e, em ambos os casos, o acúmulo dos produtos é a causa da inibição da atividade enzimática responsável por frear a síntese proteica. O controle também pode ser feito por genes operadores.

**Tabela 3.** Conteúdo aproximado de aminoácidos da fração proteica do leite.

| <b>Aminoácidos essenciais</b> | <b>g/100 g de proteína</b> | <b>Aminoácidos não essenciais</b> | <b>g/100 g de proteína</b> |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Arginina                      | 3,6                        | Alanina                           | 3,6                        |
| Histidina                     | 2,7                        | Ácido aspártico                   | 7,2                        |
| Isoleucina                    | 5,6                        | Cistina                           | 0,7                        |
| Leucina                       | 9,7                        | Ácido glutâmico                   | 23,0                       |
| Lisina                        | 7,9                        | Prolina                           | 9,2                        |
| Metionina                     | 2,5                        | Serina                            | 5,8                        |
| Fenilalanina                  | 5,2                        | Tirosina                          | 5,1                        |
| Treonina                      | 4,6                        |                                   |                            |
| Triptofano                    | 1,3                        |                                   |                            |
| Valina                        | 6,6                        |                                   |                            |

Fonte: Adaptado de Jensen, 1995.

O aumento do teor de proteína da dieta tem pouco efeito sobre o teor proteico do leite. A variação no teor proteico da dieta afeta mais a produção de leite do que a sua composição. Entretanto, a elevação do teor de proteína, especialmente proteína de rápida degradabilidade ruminal, ou até mesmo fontes de nitrogênio não proteico na dieta, pode elevar os níveis de nitrogênio não proteico do leite, o que pode ser aferido pela quantificação da ureia.

A concentração de ureia no leite é de aproximadamente 5%, podendo chegar a 11% em situações em que ocorra menor aproveitamento do nitrogênio da dieta. A ureia do leite está altamente relacionada à concentração de ureia no sangue, que por sua vez reflete o excesso de proteína ou a insuficiência de carboidratos fermentáveis no rúmen.

## **2.2 Proteínas presentes no leite**

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

A proteína é um dos componentes do leite que também pode sofrer alteração em curto prazo pela modificação na nutrição, mas a amplitude dessa variação é bem menor que a do teor de gordura, oscilando não mais que 0,3% a 0,4%. Alterações na concentração de proteína do leite, a longo prazo, podem ser obtidas pela seleção de animais e por melhoramento genético. O interesse da indústria pela manipulação da proteína do leite é recente, assim como sua influência nutricional, comparado a estudos sobre teor de gordura. Desse modo, os fatores básicos que afetam a síntese de proteína do leite também não são tão conhecidos como os relativos à síntese de gordura.

As proteínas do leite são constituídas pelas proteínas insolúveis ou caseínas, que representam cerca de 27 g/L, e se apresentam na forma de micelas de fosfocaseinato de cálcio, sendo facilmente degradadas por todas as enzimas proteolíticas e pelas proteínas solúveis que se encontram no lactosoro e se dividem em albuminas, globulinas e enzimas. As proteínas insolúveis ou caseínas diferenciam-se entre si por diversas características a que correspondem pesos moleculares diferentes, o que permite a sua separação por ultracentrifugação.

As proteínas solúveis englobam as imunoglobulinas e as lactotransferinas em quantidades vestigiais e que não têm o menor valor no âmbito tecnológico. As matérias nitrogenadas não proteicas constituem um conjunto de substâncias sem efeito tecnológico e cujo teor em nitrogênio não deve ser considerado para a determinação do teor proteico do leite.

A principal diferença que existe entre a fração caseínica e as proteínas solúveis é que a primeira coagula pelo coalho animal ou outras enzimas coagulantes, enquanto as segundas coagulam pelo calor e não pelas enzimas coagulantes. A coagulação das enzimas solúveis do leite pelo calor, quando se

encontram em equilíbrio estável no leite, é só parcial e começa a processar-se a temperaturas próximas dos 60 °C.

O leite contém 30 g/L a 35 g/L de proteína total de alta qualidade nutricional (tabela 4). Existem seis produtos genéticos da glândula mamária de caráter majoritário:  $\alpha$ 1-caseínas,  $\alpha$ 2-caseínas,  $\beta$ -caseínas,  $\kappa$ -caseínas,  $\beta$ -lactoglobulinas e  $\alpha$ -lactoalbuminas. As proteínas do leite se classificam em caseínas e proteínas do soro. Todas as caseínas formam um complexo esférico altamente hidratado, contendo fosfato de cálcio, denominado micela. As demais proteínas do leite estão em forma solúvel. A caseína tem uma composição de aminoácidos apropriada para o desenvolvimento dos animais jovens. Essa proteína de alta qualidade no leite de vaca é uma das razões pelas quais o leite é tão importante na alimentação humana.

A micela não é formada apenas por caseína, mas também por compostos de baixo peso molecular, que recebem o nome de fosfato coloidal, também conhecido pela sigla CCP (*colloidal calcium phosphate*); apesar de seu nome, o CCP não é formado apenas de fosfato cálcico, mas também de citrato, magnésio e outros elementos minerais. As micelas são partículas esféricas com diâmetro entre 40  $\mu$ m e 300  $\mu$ m ou mais e são bastante hidratadas.

Graças às características anormais das caseínas e do complexo micelar, as proteínas do leite podem separar-se facilmente das frações caseína e proteína do soro. Essa separação, mediante a precipitação ácida ou a coagulação, constitui a produção de muitos produtos lácteos, como os queijos e os produtos de soro. A caseína é a maior fração das proteínas do leite bovino; conseqüentemente, o coágulo formado por aglomeração das micelas de caseína durante a fabricação do queijo retém a maioria da proteína total do leite.

A estrutura granular multimolecular das micelas de caseína é composta de várias proteínas similares, além da própria caseína, mais água e minerais, principalmente cálcio e fósforo. Algumas enzimas também estão associadas às micelas de caseína.

**Tabela 4.** Conteúdo das frações de proteínas presentes no leite.

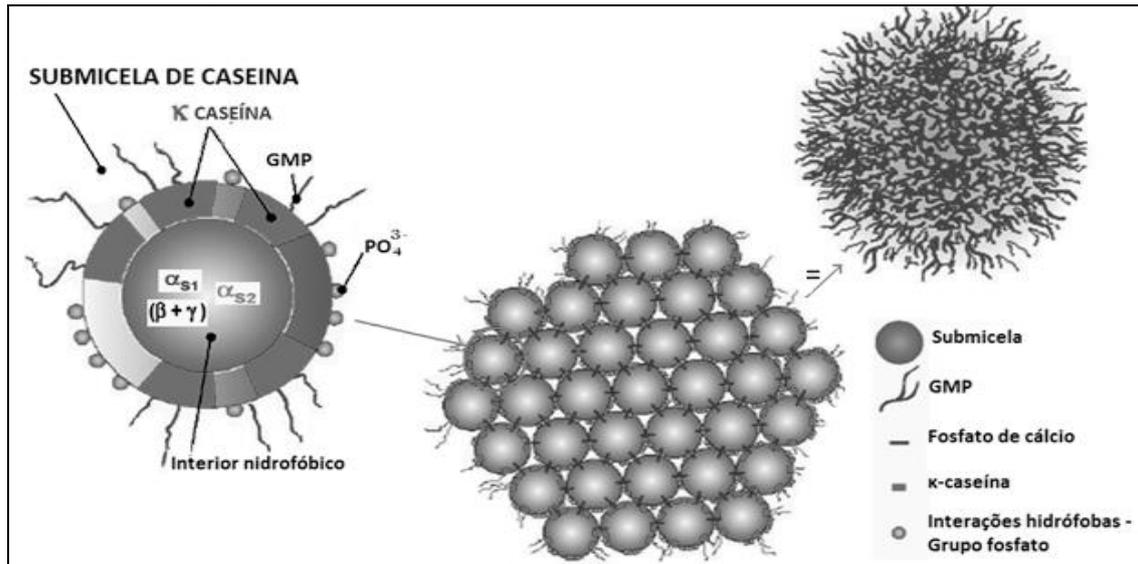
| Proteína                 | Concentração (g/L) | % Proteína total |
|--------------------------|--------------------|------------------|
| <b>Caseínas</b>          | <b>24 – 28</b>     | <b>80</b>        |
| $\alpha_s$ -caseínas     | 15 – 19            | 42               |
| $\alpha_{s1}$            | 12 – 15            | 34               |
| $\alpha_{s2}$            | 3 – 4              | 8                |
| $\beta$ -caseínas        | 9 – 11             | 25               |
| $\kappa$ -caseínas       | 3 – 4              | 9                |
| $\gamma$ -caseínas       | 1 – 2              | 4                |
| <b>Proteínas do soro</b> | <b>5 – 7</b>       | <b>20</b>        |
| $\beta$ -lactoglobulinas | 2 – 4              | 9                |
| $\alpha$ -lactoalbuminas | 1 – 1,5            | 4                |
| Proteoses-peptonas       | 0,6 - 1,8          | 4                |
| Proteínas do sangue      |                    | 3                |
| Albumina do soro         | 0,1 - 0,4          | 1                |
| Imunoglobulinas          | 0,6 - 1,0          | 2                |

Fonte: Adaptado de Gonzalez et al., (2001), e Pereira et al., (2014).

A estrutura micelar da caseína é importante na digestão do leite no estômago e no intestino. Também é a base para os produtos da indústria de laticínios e a base para separar facilmente componentes proteicos de outros componentes do leite.

A caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica. A micela de caseína é constituída de subunidades micelares (submicelas) de 15 nm a 20 nm de diâmetro, que tem ao redor de 10 moléculas de outros quatro tipos de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) em proporções variáveis (figura 1). Os grupos fosfato covalentes da molécula de caseína estão envolvidos com ligação de cálcio. Após a caseína ser fosforilada, o cálcio se liga ao fosfato para iniciar a polimerização das submicelas. Essa estrutura (caseína-PO<sub>4</sub>-Ca<sup>2+</sup>-PO<sub>4</sub>-caseína) se encontra em suspensão estável, graças à presença de cargas negativas e de grupos glicídicos hidrofílicos. As micelas de caseína possuem, aproximadamente, 140 nm a 200 nm de diâmetro. São compostas de alfa, beta e kappa caseína.

**Figura 1.** Imagem esquemática da micela de caseína do leite.



Fonte: Adaptado de Di Martins, 2009.

O arranjo micelar das subunidades de caseína confere à micela resistência aos tratamentos térmicos industriais e estabilidade aos derivados lácteos durante a armazenagem nas prateleiras do comércio varejista, uma vez que precipitados poderiam ocorrer se houvesse alterações principalmente na concentração de  $\kappa$ -caseína e de cálcio iônico do leite.

Além de manter as caseínas estáveis ao etanol e ao aquecimento térmico, a organização da micela das subunidades de caseína facilita a ação da enzima quimosina para a clivagem na ligação peptídica Phe<sub>105</sub> – Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína no estômago humano e/ou no abomaso do bezerro, o que contribui para a adequada nutrição e o maior aproveitamento dos aminoácidos contidos na caseína durante os processos de digestão e absorção. A estrutura aberta das micelas de caseína, resultantes da clivagem da  $\kappa$ -caseína, permite o acesso de proteinases. Essa clivagem expõe o interior hidrofóbico da micela de caseína, resultando em susceptibilidade das micelas de caseína em formar coalho.

A caseína é um dos mais abundantes componentes orgânicos do leite, junto à lactose e à gordura. As moléculas individuais de caseína não são muito solúveis no ambiente aquoso do leite. No entanto, os grânulos da micela de caseína mantêm uma suspensão coloidal no leite. Se a estrutura micelar se perde, as micelas se dissociam e a caseína fica insolúvel, formando um

material gelatinoso conhecido como coágulo. Essa é parte da base de formação dos produtos não fluidos derivados do leite.

Como a micela de caseína é uma suspensão, pode ser separada do resto do leite por centrifugação a alta velocidade. Geralmente o leite é primeiro desengordurado (o creme é retirado) do leite total por centrifugação a baixa velocidade (5.000 g a 10.000 g), resultando na camada de creme no topo, um sobrenadante aquoso e um pequeno *pellet* de leucócitos e outros resíduos celulares. O sobrenadante aquoso é o leite descremado (fase plasmática do leite).

A centrifugação do leite descremado em ultracentrífuga (50.000 g ou mais) resulta em um *pellet* de caseína e um sobrenadante chamado soro (fase sérica do leite), que contém água, lactose e proteínas solúveis não caseínicas. Depois de retirada da caseína, as proteínas restantes no leite são, por definição, proteínas do soro. Essas proteínas variam com a espécie animal, o estágio de lactação e a presença de infecções intramamárias, entre outros fatores. As principais proteínas do soro do leite de vaca são a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactalbumina.

A caseína pode também ser separada por precipitação com ácido, similarmente ao que ocorre no estômago quando o leite é consumido, ou quebrando a estrutura micelar por hidrólise parcial das moléculas de proteína com uma enzima proteolítica. No estômago dos animais jovens da maioria das espécies existe a enzima renina que, especificamente, hidrolisa parte da micela da caseína resultando na formação do coágulo.

O método clássico de precipitação da caseína no leite de vaca, feito em laboratório, é mediante a adição lenta de HCl 0,1 N para abaixar o pH do leite a 4,6. A caseína gradualmente formará um precipitado enquanto relativamente uma pequena quantidade das outras proteínas do leite precipitam. Diferentes combinações de precipitação ácida controlada e de hidrólise enzimática da caseína são a base da indústria de queijos. Cultivos específicos de bactérias são usados a fim de estabelecer as condições para abaixar o pH e secretar enzimas proteolíticas, utilizadas, por exemplo, na produção de iogurte.

A  $\alpha$ -lactalbumina corresponde a 2% a 5% do total de proteínas e funciona como uma das subunidades da enzima lactose-sintetase. Essa enzima é constituída de duas proteínas: a proteína A, uma galactosil-

transferase, e a proteína B, que é a  $\alpha$ -lactalbumina. Durante a gestação, a progesterona impede a síntese de  $\alpha$ -lactoalbumina, mas não a da galactosil-transferase, a qual transfere galactose sobre outros monossacarídeos diferentes de glicose para participar na formação de oligossacarídeos de membrana. Outras proteínas do leite incluem a  $\beta$ -lactalbumina (7% a 12%), albumina sérica (1%) e as imunoglobulinas G, M e A (1,3% a 2,8%). A função da  $\beta$ -lactoglobulina não é conhecida. As proteínas do soro também incluem uma longa lista de enzimas, hormônios, fatores de crescimento, transportadores de nutrientes e fatores de resistência a doenças, entre outros.

A maioria das proteínas séricas é relativamente de baixa digestibilidade no intestino, embora todas sejam digeridas em algum grau. Quando não são digeridas no intestino, algumas das proteínas intactas podem estimular uma resposta imune localizada intestinal ou sistêmica, conhecida como alergia a proteínas do leite, mais frequentemente causada pela  $\beta$ -lactoglobulina.

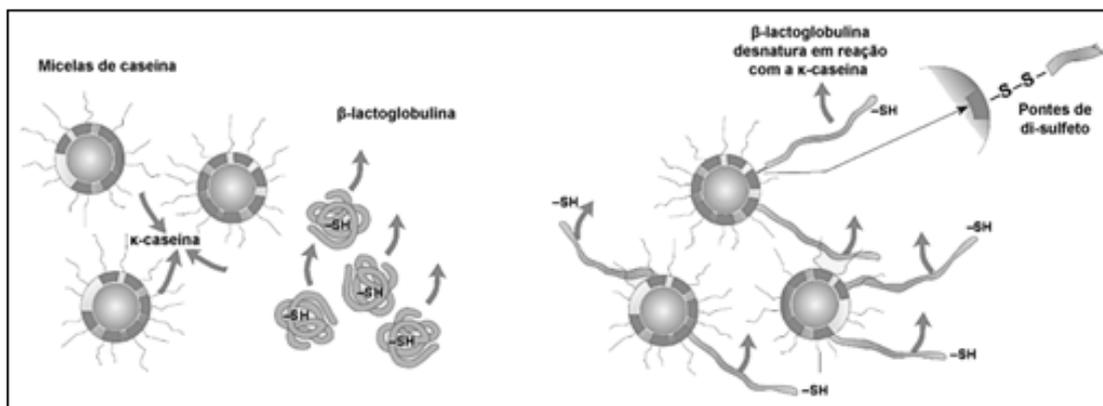
**Proteínas do soro:** Como já mencionado, as proteínas mais abundantes no soro de leite são a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina. No leite de vaca, a mais abundante é a  $\beta$ -lactoglobulina, que corresponde a 9,5% do nitrogênio total (NT) do leite e 50% das proteínas do soro.

As proteínas do soro também podem contribuir para alterar a estabilidade das micelas de caseína. Entre as quatro principais proteínas do soro, apenas duas são sintetizadas na glândula mamária ( $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina), enquanto as outras são originadas do sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). Em condições normais, a  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína do soro presente em maior concentração no leite. A função biológica da  $\beta$ -lactoglobulina ainda não é totalmente conhecida, mas está associada com o metabolismo do fosfato na glândula mamária e no transporte da vitamina A e outras moléculas hidrofóbicas, como os ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos.

A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína termolábil e apresenta certa capacidade de sequestrar o cálcio em um dado pH; os níveis de cálcio determinam as interações da  $\beta$ -lactoglobulina com as demais proteínas do leite. A  $\beta$ -lactoglobulina apresenta reatividade com a  $\kappa$ -caseína (localizada na região

externa da micela), e as interações entre essas duas proteínas pode contribuir para reduzir a estabilidade das micelas (figura 2).

**Figura 2.** Reação da  $\beta$ -lactoglobulina com a  $\kappa$ -caseína na micela durante o tratamento térmico do leite.



Fonte: Adaptado de Bylund, 1995.

Alterações nas proteínas  $\kappa$ -caseína e  $\beta$ -lactoglobulina foram sugeridas como fatores que podem contribuir para a ocorrência de leite instável não ácido (LINA), sendo este um leite com valores normais de pH e acidez titulável. As soroproteínas são desnaturadas durante o tratamento térmico e, como resultado, reagem com a  $\kappa$ -caseína na micela e podem reduzir a estabilidade do leite. A intensidade de interações da  $\kappa$ -caseína com a  $\beta$ -lactoglobulina depende da concentração de cálcio livre no leite.

O LINA está associado a alterações nas micelas de caseína, equilíbrio salino e concentração de cátions bivalentes no leite; no entanto, há poucos estudos que avaliaram o efeito isolado de cada fator que pode alterar a estabilidade do leite, o que dificulta a implementação de medidas de prevenção e correção do LINA.

### 2.3 Alergia às proteínas do leite

A alergia alimentar constituiu um importante problema de saúde pública, atingindo indivíduos de qualquer faixa etária. É definida como um efeito adverso resultante de uma resposta imunológica específica que ocorre de forma reprodutível após exposição a um dado alimento e que é distinto de outras respostas adversas, como a intolerância alimentar (não imune mediada e que envolve reações enzimáticas) ou reações mediadas por toxinas.

A alergia às proteínas do leite de vaca (APLV) constitui a alergia alimentar mais frequente em crianças com idade inferior a três anos, todavia a APLV com manifestações gastrointestinais (GI) ocorre em qualquer idade. O diagnóstico correto, baseado em provas de tolerância oral, é extremamente importante, evitando situações de sobre ou subdiagnóstico e tratamento inadequado. A prevalência baseada apenas na percepção dos pais é muito superior à real, atingindo até 17% das crianças em idade pré-escolar. Já a prevalência baseada em provas de provocação oral (PPO) varia entre 2% a 3% dos lactentes, 0,4% a 0,5% em lactentes sobre leite materno exclusivo (LME) e menos de 1% em crianças com idade igual ou superior a seis anos.

O leite de vaca engloba 20 proteínas potencialmente sensibilizantes, incluindo  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina de soro bovino, imunoglobulinas bovinas e caseínas. Verifica-se homologia estrutural e conseqüentemente reatividade cruzada, com alergênicos do leite de vários mamíferos (por exemplo: leite de ovelha, cabra, jumenta). A APLV pode resultar de mecanismos da imunoglobulina E (IgE)-mediados, não IgE-mediados ou mistos. As formas mistas podem envolver mecanismos IgE-mediados ou celulares, habitualmente têm um início retardado ou crônico e incluem a gastroenteropatia e a esofagite eosinofílicas.

A distinção desses mecanismos tem importância clínica, uma vez que a APLV IgE-mediada se associa a maior risco de reações graves, maior risco de múltiplas alergias alimentares e sensibilização a alergênicos inalantes no futuro.

### **3. GORDURA**

De todos os componentes do leite, a fração que mais varia é formada pelas gorduras, podendo oscilar entre 3% e 6%. A raça, a época do ano, a posição geográfica e o manejo dos bovinos leiteiros são os fatores que mais influem na concentração lipídica do leite; de modo geral, a concentração de gordura diminui com o aumento no volume de produção. Alterações no teor de gordura podem informar sobre a fermentação no rúmen, as condições de saúde da vaca e o funcionamento do manejo alimentar. O teor de proteína

também pode ser afetado, porém em menor grau, enquanto o teor de lactose é o menos influenciado.

Quimicamente, a gordura presente no leite está majoritariamente na forma de triglicerídeos, que são compostos formados de três moléculas de ácidos graxos unidas na glândula mamária a uma molécula de glicerol. A gordura no leite contém 17 ou mais tipos de ácido graxo, variando quanto ao número de carbonos na cadeia de 4 a 20. Vacas leiteiras excretam no leite uma quantidade de gordura maior do que a consumida na dieta. Cerca de metade da gordura excretada é sintetizada no organismo animal a partir de fontes não lipídicas e existe grande diferença na composição da gordura do leite entre espécies, como pode ser observado na tabela 5.

**Tabela 5.** Composição de ácidos graxos na gordura do leite de algumas espécies (% do total de ácidos graxos).

| Ácido graxo<br>Molécula | Nome         | Concentração (% do total) |       |       |        |
|-------------------------|--------------|---------------------------|-------|-------|--------|
|                         |              | Vaca                      | Égua  | Porca | Mulher |
| Cadeia Curta            | -----        | -----                     | ----- | ----- | -----  |
| 4:0                     | Butírico     | 10,3                      | -     | -     | -      |
| 6:0                     | Caproico     | 3,4                       | -     | -     | -      |
| 8:0                     | Caprílico    | 2,3                       | 1,8   | -     | -      |
| Cadeia Média            | -----        | -----                     | ----- | ----- | -----  |
| 10:0                    | Cáprico      | 3,4                       | 5,1   | 0,7   | 1,3    |
| 12:0                    | Láurico      | 4,6                       | 6,2   | 0,2   | 3,1    |
| 14:0                    | Mirístico    | 5,0                       | 5,7   | 4,0   | 5,1    |
| Cadeia Longa            | -----        | -----                     | ----- | ----- | -----  |
| 16:0                    | Palmítico    | 20,9                      | 23,8  | 32,9  | 20,2   |
| 16:1                    | Palmitoleico | 1,2                       | 7,8   | 11,3  | 5,7    |
| 18:0                    | Estearico    | 15,5                      | 1,1   | 3,5   | 3,0    |
| 18:1                    | Oleico       | 27,2                      | 20,9  | 35,2  | 46,6   |
| 18:2                    | Linoleico    | 2,9                       | 14,9  | 11,9  | 13,0   |
| 18:3                    | Linolênico   | 2,4                       | 12,6  | 0,3   | 1,4    |
| % insaturado/total      | -----        | 34,0                      | 56,3  | 58,7  | 67,1   |

Fonte: Cruz et al., 2016.

Os triglicerídeos são os componentes majoritários das espécies estudadas. Representam 95%, acompanhados de pequenas quantidades de di e monoglicerídeos, de colesterol livre e seus ésteres, de ácidos graxos e fosfolipídeos, de glicolipídeos e ainda de vitaminas lipossolúveis.

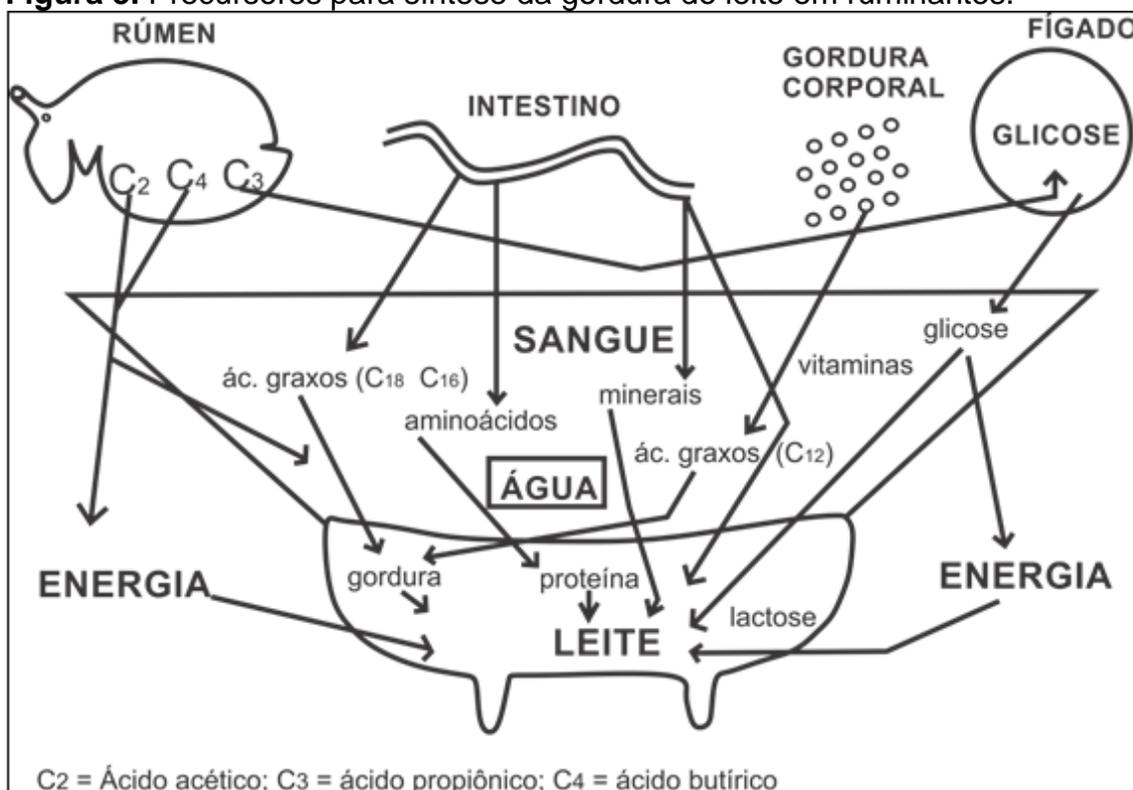
Foram identificados mais de 150 ácidos graxos, dos quais o ácido mirístico representa 8% a 15%, o palmítico, 20% a 32%, o estearico, 7% a

15%, e o oleico 15% a 30%. Em torno de 60% são saturados, 35% monoinsaturados e 5% polinsaturados.

Os ácidos graxos com cadeias de 18 a 20 carbonos passam do sangue para a glândula mamária e têm origem na dieta ou na síntese de ácidos graxos feita pelo tecido adiposo do bovino; representam cerca de 55% dos ácidos graxos presentes no leite.

Cerca de 50% dos ácidos graxos com 16 carbonos (palmítico) também têm origem na dieta e no tecido adiposo, enquanto o restante é sintetizado pela própria glândula mamária, principalmente a partir de acetato, um produto da fermentação ruminal. Cadeias de carbono variando de 4 a 14 átomos são sintetizadas na glândula mamária, como pode ser visualizado na figura 3. Também é possível observar as transformações que ocorrem no rúmen, que dependem da composição da dieta e são de grande importância na produção e na composição do leite. Além disso, o processo de absorção nos intestinos, o metabolismo no fígado e a mobilização das reservas corporais participam do fornecimento de nutrientes e de precursores, através do sangue, para a síntese do leite na glândula mamária.

**Figura 3.** Precursores para síntese da gordura do leite em ruminantes.



Fonte: Schmidt; Van Vleck, 1974.

Dietas com quantidade excessiva de gordura ou deficientes em fibra podem deprimir a síntese de ácidos graxos de cadeia curta pela glândula mamária, reduzindo a porcentagem de gordura do leite. Em leite com baixo teor de gordura ocorre redução mais acentuada nos ácidos graxos com menos de 16 carbonos. A etiologia do distúrbio é comum aos nutrientes gordura e carboidrato. Ácidos linoleicos conjugados (CLA), C18:2 e o ácido octadecenoico (C18:1, trans-11) são produzidos no ambiente ruminal. Vários isômeros de CLA têm sido isolados do conteúdo ruminal.

Estes ácidos graxos, com presença de uma ou duas ligações duplas entre átomos de carbono, são compostos intermediários formados durante a bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados pelos microrganismos do rúmen.

A gordura encontra-se dispersa no leite em forma de glóbulos esféricos visíveis no microscópio, com diâmetro de 1,5  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  (em média, 3  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ ). Os glóbulos são constituídos de um núcleo central que contém a gordura, envolvidos por uma película de natureza lipoproteica conhecida por membrana. A membrana atua como barreira protetora, impedindo que os glóbulos floculem e se fundam, bem como protege contra a ação enzimática.

A integridade dos glóbulos determina a estabilidade da gordura do leite. Qualquer alteração da membrana favorece a aproximação e a coalescência dos glóbulos que emergem à superfície do leite mais depressa que os glóbulos isolados (separação da nata ou desnate). Quando se rompe a membrana e o glóbulo perde sua individualidade, a união dos glóbulos torna-se irreversível, e a emulsão perde sua estabilidade.

Quando o leite cru é mantido a temperatura de refrigeração, observa-se a separação rápida da nata. Isso acontece em razão da formação de grandes agregados de glóbulos de gordura, às vezes de tamanho superior a 1 mm, podendo conter até um milhão de glóbulos e entre 10% a 60% de gordura (v/v). Os agregados apresentam forma e tamanho irregulares; a baixa temperatura, são volumosos e firmes porque retêm soro em seu interior; a linha de nata que se obtém é espessa.

Em temperatura mais elevada, os agregados são pequenos e compactos. O principal agente responsável pela aglutinação é a imunoglobulina (IgM) procedente do colostro ou do leite. A IgM é uma molécula (proteína) grande (900.000 Dalton), que possui 10 pontos ativos pelos quais pode se unir

a outras moléculas; graças a seu tamanho, pode atuar como ponto de união entre as partículas, apesar das repulsões eletrostáticas que podem surgir a curta distância entre várias moléculas. Adsorvem-se na superfície dos glóbulos de gordura, unindo uns aos outros e provocando sua agregação; por isso a IgM é conhecida como aglutinina. A adsorção da aglutinina da superfície dos glóbulos de gordura acontece quando a gordura está em estado sólido ou semissólido (baixas temperaturas), quando a gordura está líquida, ou seja, em altas temperaturas não ocorre graças à desnaturação proteica.

O pH também tem influência na aglutinação, pois a acidificação do leite diminui as cargas negativas das membranas, o que favorece a aglutinação. O tamanho dos glóbulos também é relevante: quanto menor é o glóbulo, maior é a área superficial e, portanto, requer-se mais aglutinina. De fato, no leite homogeneizado não se produz aglutinação pelo frio, a não ser que se adicione grande quantidade de aglutinina.

### **3.1 Principais alterações que afetam os lipídeos**

#### **Lipólise**

A hidrólise dos triglicerídeos provoca o aumento de ácidos graxos livres, conferindo sabor de ranço ou sabão; os ácidos de C-4 e C-12 são os principais responsáveis por isso. A intensidade da lipólise é expressa como acidez ou como índice de acidez da gordura em milimol de ácido graxo livre por 100 g de gordura.

O leite possui uma lipase endógena, com temperatura ótima de atuação a 37 °C e pH ótimo 8, sendo estimulada pelo cálcio. É uma enzima muito ativa, mas alguns fatores limitam sua atuação, tais como:

- pH do leite, que é de  $\pm 6,7$ .
- Temperatura do leite (refrigeração).
- Estar unida as micelas de caseína diminui a quantidade de enzima livre.
- A membrana do glóbulo de gordura protege os triglicerídeos do ataque enzimático.
- A lipase é instável, perde atividade lentamente, principalmente em temperaturas altas e pH baixo. A enzima torna-se inativa a 75 °C por 20 segundos.

Além da lipase endógena, pode haver outras de origem microbianas; sendo estáveis termicamente, algumas resistem à temperatura de esterilização.

Cabe lembrar que nem sempre o fenômeno lipolítico é prejudicial, já que alguns queijos devem seu sabor, em parte, à presença de ácidos graxos livres.

### **Auto-oxidação**

O processo de auto-oxidação da gordura é uma reação química que afeta os ácidos graxos insaturados livres ou esterificados. Essa reação é dependente do oxigênio, sendo catalisada pela luz, pelo calor e por metais como ferro (Fe) e cobre (Cu). Os principais produtos da reação, os hidroperóxidos, não possuem aroma, mas são instáveis e degradam-se formando diversas substâncias, como carbonilas instauradas de C-6 e C-11, álcoois e ácidos, dando aroma de ranço.

### **Homogeneização**

A homogeneização tem como objetivo prolongar a estabilidade da emulsão da gordura reduzindo mecanicamente o tamanho do glóbulo de gordura até atingir um diâmetro de 1 µm a 2 µm. A diminuição do tamanho do glóbulo evita a floculação e, portanto, impede que a nata se separe. Além da diminuição dos glóbulos de gordura, a homogeneização provoca outros efeitos, como:

1. Modificação da membrana. Os componentes originais da membrana não são suficientes para recobrir os novos glóbulos de gordura. Assim, reestrutura-se espontaneamente formando nova membrana, que inclui restos da antiga e de novas proteínas (caseínas e proteínas do soro), e aumentando quatro vezes a fração proteica.
2. A cor se torna mais branca em razão do maior efeito dispersante da luz.
3. Aumenta a espuma, pois aumentam as proteínas.
4. A nova membrana não protege tão bem quanto a original; logo, as lípases de estrutura proteica aderem parcialmente à superfície da gordura e chegam mais fácil aos triglicerídeos do interior.
5. Diminui a tendência a auto-oxidação porque os cátions localizados na membrana, como o cobre, passam para o soro.

## **Inibidores da gordura do leite**

Vários pesquisadores verificaram que alterações nos processos microbianos ruminais eram a base comum para todas as condições de redução na gordura do leite; porém possíveis inibidores específicos formados no rúmen não foram estudados até que o papel dos ácidos graxos trans na queda da gordura láctea fosse testado, por meio da utilização dietética de óleos vegetais hidrogenados que continham ácidos graxos trans.

Grande parte das teorias propostas para a queda de gordura do leite deve-se à baixa quantidade de precursores lipídicos, baseadas em observações de reduzida produção de acetato e butirato e aumento na formação de propionato quando da utilização de baixa quantidade de fibra na dieta.

O efeito do aumento da produção de propionato sobre a síntese do leite é geralmente relacionado como mediado pela indução pela insulina da troca de substâncias lipogênicas. Propionato e glicose estimulam a liberação de insulina, sugerindo-se que o aumento na secreção de insulina resultante da ingestão da baixa quantidade de fibra reduziria a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo, reduzindo, assim, o suprimento de lipídeos na glândula mamária. A insulina também estimula o uso de acetato e de butirato para a síntese de lipídeos nos tecidos adiposos. A esse conjunto de fatos denominou-se teoria insulínica.

Ácidos graxos trans são formados como intermediários na bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados liberados pela digestão ruminal. Davis e Brown (1970) foram os primeiros a descrever uma possível relação entre ácidos graxos trans C18:1 e a redução na gordura do leite. O trans-11 18:1 é o principal ácido graxo trans C18:1 presente na gordura do leite, todavia a queda de gordura do leite está relacionada com o aumento do ácido graxo trans-10 18:1, em vez do isômero trans-11 18:1. Esse fenômeno é chamado Síndrome de depressão gordura, no qual todos os ácidos graxos de cadeia longa que fazem parte da gordura do leite provêm da bio-hidrogenação no rúmen; e a bactéria *Butyvirbio fabrisolvens* altera a síntese de alguns isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA).

A enzima  $\Delta^9$ -desaturase presente na glândula mamária não consegue mudar o isômero trans-10, cis-12, que altera o isômero biologicamente ativo cis-9, trans-11, afetando a síntese de gordura na glândula mamária e ocasionando um valor diminuído na porcentagem de gordura no leite.

### **3.2 Benefícios da gordura do leite**

O teor de lipídeos do leite das diferentes espécies reflete as exigências dos filhotes de cada uma em função dos ambientes onde vivem, e os animais terrestres e marinhos que vivem em ambientes frios secretam altos teores de lipídeos em seus leites. Os lipídeos também são importantes como fontes de ácidos graxos essenciais e para a absorção de vitaminas lipossolúveis.

Os ácidos linoleicos conjugados (CLA) correspondem a um grupo heterogêneo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico encontrados, principalmente na fração gordurosa de produtos lácteos de ruminantes.

A maioria das substâncias naturais que exibem atividades anticarcinogênicas é originada de plantas, sendo o CLA uma exceção, pois é considerado na atualidade um importante elemento na estratégia de prevenção de câncer. O CLA está usualmente entre os compostos anticarcinogênicos que atuam na redução tanto da incidência de tumor em modelos experimentais de carcinogênese em ratos como de agentes citotóxicos existentes nas células cancerígenas.

Entre outras características benéficas à saúde, pode-se citar:

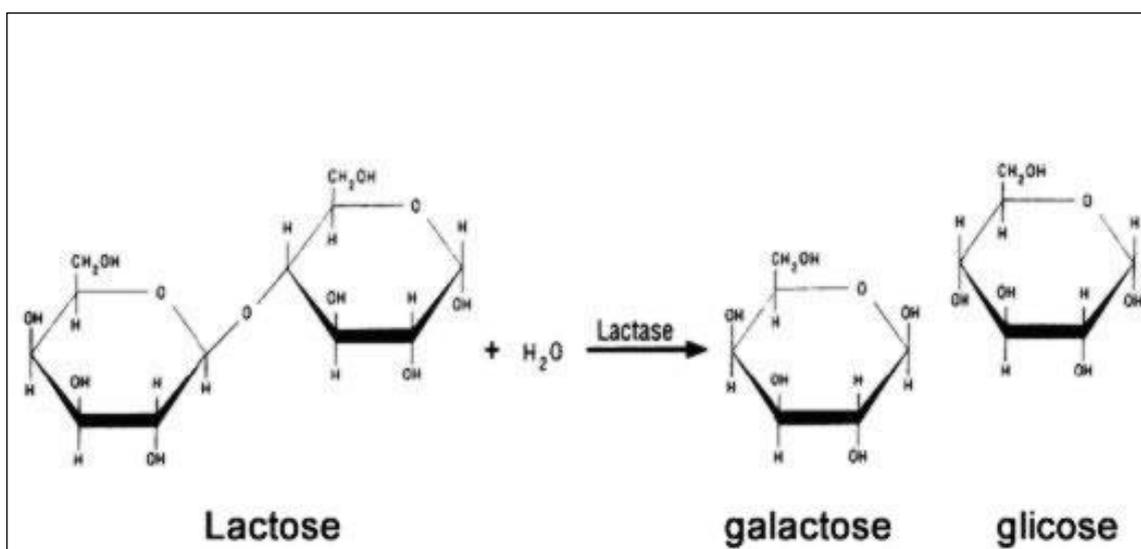
- propriedade hipocolesterolêmica;
- mecanismo antioxidante;
- inibição da síntese de nucleotídeo;
- redução da atividade proliferativa;
- inibição da formação de DNA tumoral;
- inibição da ativação da carcinogênese.

Apesar das pesquisas sobre os benefícios para a saúde, é difícil definir o mecanismo de ação do CLA e deve-se colocar ainda a possibilidade de efeitos negativos, como acúmulo de gordura no fígado e no baço.

#### 4. LACTOSE

A lactose é o açúcar presente no leite e seus derivados; no leite humano representa 7,2% e, no leite de vaca, em torno de 4,7%. É um hidrato de carbono, mais especificamente um dissacarídeo, que é composto de dois monossacarídeos, a glicose e a galactose, como representado na figura 4. A lactose é o único hidrato de carbono do leite e é exclusiva desse alimento porque é produzida apenas nas glândulas mamárias dos mamíferos. É importante ressaltar que, além da lactose, existem no leite outros carboidratos, como glicose e galactose livres; podem ser encontrados, ainda, outros carboidratos, os nitrogenados (n-acetil glicosamina e n-acetil galactosamina), os ácidos (ácidos siálicos) e os neutros (poliosídeos que contêm fucose), todos em quantidades residuais.

**Figura 4.** Estrutura química da lactose e dos monossacarídeos galactose e glicose.



A lactose encontra-se totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite e existem três formas no estado sólido:  $\alpha$  e  $\beta$  (anidras) e  $\alpha$ -lactose mono-hidratada. É um dos açúcares comuns mais insolúveis, a 25 °C sua solubilidade é baixa, o que pode causar problemas durante determinados processos aos quais o leite é submetido, por exemplo, na fabricação do doce de leite, do leite condensado e de sorvetes. Quando submetida ao processo de aquecimento, ocorre uma reação em presença das proteínas conhecida como reação de Maillard, sendo esse fenômeno frequente nos leites evaporados e esterilizados. A forma  $\beta$  é mais solúvel que a  $\alpha$ -lactose. A forma de cristal  $\alpha$ -

lactose mono-hidratada, que cristaliza sob temperatura inferior a 93,5 °C se apresenta de muitas formas, mas a mais familiar é a de “tomahawk”, que confere ao paladar uma sensação arenosa em certos produtos lácteos, como os sorvetes.

Com relação às propriedades físicas de maior interesse em tecnologia de alimentos podemos citar:- **Cristalização:** considera-se de grande importância o processo de cristalização de lactose, já que essa cristalização indesejável ocorre em uma gama de produtos lácteos, como leite condensado, produtos congelados e em leite e soro desidratados no final de seu processamento. A cristalização da lactose em solução é um fenômeno inevitável, pois qualquer solução, ao ser concentrada, tende a se tornar supersaturada, o que pode resultar na precipitação (cristalização) do soluto durante o resfriamento.

As condições de cristalização influem na forma dos cristais, sendo a lactose um claro exemplo de polimorfismo cristalino. Em condições normais, a cristalização é um processo lento e traz consigo o aparecimento de grandes cristais em pequena quantidade. Os cristais formados são duros e pouco solúveis e podem ser detectados pelo paladar quando seu tamanho ultrapassa 16 µm.

Algumas substâncias impedem ou atrasam a cristalização ao serem absorvidas nos núcleos de cristalização; esse efeito pode se manifestar ainda em pequenas doses. Um exemplo é a riboflavina, que em concentração de 0,25 mg/100 g impede a cristalização.

- **Mutarrotação:** os açúcares que possuem um ou mais átomos de carbono assimétricos são opticamente ativos, isto é, desviam o plano de polarização da luz polarizada que os atravessa, sendo a rotação observada e medida com um polarímetro.

Cada açúcar tem sua rotação específica e característica, que dependerá de sua concentração, da temperatura e da longitude de onda. A α-lactose e a β-lactose diferem em sua rotação específica em água a 20 °C: +89,4 °C e +35 °C, respectivamente. Quando se encontram em solução, produz-se a transformação de uma forma em outra, até alcançar o equilíbrio; esse fenômeno é acompanhado de mudança de rotação específica, recebendo o nome de mutarrotação.

Quando se alcança o equilíbrio entre as duas formas a 20 °C, 37,3% é de  $\alpha$ -lactose e 62,7% é de  $\beta$ -lactose; nesse momento, a rotação específica é  $(\alpha)^{20\text{ °C}} = 55,3^\circ$ . A relação entre a concentração dos dois isômeros é conhecida como constante de equilíbrio e corresponde a:  $62,7/37,3 = 1,68$ .

A constante de equilíbrio se modificará com a temperatura, mas não pelo pH; assim, a 100 °C, o valor da constante é de 1,36. A mutarrotação manifesta-se, para efeitos práticos, por mudanças na solubilidade.

- **Solubilidade:** a solubilidade da lactose é baixa comparada com a de outros açúcares, mas pode chegar a ficar supersaturada. Quando se prepara uma solução supersaturada de lactose, aparece uma série de forças que favorecem a formação de cristais. O ponto de supersaturação está diretamente relacionado com os requisitos energéticos, ou seja, com a energia de nucleação necessária para a formação de um cristal.

Entre o ponto em que se atinge a concentração de saturação e o ponto em que se situa essa concentração crítica na qual aparecem os cristais, há uma zona intermediária conhecida como zona metaestável de supersaturação, em que a lactose pode cristalizar em uma forma conhecida como forçada, ou seja, incorporando à solução núcleos de cristalização, as moléculas de lactose podem se sobrepor a eles em camadas concêntricas que chegarão a constituir um cristal. Essa zona metaestável varia com a temperatura, com a velocidade de agitação da solução e, naturalmente, com o nível de impurezas que possam atuar como núcleos de cristalização.

- **Poder edulcorante:** a lactose tem sabor doce pouco acentuado e seu baixo poder edulcorante (seis vezes menor que o da sacarose) é considerado uma qualidade do ponto de vista dietético, já que torna possível dietas lácteas. Em parte, seu sabor doce é mascarado no leite pelas caseínas.

Com relação às propriedades químicas da lactose podemos citar:

- **Propriedades redutoras:** por possuir um grupo aldeído livre, a lactose é um açúcar redutor e, por isso, pode reagir com substâncias nitrogenadas, desencadeando as reações de Maillard e levando à formação de compostos coloridos que vão de marrom claro até preto, as melanoidinas, de odores anômalos, e à redução do valor nutritivo do leite, quando a lactose reage com aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano. Do ponto de vista técnico, é importante eliminar o ferro e o cobre, catalisadores de reação de

escurecimento não enzimático, dos materiais que estão em contato com o leite, assim como manter temperaturas baixas de produtos desidratados em atmosferas secas.

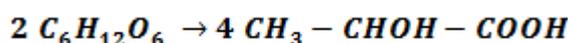
- **Hidrólise:** a lactose é um dos açúcares mais estáveis. Pode ser hidrolisada em meio ácido e em alta temperatura (por exemplo: HCl 1,5 M a 90 °C/hora), esse tratamento apresenta importantes problemas tecnológicos, não sendo, por isso, implementado em nível industrial. Porém, a hidrólise enzimática é um processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano.

A  $\beta$ -galactosidase ou lactase é a principal enzima responsável por essa hidrólise. Trata-se de uma oxidase que hidrolisa a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica e libera a glicose e a galactose, moléculas que o ser humano pode absorver com facilidade. A lactase é encontrada nas glândulas intestinais, podendo ser produzidas por algumas leveduras, bactérias e mofos: *Kluyveromyces fragilis* e *K. lactis*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus stearothermophilus* e as bactérias lácticas. Esses microrganismos são utilizados na indústria para a obtenção da enzima.

A hidrólise tem numerosas aplicações industriais, como a preparação de produtos lácteos pobres em lactose para pessoas com deficiência de lactase (problemas de intolerância à lactose), pré-hidrólise de lactose para acelerar a produção de ácido e a maturação do queijo, prevenção da cristalização da lactose em sorvetes e leites concentrados, redução da higroscopicidade em produtos lácteos desidratados e modificação das propriedades funcionais da lactose para aumentar seu uso em produtos lácteos.

- **Fermentação:** muitos microrganismos metabolizam a lactose como substrato, dando lugar a compostos de menor peso molecular. As fermentações que produzem ácido láctico são as mais importantes para indústria de laticínios, mas há outras fermentações, como a butírica e a propiônica, que têm importância considerável.

A fermentação láctica é produzida por ação das bactérias lácticas homo e heterofermentativas, sendo acompanhada da formação de ácido láctico.



A acidificação espontânea é o fenômeno mais comum observado no leite mantido em temperatura ambiente. O leite acidificado tem odor e sabor diferentes dos do ácido láctico puro pelo fato de se formarem também outros compostos ainda que em pequena quantidade, como diacetil e acetaldeído, alguns importantes no aroma de alguns produtos como manteiga e iogurte.

A fermentação propiônica é realizada pela ação das bactérias do gênero *Propionibacterium*, que fermentam o ácido láctico em ácido propiônico, ácido acético, CO<sub>2</sub> e água. Essa fermentação é típica de alguns queijos em que é responsável pela formação das olhaduras (furos).

A fermentação butírica é produzida a partir da lactose ou do ácido láctico com formação de ácido butírico e gás. É característica das bactérias do gênero *Clostridium* e caracteriza-se pelo aparecimento de odores pútridos e desagradáveis.

Algumas leveduras (*Sacharomyces* e *Candida*) podem transformar o ácido pirúvico em acetaldeído, que se reduz a etanol por ação da enzima álcool-desidrogenase. Em alguns países, utiliza-se esse processo juntamente com a fermentação para o preparo de bebidas ácidas, espumantes e levemente alcoólicas, como o kefir e o leben.

- **Adsorção:** a característica de adsorção de substâncias de baixo peso molecular justifica o poder da lactose de fixar aromas. Isso ocorre mediante o estabelecimento de pontes de hidrogênio e ligações do tipo forças de van der Waals entre a lactose e os compostos voláteis de caráter aromático.

- **Degradação da lactose pelo calor:** durante o tratamento térmico do leite, pode ocorrer a decomposição da lactose, dando lugar a compostos ácidos (ácidos acético, levúlico, fórmico, pirúvico), hidroximetil furfural, aldeídos, álcoois e redutonas. Esses compostos, por sua vez, são reativos e podem dar origem a outros compostos coloridos, que fazem aparecer no leite tonalidades escuras, diferentes das que surgem por reação de Maillard.

Um composto que aparece no leite tratado pelo calor é a lactulose (galactose + frutose), que pode ser utilizada como indicador de aquecimento do leite. Assim, o conteúdo em lactulose pode diferenciar leites pasteurizado e esterilizado. A lactulose é um pouco mais doce e mais solúvel que a lactose; considera-se que ela estimula a multiplicação de *Lactobacillus bifidus*, sendo benéfica, portanto, para dietas infantis. Podem aparecer ainda outros

derivados, como o lactitol, álcool procedente da redução da lactose a altas pressões, e a epilactose (galactose + manose).

- **Obtenção:** a lactose pode ser isolada a partir de qualquer fração aquosa do leite, como o leite desnatado, o soro do leite e o soro de manteiga. Em qualquer um deles, a lactose apresenta-se em concentração de 40 g/L a 50 g/L. A principal fonte de lactose é o soro do leite desengordurado, que se clareia e se concentra a uma faixa entre 55 °C e 65 °C. Durante o resfriamento, grande parte da lactose cristaliza; o produto cristalino separa-se em lactose bruta e licor-mãe. A lactose normal é obtida após sucessivas lavagens, enquanto a de alta qualidade (uso farmacêutico) é obtida por recristalização.

#### **4.1 Usos industriais da lactose**

Tradicionalmente utilizada em alimentos infantis e na elaboração de comprimidos e considerada um açúcar de grande importância nas indústrias de elaboração de alimentos por ter sabor agradável, a lactose é um ingrediente amplamente utilizado na fabricação de diversos produtos, como: pães e recheios, sorvetes, farinhas, alimentos enlatados e produtos lácteos (queijo, iogurte). Graças a suas propriedades físico-químicas, influi na textura, na cor e na quantidade de água desses produtos. Em produtos lácteos, a lactose é um componente essencial na fabricação de fermentados; influi na textura de certos produtos concentrados e congelados; e pode estar associada a mudanças desejáveis ou não de cor e de sabor, induzidas pelo calor em produtos aquecidos.

Em sua forma mais purificada, a lactose converte-se em excelente excipiente de pastilhas e pílulas. Por isso, existe grande variedade de apresentações de lactose quanto a sua granulação. Atualmente, sua estabilidade e as condições de armazenamento são conhecidas.

É considerada, ainda, uma fonte barata de glicose pré-hidrólise, mediante enzimas imobilizadas. É adicionada também a sopas, bebidas instantâneas, misturas de especiarias, produtos cárneos e, de maneira geral, a todos os alimentos em que se requeira redução do sabor doce, potencialização do aroma, longa vida de prateleira e preço aceitável.

## **4.2 Valor nutricional na alimentação**

A lactose não é apenas uma fonte de energia, mas também têm valor nutritivo especial para crianças. Tradicionalmente, considera-se que a lactose favorece a retenção de cálcio (Ca) e, por isso estimula a ossificação e previne osteoporose. Atua interagindo com as vilosidades intestinais, sobretudo no nível do íleo, aumentando sua permeabilidade ao Ca. Portanto, a lactose minimiza, em parte, a deficiência de vitamina D, sugerindo-se que alto nível de lactose poderia ajudar no combate ao raquitismo. Contudo, atualmente, atribui-se essa função favorecedora da assimilação do cálcio também aos peptídeos, que contêm resíduos de seril-fosfato e que procedem da proteólise das caseínas.

Nos adultos, o interesse nutritivo da lactose ainda é visto com reservas em razão dos problemas de intolerância. No entanto, a lactose não tem efeitos cancerígenos, não forma placa dentária e, no caso dos diabéticos, os níveis de glicemia são a metade dos alcançados com o consumo de glicose. Por isso, o uso de lactose é permitido, no caso dos diabéticos, em torno de 35 g/dia a 50 g/dia.

## **4.3 Intolerância à lactose**

A intolerância à lactose ou hipolactasia ocorre em razão da incapacidade de digerir a lactose, pela ausência ou deficiência da enzima  $\beta$ -galactosidase, também chamada de lactase, nas vilosidades intestinais ou na bordadura em escova da mucosa intestinal.

A lactose quando ingerida sofre digestão pela ação da lactase, dando origem aos monossacarídeos glicose e galactose que podem ser absorvidos pelo intestino delgado. Quando não ocorre esse processo, alguns sintomas como diarreia, flatulência, dores de barriga e inchaço no abdômen aparecem. Ou seja, a principal característica dessa patologia é a lactase ser pouco produzida ou não estar presente no organismo dos seres humanos. Essa intolerância pode ser genética ou surgir em decorrência de outras situações, como: cirurgia intestinal; infecções do intestino delgado causadas por vírus ou bactérias, que podem afetar as células do revestimento do intestino (geralmente em crianças); e doenças intestinais, como a doença celíaca.

A intensidade dos sintomas dependerá da quantidade de lactose ingerida e da quantidade de lactose que o organismo tolera. Algumas pessoas são mais tolerantes do que outras, por isso alguns queijos, leites com baixo teor de lactose, iogurtes e leites fermentados podem ser consumidos por portadores desse distúrbio, sem sentir sintomas muito severos da doença. O diagnóstico é determinado por meio dos sintomas citados e de exames clínicos. Os principais métodos diagnósticos envolvem a ingestão de lactose e a determinação da quantidade de glicose no sangue ou de hidrogênio excretado pela respiração, sendo essas medidas realizadas antes da ingestão e após intervalos de tempo determinados. O aumento na glicose sanguínea indica digestão da lactose, pois a glicose pode ser produzida pela hidrólise da lactose, enquanto os valores constantes provavelmente são indicativos de intolerância à lactose.

Existem várias opções de leites e derivados com baixo teor de lactose, não havendo, portanto, a necessidade de exclusão desses alimentos da dieta. No caso do leite deslactosado, há uma redução de aproximadamente 85% da lactose; além disso, existe no mercado a enzima lactase, que pode ser adicionada ao leite ou ingerida na forma de medicamento.

Diferentemente da intolerância à lactose, a alergia à proteína do leite afeta em torno de 2% e 7,5% de crianças e é definida como uma reação adversa contra antígenos do leite de vaca. Na alergia ao leite, o sistema imunológico identifica as proteínas do leite de vaca como um agente agressor, o que ocasiona diarreia, gases, cólicas, distensão abdominal, lesões na pele, dificuldade de respirar, pequeno sangramento intestinal, entre outros. Esses sintomas mais comuns aparecem nos primeiros meses de vida e podem se desenvolver até os 3 anos de idade, diminuindo ou não com o passar dos anos.

## **5. MINERAIS**

O leite apresenta uma composição de sais minerais distinta da encontrada no plasma, como pode ser observado na tabela 6, fruto da atividade secretória das glândulas mamárias. As concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no leite tem valores significativamente abaixo dos encontrados no plasma, ao

contrário daquelas para  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{PO}_4^{--}$ , que são consideravelmente superiores. O leite é a fonte mais abundante em  $\text{Ca}^{++}$  entre os alimentos comuns, e a utilização desse elemento é favorecida pela presença de  $\text{PO}_4^{--}$  no leite em proporções ideais. Devemos lembrar que 99% do  $\text{Ca}^{++}$  nos vertebrados se encontra no esqueleto ósseo, cuja composição mineral é predominantemente de  $\text{Ca}^{++} 5(\text{PO}_4^{--}) 3(\text{OH})$ ; esse fosfato de cálcio é chamado hidroxiapatita. Os conteúdos de  $\text{Fe}^{++}$  e  $\text{Cu}^{++}$  no leite são relativamente baixos, talvez insuficientes para suprir as necessidades de crescimento da criança após alguns meses de idade. Crianças e animais de experimentação nutridos exclusivamente com leite desenvolvem anemia, devido a ingestão deficiente de ferro, especialmente na forma heme.

**Tabela 6.** Concentração de minerais no leite e concentração relativa ao sangue.

| Minerais               | Leite (mg/100 mL) | Concentração no sangue |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| <b>Cálcio</b>          | 125               | 8,5-11 mg/dL           |
| <b>Magnésio</b>        | 12                | 2-3,5 mg/dL            |
| <b>Sódio</b>           | 58                | 135 mmol/L             |
| <b>Potássio</b>        | 138               | 4 mmol/L               |
| <b>Cloro</b>           | 103               | 105 mmol/L             |
| <b>Fósforo</b>         | 96                | 4,5-8,0 mg/dL          |
| <b>Sulfato</b>         | 30                | -                      |
| <b>Elementos traço</b> | 0,1               | -                      |

Fonte: Waghor e Baldwin, 1984; Correa et al., 2009.

As concentrações de sódio, potássio e cloreto no leite constituem o segundo maior determinante do volume de água presente no leite, pela pressão osmótica desses íons, complementando o efeito da lactose na determinação do volume de água no leite.

Os minerais são nutrientes com função plástica e reguladora do organismo. São tão importantes quanto as vitaminas e, sem eles, o nosso organismo não realiza, de forma eficaz, as funções metabólicas. Dos 28 minerais existentes, apenas 12 são essenciais e podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a sua necessidade diária:

- **Macrominerais:** são aqueles cuja necessidade diária é maior que 100 mg. Suas funções principais estão ligadas à estrutura e à formação dos

ossos, regulação dos fluidos corporais e secreções digestivas. Exemplo: cálcio, fósforo, magnésio, cloreto, sódio e potássio.

- Microminerais ou elementos-traço: são aqueles que possuem necessidade inferior a 100 mg por dia, como são os casos do ferro, do zinco, do selênio, do cobre, do iodo e do manganês. As funções desses minerais estão relacionadas a reações bioquímicas, ao sistema imunológico e à ação antioxidante.

No leite são encontrados os minerais essenciais em diferentes concentrações, como apresentados na tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração de minerais no leite cru integral.

| Mineral                | Conteúdo (100 mL) <sup>a</sup> | Ingestão Diária Recomendada (IDR) <sup>b</sup> |
|------------------------|--------------------------------|--|
| <b>Macrominerais</b>   |                                |  |
| Cálcio                 | 118-124 mg                     | 1.000 mg                                       |
| Fósforo                | 93-101 mg                      | 700 mg   |
| Potássio               | 151-166 mg                     | 4.700 mg                                       |
| Cloro                  | 89-100 mg                      | 2.300 mg                                       |
| Sódio                  | 37-47 mg                       | 1500 mg  |
| Magnésio               | 11-14 mg                       | 260 mg   |
| <b>Elementos traço</b> |                                |  |
| Selênio                | 1,0-2,7 µg                     | 34 µg  |
| Zinco                  | 0,4-0,6 mg                     | 7 mg   |
| Silício                | 290 µg                         | -  |
| Boro                   | 48,4-96,9 µg                   | -  |
| Iodo                   | 10-20 µg                       | 130 µg   |
| Ferro                  | < 10-80 µg                     | 14 µg  |
| Cobre                  | < 10-40 µg                     | 900 µg   |
| Manganês               | < 10 µg                        | 2,3 mg   |
| Arsênio                | 1,94-5,81 µg                   | -  |
| Níquel                 | 2,52 µg                        | -  |
| Flúor                  | 1,94 µg                        | 4 mg   |
| Cromo                  | < 0,4 µg                       | 35 µg  |
| Cobalto                | 0,05 µg                        | -  |
| Molibdênio             | 5 µg                           | 45 µg  |

Fonte: <sup>a</sup> Adaptado de Cashman, 2006; Pereira, 2014. <sup>b</sup> ANVISA, 2005; Otten et al., 2006;  
- Dados insuficientes para cálculo.

## 5.1 Macrominerais

**Cálcio:** é o mineral mais abundante no organismo. Aproximadamente 99% estão presentes nos ossos e nos dentes, o restante se encontra nos tecidos. Ele atua em equilíbrio com o fósforo e é fundamental para a manutenção do tecido ósseo. Participa da regulação da pressão arterial, coagulação

sanguínea, contração muscular, secreção hormonal, transmissão nervosa e, juntamente com o fósforo, formam a estrutura de várias enzimas. É um mineral bem distribuído entre alimentos de origem animal e origem vegetal; no entanto, o cálcio de fontes vegetais sofre a ação de substâncias como o oxalato e o fitato, que reduzem sua absorção, sendo o cálcio de fontes animais mais prontamente disponível. Para que ocorra a absorção do cálcio, é primordial que haja também a presença da vitamina D.

Carência: deformação óssea, osteoporose, fraturas, fraqueza muscular.

Excesso: cálculo renal, insuficiência renal.

Fontes: leite, queijos, iogurte, couve, espinafre, brócolis.

**Fósforo:** assim como o cálcio, é vital para a formação de ossos e dentes fortes. Compõe a estrutura das células e é importante em muitas reações bioquímicas, como no metabolismo energético. As quantidades de fósforo e de cálcio precisam estar em equilíbrio entre si para que cada substância exerça suas funções.

Carência: não ocorre em situações normais, já que é encontrado na maioria dos alimentos, mas, em casos isolados, sua carência pode causar fraturas dos ossos e atrofia muscular.

Excesso: interfere na absorção do cálcio; aumenta a porosidade dos ossos.

Fontes: leite, queijos, carnes, castanha-do-Pará, amendoim.

**Magnésio:** participa na formação dos ossos e dos dentes, é fundamental na contração e relaxamento muscular, participa do sistema imunológico, na formação de anticorpos e na ativação de diversas enzimas.

Carência: fraqueza, hipertensão, aumento da sensibilidade térmica.

Excesso: não são comuns efeitos adversos, mas pode causar diarreia.

Fontes: leite, queijos, sementes de abóbora, castanha-do-Pará, semente de linhaça.

**Cloreto:** importante mineral envolvido no processo digestivo. É necessário para a produção de suco gástrico e enzimas. Normalmente encontra-se em equilíbrio com o sódio e o potássio.

Carência: normalmente é rara, mas quando ocorre resulta em condição de risco de vida por alcalose.

Excesso: é raro, apenas pode ocorrer com a ingestão de grandes quantidades de cloreto de sódio ou cloreto de potássio.

Fontes: Cloreto de sódio (sal de mesa), alga marinha, azeitonas.

**Sódio:** juntamente com o potássio, regula o equilíbrio hídrico do organismo. Influencia a condução dos impulsos nervosos, contrações musculares e pressão arterial.

Carência: câimbras, desidratação, tonturas e hipotensão arterial.

Excesso: pressão alta, ataque cardíaco, aumento da perda de cálcio.

Fontes: Cloreto de sódio, carnes processadas, queijos, defumados, peixe enlatado.

**Potássio:** associado com o sódio, atua no balanço hídrico do organismo, transporta corrente elétrica, atua na transmissão de impulsos nervosos, mantém a frequência cardíaca e a pressão arterial normais.

Carência: reduz a atividade muscular, incluindo a do miocárdio.

Excesso: é chamado de hipercalemia, podendo surgir sintomas como redução da pressão arterial, palpitações cardíacas e fraqueza.

Fontes: banana, abacate, leite desnatado, suco de laranja.

O potássio (K), o sódio (Na) e o cloro (Cl) permitem realizar com a lactose um equilíbrio da pressão osmótica do leite na glândula mamária em relação à pressão sanguínea. Os seus teores variam muito em função das condições de produção e do estado sanitário do animal.

## 5.2 Microminerais ou elementos-traço

**Ferro:** é um dos componentes da hemoglobina dos glóbulos vermelhos. É essencial para o transporte de oxigênio no corpo. É um mineral amplamente distribuído entre fontes animais e vegetais, mas existem diferenças na disponibilidade em ambas as fontes. O ferro de origem animal, conhecido como ferro-heme, é absorvido de forma mais fácil que o ferro não heme. O não heme

depende da presença na dieta da vitamina C para ser melhor absorvido. Apesar de as exigências serem pequenas, é muito importante o consumo de alimentos ricos em ferro. Vale ressaltar que as mulheres necessitam, em média, duas vezes mais ferro na dieta do que os homens.

Carência: quantidade reduzida de oxigênio para os tecidos, anemia, fadiga.

Excesso: é tóxico em grandes quantidades; provoca distúrbios gastrintestinais.

Fontes: carnes, miúdos, gema de ovos, leguminosas e cereais integrais.

**Zinco:** é vital para o crescimento e o desenvolvimento do organismo. Regula o desenvolvimento sexual, a produção de insulina, o sistema imune e a ação antioxidante.

Carência: não é comum em jovens, mas acontece em idosos. Afeta o crescimento normal, deprime o sistema imunológico, baixa a libido, reduz a produção de esperma, leva à perda do paladar e do olfato.

Excesso: reduz a absorção e a quantidade de cobre no organismo.

Fontes: carnes, frutos do mar, ovos, leguminosas e castanhas.

**Selênio:** age em conjunto com a vitamina E como um potente antioxidante, combatendo a atividade dos radicais livres. Tem ação de proteção contra o câncer e é essencial para a função normal da tireoide.

Carência: pode contribuir para doenças cardíacas, disfunção da tireoide e depressão do sistema imune.

Excesso: é o mineral mais tóxico dos presentes na dieta alimentar. A ingestão de doses altas promove a perda de cabelo, unhas e dentes.

Fontes: leite e derivados lácteos funcionais, castanhas, fígado, frutos do mar e cereais integrais.

**Cobre:** é necessário para a formação da hemoglobina e de enzimas que participam do metabolismo do ferro. Possui, ainda, ação antioxidante.

Carência: diminui a absorção do ferro pelo organismo.

Excesso: é danoso para o fígado e pode causar diarreia.

Fontes: fígado, frutos do mar, cereais integrais e vegetais verde-escuros.

**Iodo:** é utilizado na formação dos hormônios da tireoide, necessário na regulação do crescimento e desenvolvimento do corpo.

Carência: pode resultar em bócio.

Excesso: aumenta a concentração do TSH (hormônio estimulante da tireoide).

Fontes: sal iodado, produtos marinhos.

**Manganês:** é importante para a produção de algumas enzimas, participa da formação de ossos e tendões e possui ação antioxidante.

Carência: é extremamente rara.

Excesso: neurotoxicidade

Fontes: Cereais integrais, castanhas e frutas.

**Outros elementos:** há, ainda, outros elementos, como silício, boro, vanádio, estanho, ouro, arsênico, níquel, lítio, germânio, que podem participar de algumas funções metabólicas no organismo, embora não se saiba exatamente como isso acontece. Estes outros elementos não são considerados essenciais.

### **5.3 Funções gerais dos minerais**

- Estrutura óssea e dentária.
- Regulamento do balanço hídrico, ácido-base e pressão osmótica.
- Excitabilidade do nervo, contração muscular, transporte.
- Sistema imune, antioxidante.

### **5.4 Biodisponibilidade dos minerais**

O termo “biodisponibilidade” foi proposto inicialmente para a área farmacológica, visando estabelecer a proporção em que determinada droga intacta alcança a circulação e a razão pela qual isso ocorre.

Na década de 1980, partindo do princípio de que a simples presença do nutriente na dieta não garante sua utilização pelo organismo, passou-se a empregar esse termo para indicar a proporção do nutriente que é realmente utilizada pelo organismo (SOUTHGATE et al., 1989). Essa definição, aceita preferencialmente como um conceito, persistiu por um tempo; entretanto, em 1997, no Congresso de Biodisponibilidade realizado em Wageningen, na

Holanda, foi proposta uma redefinição, ou seja: "Biodisponibilidade é a fração de qualquer nutriente ingerido que tem o potencial para suprir demandas fisiológicas em tecidos alvos", e que passou a vigorar a partir dessa data.

Alguns minerais do leite são totalmente absorvidos no intestino, como sódio, potássio, cloro, iodo e molibdênio, e então eliminados na urina; outros, como cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco, cobre, selênio e flúor, são parcialmente absorvidos (5% a 70%). Os elementos minerais, ao contrário das vitaminas e dos aminoácidos, geralmente não são destruídos por exposição ao calor, à luz e a agentes oxidantes, a pH extremos ou a outros fatores que afetam os nutrientes orgânicos.

Também não existem alterações significativas no conteúdo dos macrominerais com os tratamentos térmicos do leite; já para os elementos-traço, pequenas diminuições podem ser encontradas.

## **6. VITAMINAS**

As vitaminas são compostos orgânicos e nutrientes essenciais de que o organismo necessita em quantidades limitadas. Determinado composto químico orgânico é denominado vitamina quando o organismo não consegue sintetizar esse composto em quantidades suficientes e, portanto, ele tem de ser obtido por meio da dieta. Assim, o termo "vitamina" depende das circunstâncias de cada organismo específico. Por exemplo, o ácido ascórbico, uma forma de vitamina C, é uma vitamina para os seres humanos, mas não para a maior parte dos animais. A suplementação de vitaminas é importante no tratamento de alguns problemas de saúde. No entanto, há poucas evidências de benefícios nutricionais quando usadas por pessoas saudáveis.

As vitaminas são, em geral, moléculas pequenas, de estruturas muito variadas. Contudo, se comportam muitas vezes como coenzimas, associados a uma apoenzima de natureza proteica, desenvolvendo uma atividade biocatalítica. O leite contém muitas vitaminas, como pode ser observado na tabela 8, sendo as mais conhecidas A, B1, B2, C e D.

**Tabela 8.** Composição de vitaminas no leite cru integral e a ingestão diária recomendada para uma pessoa adulta.

| Vitamina                       | Concentração (µg) em 100 mL | Ingestão diária recomendada (IDR) <sup>c</sup> |
|--------------------------------|-----------------------------|--|
| <b>Lipossolúveis</b>           |                             |  |
| A                              | 27-60                       | 600 µg   |
| D                              | 0,3                         | 5 µg   |
| E                              | 100-120                     | 10 mg  |
| K                              | 1-5                         | 65 µg  |
| <b>Hidrossolúveis</b>          |                             |  |
| C                              | 1700-2000                   | 45 mg  |
| Ácido Pantotênico <sup>a</sup> | 350                         | 5 mg   |
| Riboflavina <sup>a</sup>       | 163-175                     | 1,3 mg   |
| Niacina <sup>a</sup>           | 76-90                       | 16 mg  |
| Tiamina <sup>a</sup>           | 40-45                       | 1,2 mg   |
| B6 <sup>a</sup>                | 35-50                       | 1,3 mg   |
| Biotina <sup>a</sup>           | 2,6-3,5                     | 30 µg  |
| Folato <sup>a</sup>            | 5-5,5                       | 240 µg   |
| B12 <sup>a</sup>               | 0,42-0,45                   | 2,4 µg   |

<sup>a</sup> Vitaminas do grupo B; Anvisa, 2005.

Fonte: Adaptado de Amiot, 1995; Pereira, 2014.

### 6.1 Vitaminas lipossolúveis

**Vitamina A:** os vegetais contêm, fundamentalmente, os carotenoides, e os animais, vitamina A. Os carotenoides, especialmente o  $\beta$ -caroteno, se transformam em vitamina A no intestino. A eficácia dessa conversão, na vaca, é relativamente pequena. A gordura do leite de vacas das raças Jersey e Guernsey apresenta três vezes mais caroteno que a das vacas da raça Holandesa, o que explica a intensa cor amarela do leite. Já a raça Holandesa converte mais caroteno em vitamina A, tendo o seu leite em média 60% mais vitamina A que o da Guernsey. O conteúdo de caroteno no leite está relacionado com o consumo de carotenos na dieta.

**Vitamina D:** encontra-se no leite na forma de vitamina D<sub>2</sub>, que resulta da irradiação do ergosterol da dieta, e vitamina D<sub>3</sub>, um derivado do 7-dihidrocolesterol produzido por ação direta dos raios ultravioleta solares sobre o animal. O conteúdo de vitamina D no leite também está relacionado com o teor de gordura deste. As raças Jersey e Guernsey têm mais vitamina D que as Holandesas.

**Vitamina E:** “vitamina E” é o termo genérico usado para tocois e tocotrienóis que apresentam atividade vitamínica semelhante à do  $\alpha$ -tocoferol. No leite, a vitamina E se encontra principalmente na forma de  $\alpha$ -tocoferol e a quantidade presente no leite possui estreita relação com a quantidade na dieta do animal.

**Vitamina K:** o leite é uma fonte relativamente pobre de vitamina K. Ao contrário das outras vitaminas lipossolúveis, o conteúdo de vitamina K do leite não se modifica com a alteração dos seus níveis na dieta. A vitamina K está presente no leite em concentrações de até 5  $\mu\text{g}$  por 100 mL, perfazendo no máximo 30,77% da ingestão diária recomendada, ou seja, 65  $\mu\text{g}$  em dois copos de leite.

## 6.2 Vitaminas hidrossolúveis

**Vitamina B:** as vitaminas do grupo B são sintetizadas pelos microrganismos do rúmen. O leite bovino contém somente quantidades apreciáveis de riboflavina, inositol e ácido pantotênico. No entanto, um litro de leite pode cobrir entre 33% a 50% da necessidade de tiamina de um adulto, 85% a 140% da necessidade de riboflavina, 25% a 60% da necessidade de vitamina B6, 33% da necessidade de ácido pantotênico, 20% da necessidade de colina e 20% da necessidade de biotina. O nível de vitamina B no leite dos ruminantes, assim como no dos monogástricos, apresenta relação com o nível de vitamina na dieta.

**Vitamina C:** a vitamina C se encontra no leite em duas formas ativas — ácido ascórbico, uma forma estável, reduzida, e ácido de-hidroascórbico, uma forma reversivelmente oxidada. A concentração de vitamina C no leite é pouco afetada pelo seu conteúdo na dieta. Os ruminantes são capazes de sintetizar vitamina C, enquanto o homem, não. O leite constitui uma importante fonte de vitamina C para o homem, porém grande parte do conteúdo em ácido ascórbico do leite fresco é destruído antes do seu consumo, principalmente por causa de sua susceptibilidade ao calor e à oxidação.

## 6.3 Efeito do processamento tecnológico nas vitaminas

As vitaminas são nutrientes muito sensíveis aos diferentes processos tecnológicos empregados no processamento do leite e às condições de

armazenamento dos produtos, sendo importante avaliar todos os procedimentos para manter a composição em níveis aceitáveis. Esses nutrientes são sensíveis ao aquecimento, à presença de luz e de oxigênio e também às condições encontradas durante o processamento e o armazenamento do leite e de produtos lácteos.

## **7. ENZIMAS**

Classificam-se como enzimas, um grupo de proteínas produzidas pelos organismos vivos, que têm a habilidade de acelerar os processos bioquímicos nesses organismos. Por essa razão, muitas vezes são chamadas de biocatalisadores. A ação das enzimas é específica; cada enzima catalisa somente um tipo de reação.

Dois fatores influenciam fortemente a ação enzimática: temperatura e pH. Geralmente as enzimas têm uma temperatura ótima de atividade entre 25 °C e 50 °C. Acima dessa temperatura, elas iniciam o processo de desnaturação (inativação enzimática). Quanto ao pH, o valor ótimo depende da enzima em questão.

A presença ou não de certas enzimas no leite é utilizada nos testes de qualidade. Entre as principais enzimas encontradas no leite estão: lipases, proteases e oxidoredutases.

As lipases presentes no leite podem ser de origem microbiana ou endógena. Essas enzimas hidrolisam a gordura em glicerol e ácidos graxos. A ruptura do glóbulo de gordura aumenta muito a eficácia da lipólise pelo aumento da superfície de contato e da frequência de contato. As lipases naturais do leite são termolábeis (inativadas pela pasteurização), sensíveis à oxidação e, ainda, sensíveis às proteases, o que torna sua atividade de pouca importância. Contudo, as lipases de origem microbiana são muito mais resistentes à desnaturação térmica e, portanto, possuem grande importância tecnológica, uma vez que causam a degradação progressiva de produtos lácteos de longa vida de prateleira.

As proteases presentes no leite podem ser de origem microbiana ou endógena. Essas enzimas hidrolisam as proteínas em aminoácidos e peptídeos, podendo provocar amargor. A plasmina é a principal protease

natural do leite. Essa enzima é termoestável no pH normal do leite e mantém de 70% a 80% da sua atividade após a pasteurização e de 30% a 40% após o tratamento por ultra alta temperatura (UAT).

O leite contém várias oxidoredutases, incluindo catalase, peroxidase e xantin-oxidase. A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água. O leite normal contém uma pequena quantidade dessa enzima. Sua quantidade está ligada à presença de leucócitos e células epiteliais no leite, por isso sua quantificação é usada para identificar leites mastíticos ou colostrais.

Entretanto, muitas bactérias produzem esse tipo de enzima, falseando os resultados. A catalase é inativada a 75 °C por 60 segundos.

A peroxidase transfere oxigênio do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para outras substâncias facilmente oxidáveis. Presente em grandes quantidades no leite é capaz de catalisar reações de oxidação da gordura. Essa enzima forma parte do complexo lactoperoxidase/tiocianato/peróxido de hidrogênio (LPS), que é um sistema antimicrobiano natural potencialmente importante. A peroxidase é inativada em temperaturas superiores a 80 °C por 5 segundos. Logo, deve estar presente no leite *in natura* ou no leite pasteurizado.

A fosfatase alcalina hidrolisa ésteres fosfóricos em ácido fosfórico e álcool. A concentração dessa enzima no leite varia de acordo com a estação do ano, raça, estágio da lactação e produtividade do animal. A fosfatase alcalina é desnaturada em temperaturas próximas à de pasteurização (72 °C a 75 °C por 15 a 20 segundos), por isso deve estar ausente no leite pasteurizado. Contudo, a restauração da atividade enzimática pode ocorrer com o tempo, por isso o teste deve ser realizado logo após o termotratamento. A reativação pode ser evitada se o leite for devidamente resfriado após a pasteurização. No Brasil, o método aprovado oficialmente utiliza a reação do fenol liberado da 2,6 dibromo ou 2,6 dicloroquinona cloroimida, produzindo indofenóis azuis que são detectados visualmente. A interpretação do resultado é realizada de três formas: 1) leite cru: coloração azul intensa; 2) leite aquecido, mas não pasteurizado: azul esmaecido; 3) leite pasteurizado: coloração cinza. Esse método visual foi substituído nos países desenvolvidos, desde a década de 1970, por métodos mais sensíveis; inicialmente, pelo método que utiliza o

fosfato de fenolftaleína, e, mais recentemente, pelos métodos espectrofotométricos ou fluorimétricos automáticos.

## 8. REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. de. *Tecnologia de leite e derivados*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 215 p.

AKERS, R. M. Lactation physiology: a ruminant animal perspective. *Protoplasma*, 159: 96-111 (1990)..

AMIOT, J. *Ciencia y tecnología de la leche*. Zaragoza: Acribia, 1991. 547 p.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Journal of the American Academy of Pediatrics*, v. 106, n. 2, p. 346-349, 2000. Disponível em: <<http://pediatrics.aapublications.org/content/106/2/346.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 set. 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. RDC n. 269 de 22 de setembro de 2005.

ANTUNES, A. E. C.; OLEJ, B. Intolerância e sensibilidade aos componentes do leite. In: ANTUNES, A. E. C., PACHECO, M.T.B. (Org.). *Leite para adultos, mitos e fatos frente à ciência*. São Paulo: Varela, 2009. p.18-40.

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. *Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência*. São Paulo: Varela, 2009..

ASHES, J. R. et al. Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seeds. *Journal of Dairy Science*, v. 75, p.1090-1096, 1992.

BARNES, M. A. Biochemistry of the mammary gland. Department of Dairy Science, Virginia Tech, Blacksburg. Disponível em: <<http://www.dasc.vt.edu/dasc4374/4374note.htm>>. Acesso em: 10/05/2017.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 15-29, 2001.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 1764-1769, 2001.

BIJL, E. et al. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. *Journal of Dairy Science*, 96 (9), p. 5455-5464, 2013.

BRASIL. Instrução Normativa MAPA n. 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite. Disponível em: <http://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>. Acesso em: 09/09/2016.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levelson the A production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1370-1381, 2003.

BUCKHOLZ JR., L. L. The role of Maillard technology in flavoring food products. *Cereal Foods World*, v. 33, n. 7, p. 547-551, 1988.

- CASHMAN, K. D. Milk minerals and bone health. *International Dairy Journal*, 16: 1389-1396, 2006.
- CLEGG, R. A. et al. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 3-14, 2001.
- CORREA, L. B. et al. Resposta em parâmetros sanguíneos e urinários de vacas leiteiras ao aumento no balanço cátion-aniônico da dieta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v. 61, n. 3, p. 655-661, 2009.
- COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade dos minerais. *Revista de Nutrição*, v. 10, n. 2, 1997.
- CRUZ, A. G. et al. *Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados*. São Paulo: Elsevier, 2016. 282 p.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of dietary minerals. *Biochemical Society Transactions*, Colchester, v. 24, n. 3, p. 775-780, 1996.
- FAWCETT, D. W.; BLOOM-FAWCETT. *A textbook of histology*. 12<sup>th</sup> ed. New York & London: Chapman and Hall, 1994.
- FONSECA, F. A. *Fisiologia da lactação*. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. UFV, Viçosa, MG. 1995. 137 p.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos, 2000.
- FOX, P. F. (1992). *Advanced Dairy Chemistry*. Proteins. v.1 London: Elsevier Applied Science.
- FREDEEN, A. H. (1996): Considerations in the milk nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science Technology*, 59:185-197.
- GONZALEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZALES, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 5-22.
- HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal*. 6. ed. São Paulo: Manole Ltda, (1995)..
- HOLT, C.; CARVER, J. A.; ECROYD, H.; THORN, D. C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n.10, p. 6 127-6 146, 2013.
- HURLEY, W. L. Milk composition. Lactation Biology. Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana – Champaign.
- Disponível em: <<http://classes.acess.uiuc.edu/AnSci308/milkcomp.html>>. Acesso em 08/06/2017
- JENSEN, R. G. *Handbook of Milk Composition*. San Diego: Academic Press, 1995.
- MARQUES, L. T. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 13, n. 1, p. 91-97, 2007.

- MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v. on-line, p. JDS8926, 2015.
- MOLINA, L. H.; et al. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 33, n. 2, 2001.
- MORALES, F. J.; BOEKEL, M. A. J. S. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal*. Oxford, (8):907-915,1998.
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnología de Alimentos*. Alimentos de Origen Animal. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.
- SILVA, J. C. P. M.; et al. Manejo e administração na bovinocultura leiteira. 2. ed. Viçosa-MG, 2014. p. 181-197.
- PEREIRA, P. B.; SILVA, C. P. Alergia a proteína do leite de vaca em crianças: repercussão da dieta de exclusão e da dieta substitutiva sobre o estado nutricional. *Revista Pediatria*, 30 (2): 100-106, 2008.
- PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30: 619-627, 2014.
- PERRONE, I. T.; PEREIRA, J. P. F.; CARVALHO, A. F. Aspectos tecnológicos da fabricação de soro em pó: uma revisão. *Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes*, 66:23-30, 2011.
- SOUTHGATE, D. A. T.; JOHNSON, I.; FENWICK, G. R. *Nutrient availability: chemical and biological aspects*. AFRC Institute of Food Research, Norwich ed., 1989. 404p.
- WAGHORN, G. C.; BALDWIN, R. L. Model of metabolite flux within mammary gland of the lactating cow. *Journal of Dairy Science*, v. 67, p. 531-544. 1984.
- WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73:1965-1979, 1990.
- WELTER, K. C. et al. Canola Oil in Lactating Dairy Cow Diets Reduces Milk Saturated Fatty Acids and Improves Its Omega-3 and Oleic Fatty Acid Content. *Plos One*, v. 11, p. 1-16, 2016.

## **CAPÍTULO 3**

### **QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE**

Ana Maria Centola Vidal, Arlindo Saran Netto, Gabriel Augusto Marques Rossi

#### **1. INTRODUÇÃO**

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química e de características físico-químicas e microbiológicas. De forma objetiva, leite de qualidade deve apresentar as seguintes características: sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes (antibióticos, pesticidas, adição de água e sujidades), reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana.

Entre todas as características relacionadas à qualidade, as características microbiológicas do leite são consideradas de fundamental importância, pois são indicativos seguros da saúde dos animais, das condições higiênicas na ordenha e da eficiência do sistema de resfriamento do leite. Podemos tratar o tema de qualidade microbiológica do leite considerando dois enfoques: condições higiênicas de produção do leite e riscos à saúde dos consumidores.

Neste capítulo será abordada a qualidade microbiológica do leite relacionada às condições higiênicas de obtenção, armazenamento e transporte. Basicamente, os microrganismos mais importantes em relação à qualidade higiênica do leite são as bactérias, enquanto vírus, bolores e leveduras têm menor importância.

O leite é considerado um alimento de excepcional valor nutritivo para o homem, em razão de seus componentes: proteína, hidratos de carbono, ácidos graxos, sais minerais, vitaminas e água. Também é um excelente meio de cultura para muitos microrganismos. A atividade de alguns microrganismos que contaminam o leite é claramente benéfica para o homem, visto que eles participam ativamente de alterações físicas, químicas e organolépticas que ocorrem no leite ao se preparar diversos derivados lácteos. Por outro lado, a

atividade microbiana incontrolada é prejudicial, podendo levar a alterações no leite tornando-o inadequado para o consumo.

Com relação às bactérias, podemos classificá-las em três categorias distintas segundo a faixa de temperatura ótima para seu crescimento e multiplicação: bactérias psicrófilas, bactérias mesófilas e bactérias termófilas. A faixa de temperatura ótima de multiplicação da microbiota psicrófila encontra-se entre 0 °C a 15 °C; a das mesófilas, entre 20 °C a 40 °C; e das termófilas, entre 44 °C e 55 °C. Além dessas, outras duas categorias de microrganismos são importantes: a psicrotrófica e a termodúrica. As bactérias psicrotróficas, por definição, são aquelas capazes de se multiplicar a baixas temperaturas (< 7 °C), independentemente da temperatura ótima de desenvolvimento. Já as termodúricas correspondem ao grupo de bactérias capazes de resistir ao processo térmico da pasteurização. Essa classificação tem grande importância prática, sendo fundamental para a compreensão das causas e das potenciais soluções para os problemas de qualidade microbiológica do leite.

Em termos gerais, a carga microbiana do leite é uma variável dependente da carga microbiana inicial e da taxa de multiplicação. A carga microbiana inicial pode ser definida como a concentração de microrganismos existentes no leite armazenado no tanque, imediatamente após o término da ordenha, e depende de alguns fatores: o primeiro diz respeito à carga microbiana do leite na própria glândula mamária, ou seja, à saúde do úbere quanto à mastite. O segundo fator está relacionado com a higiene de ordenha, mais especificamente com a limpeza e a desinfecção da superfície dos tetos.

As condições de limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha também são fundamentais e, se forem negligenciadas, podem gerar altas populações microbianas.

Por fim, cabe destacar a importância da qualidade da água utilizada tanto na lavagem dos tetos durante a ordenha como na lavagem e desinfecção do sistema de ordenha. Assim, a qualidade microbiológica do leite é dependente de um manejo adequado desde a produção até a indústria processadora.

## 2. CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DO LEITE

A taxa de contaminação e os tipos de microrganismo presentes no leite geralmente são decorrentes de diferentes fontes: o interior do úbere, o exterior do úbere e os equipamentos e utensílios utilizados pela indústria, entre outras.

No interior do úbere, mesmo que o animal esteja saudável, existem bactérias saprófitas que contaminam o leite no momento da ordenha. Essa carga microbiana original é pequena e consiste principalmente em micrococcos, que incluem estafilococos e bactérias corineformes (30% a 90%) e estreptococos (0% a 50%); mas também pode haver uma variedade de bactérias Gram-positivas, esporuladas ou não, e Gram-negativas, em taxas que geralmente não ultrapassam 10%. Se o animal estiver doente, os microrganismos podem atingir o interior do úbere por via endógena, como no caso da tuberculose e da brucelose, e contaminar o leite.

Desde o momento que sai do úbere, o leite fica exposto a contaminações externas. O leite oriundo de um animal saudável apresenta aproximadamente  $10^3$  UFC/mL; se não forem respeitadas as condições mínimas de higiene, esse número pode chegar a  $10^6$  UFC/mL. Uma das fontes mais importantes de contaminação do leite é a superfície externa dos tetos. Se estes estiverem sujos de terra, esterco, material da cama, entre outros, sua superfície pode ter uma carga microbiana de até  $10^9$  UFC/mL; porém, quando os tetos são desinfetados e secos (*pré-dipping*), esse valor pode ser reduzido consideravelmente.

As principais fontes de contaminações do leite são:

- ar do estábulo;
- pelos, pele e úbere do animal;
- mãos do ordenhador, hábitos higiênicos e de limpeza, utensílios, recipientes, água de limpeza e sistemas de obtenção e condução do leite;
- contaminação fecal.

Com extremos cuidados higiênicos, de limpeza e desinfecção, o leite recém-ordenhado apresenta pequena quantidade de microrganismos por mililitro, o que continua sendo negligenciável quantitativa e qualitativamente.

Na contaminação posterior à obtenção do leite, uma ampla zona da sistemática bacteriana pode estar representada, pois cada contaminante abriga uma população potencialmente diferente. Por exemplo, as matérias fecais apresentam microbiota contaminante das mais complexas. Junto às enterobactérias, encontram-se micrococcos, lactobacilos, leveduras e cocos. Nos alimentos, principalmente os fermentados, encontram-se esporogênicos aeróbios, lactobacilos e clostrídios. Muitos microrganismos telúricos são veiculados com resíduos de terra presentes nos alimentos. Bactérias da água, como cocos e sarcinas, além de diversas espécies de *Achromobacter*, são encontradas nos meios úmidos, recipientes não secos, etc.

À medida que os resultados das contagens iniciais aumentam, mudam completamente as proporções e os tipos de microrganismo presentes, ganhando expressão principalmente os bacilos Gram-negativos, que estarão sempre condicionados às fontes de contaminação e sua severidade.

A presença de esporos termorresistentes pode aumentar significativamente no leite de animais intensamente estabulados. No entanto, a maioria da microbiota termodúrica não se desenvolve bem no leite cru; portanto, uma contagem elevada de termodúricos é sempre um forte indicador de contaminação, principalmente, por equipamentos e ambiente.

A microbiota que se deriva da superfície do úbere e tetos está pouco definida, sendo provavelmente composta de esporos, bactérias corineformes e bacilos Gram-negativos. A principal fonte de bacilos psicrótróficos Gram-negativos é constituída por equipamentos inadequadamente limpos e desinfetados.

A incidência de coliformes e de *E. coli* no leite cru é bem documentada, principalmente pela associação com a contaminação de origem fecal e pelas alterações que seu desenvolvimento pode promover. Pelo fato de os coliformes se multiplicarem muito rapidamente em resíduos de leite e em equipamentos úmidos, constituindo-se numa das principais fontes de contaminação para o leite, fica difícil fazer uma associação entre sua presença e o indício de contaminação fecal direta. Por outro lado, contagens baixas de coliformes não significam necessariamente boa limpeza e desinfecção dos equipamentos; porém, o contrário, quando essas contagens com frequência excedem a 100

UFC/mL, é consenso que as condições higiênicas de obtenção do leite foram insatisfatórias.

Quando os ambientes de ordenha estão limpos e livres de corrente de ar, este pouco contribui para a contaminação do leite. Além disso, se a ordenha é mecânica, fica mais difícil de o leite sofrer esse tipo de contaminação. Por outro lado, se a ordenha for manual, o risco de o leite sofrer contaminação pelo ar é maior, pelo fato de ter mais contato com determinados microrganismos.

A água utilizada durante a ordenha e mesmo para a limpeza de equipamentos e utensílios deve ser de boa qualidade, pois pode servir de fonte de contaminação mesmo sendo potável. Se não for armazenada em caixas fechadas, estará sujeita à contaminação por fezes de pássaros, insetos, pó, entre outros.

No momento da ordenha, as ordenhadeiras, as tubulações, os tanques, entre outros, são importantes fontes de contaminação para o leite; portanto, as condições de higiene nesse momento devem ser asseguradas. Os microrganismos mais comuns que provêm desse material, quando mal higienizado, são bactérias lácticas e psicrotróficas, também podendo ocorrer a presença de coliformes.

A temperatura do leite quando este sai do úbere também é um fator favorável à multiplicação de microrganismos; por isso é necessário refrigerar o leite para inibir a multiplicação microbiana.

O tipo e a taxa de microbiota inicial, a temperatura e o tempo de armazenamento são parâmetros que influenciam na multiplicação dos microrganismos. Por essa razão, só é possível fazer generalização acerca das mudanças na microbiota durante o transporte e o armazenamento do leite nas indústrias. Contudo, a temperatura talvez seja o fator mais importante, pois entre 25 °C e 30 °C, a microbiota láctica e os coliformes são os microrganismos mais abundantes e, dado que a maioria das espécies dessas bactérias é mesófila, sua multiplicação é inibida pela refrigeração. Assim, a microbiota psicrotrófica encontra oportunidade de se multiplicar, prevalecendo bactérias Gram-negativas aeróbias, pois apresentam multiplicação mais rápida. Tais microrganismos não têm efeitos consideráveis, uma vez que suas populações não excedam  $10^7$  UFC/mL.

### 3. MICROBIOLOGIA DO LEITE

O leite cru em contato com o meio exterior pode ser considerado um ecossistema aberto, podendo ser contaminado por qualquer microrganismo. Nesse caso, as características do leite, a temperatura e o tempo serão as condições que determinarão quais microrganismos presentes vão se desenvolver e se sobrepor aos demais.

É sabido que o leite recém-ordenhado oferece uma resistência natural ao desenvolvimento de microrganismos. Essa ação é coadjuvada por uma série de inibidores naturais; entre eles, as imunoglobulinas específicas, que, geralmente, são encontradas em baixas concentrações no leite, porém podem atuar sobre uma ampla variedade de bactérias. A imunoglobulina M (IgM) possui ação aglutinante, atuando principalmente sobre os estreptococos e levando-os à formação de grandes flocos ou aglomerados. Esses aglomerados de estreptococos, quando o leite é submetido a resfriamento, pela separação rápida da gordura, podem ser arrastados para a camada mais superficial. Entretanto, no leite mantido à temperatura ambiente, esses aglomerados tendem a sedimentar. De qualquer modo, em grande parte são separados do leite e parcialmente privados dos substratos necessários ao seu desenvolvimento. Assim, não são destruídos, mas têm seu desenvolvimento bloqueado pelo esgotamento de nutrientes e pelo acúmulo de metabólitos inibidores. A lisozima e a lactoferrina também se apresentam em concentrações muito baixas no leite. Porém, o sistema lactoperoxidase, apesar de necessitar ser ativado, é muito atuante, principalmente contra microrganismos Gram-negativos. Além da presença de leucócitos, alguns deles têm capacidade de fagocitar microrganismos presentes.

O efeito do ambiente pode ser considerado distinto para a multiplicação, a fermentação e a esporulação. De modo geral, as condições de multiplicação são mais restritivas que as condições de fermentação. Por exemplo, as bactérias lácticas não se multiplicam em temperaturas inferiores a 5 °C, entretanto, se as demais condições forem favoráveis, são capazes de desdobrar a lactose produzindo ácido láctico.

O leite é reconhecidamente um alimento completo, na forma líquida, isto é, com grande quantidade de água (87%). Assim, muitos microrganismos

encontram nesse alimento substratos suficientes para o seu desenvolvimento (fermentação e multiplicação). O resultado é bem conhecido: o leite cru altera-se rapidamente à temperatura ambiente.

Entretanto, as bactérias que se desenvolvem no leite possuem propriedades muito distintas; a lactose não é uma fonte de energia adequada a muitas dessas espécies, outras necessitam de aminoácidos livres como fonte de nitrogênio para o seu desenvolvimento, e o leite fresco contém apenas quantidade muito limitada desses substratos. Assim, essas espécies, mesmo presentes, só começarão a se multiplicar depois que outras tenham hidrolisado proteínas.

Quando sob condições de manuseio e conservação ideais, as bactérias que predominam são as Gram-positivas. O leite cru que se encontra sob temperaturas de refrigeração por vários dias apresenta uma parte ou a totalidade das bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, bem como alguns representantes de, no mínimo, um dos gêneros de coliformes. Os microrganismos que não possuem a habilidade de multiplicar-se em baixas temperaturas habituais de armazenamento geralmente são encontrados em números muito reduzidos.

No desenvolvimento de estreptococos lácteos há a produção de CO<sub>2</sub>, que, acumulando-se no meio, estimula o crescimento de lactobacilos e é capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias Gram-negativas, além de uma série de outras situações mais específicas, tornando as variações extremamente complexas.

Por outro lado, no leite, a Aw (atividade de água) e a força iônica nunca são limitantes para o desenvolvimento bacteriano. O pH pode ser limitante apenas para uns poucos grupos de microrganismos, e o potencial de oxirredução (PO<sub>2</sub> (pressão de oxigênio)) inibe apenas o desenvolvimento de anaeróbios estritos.

O desenvolvimento tanto de aeróbios quanto de anaeróbios depende, em grande parte, de sua localização no meio. Assim, superficialmente, junto à camada de gordura, a PO<sub>2</sub> é muito maior do que no fundo do recipiente. À temperatura ambiente, uma baixa PO<sub>2</sub> e um pH baixo são condições que

tornam o meio impróprio para o desenvolvimento de um número limitado de espécies presentes no leite.

De acordo com a classificação funcional dos microrganismos mais importantes em leite, isto é, por meio da observação de seus efeitos sobre o leite e derivados, os microrganismos dividem-se em: mesófilos (bactérias lácticas, de origem fecal e esporulados), psicrotóxicos e, separadamente, como não é o enfoque deste capítulo, alguns microrganismos patogênicos.

### **3.1 Microrganismos mesófilos e seus efeitos sobre a qualidade do leite**

As bactérias mesófilas se multiplicam em temperatura ambiente (por volta de 30 °C a 35 °C), não são termodúricas e, em sua maioria, têm a falta de higiene como uma das maiores fontes de contaminação. Podem ser potencialmente patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ou ter caráter deteriorante, como as lácticas. Estas metabolizam a lactose presente no leite em ácido láctico, que, em quantidades elevadas, altera a acidez do leite por reduzir o pH a até 4,6 e promover a precipitação da caseína (coagulação); por outro lado, essa mesma propriedade é muito utilizada na indústria de laticínios, na produção de alguns derivados lácteos.

Bactérias como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias atuam intensamente na fermentação da lactose. A acidez do leite reduz drasticamente seu uso e seu valor comercial. Dessa forma, testes para aferir a acidez do leite são feitos na plataforma de recepção e podem determinar a rejeição do leite. O controle das bactérias mesófilas é bastante simples, bastando apenas que o leite seja resfriado (temperatura inferior a 10 °C) imediatamente após a ordenha.

As bactérias que realizam a fermentação são divididas em dois grupos: as bactérias homofermentadoras, que degradam os açúcares transformando-os principalmente em ácido láctico e, portanto, pelo aumento da acidez, possibilitam a coagulação das caseínas do leite; e as bactérias heterofermentadoras, que, além de ácido láctico, produzem também ácido acético, ácido succínico, álcoois e gases. Nesse último grupo, o ácido pirúvico também é um metabólito resultante da fermentação de microrganismos, proporcionando até a formação de coalhada, dependendo das condições de tempo e de temperatura. É importante manter o equilíbrio adequado das

bactérias para que o produto permaneça suficientemente ácido e aromático. A acidez torna os iogurtes alimentos relativamente estáveis por inibir a multiplicação de bactérias Gram-negativas, e o pH do produto pode variar de 3,6 a 4,2, podendo atingir pH final de até 4,5.

As **bactérias lácticas** podem ser classificadas de acordo com dois pontos de vista, opostos, já que podem se comportar como microrganismos deteriorantes ou benéficos. A ação deteriorante ocorre pela fermentação, promovendo alteração das características organolépticas. Todas as bactérias lácticas degradam a lactose. Outras bactérias, como coliformes e enterococos, não são classificadas como lácticas, mas também metabolizam a lactose quando presentes no leite.

Como efeito benéfico, as bactérias lácticas são classificadas em três ações: metabolizam lactose, produzindo ácido láctico; participam das degradações proteicas que acontecem durante a maturação; e produzem diacetilacetaldeído, a partir de citrato. Essas ações são de interesse para a indústria, pois as bactérias lácticas (culturas microbianas) são adicionadas ao leite durante seu processamento para a elaboração de diversos derivados lácteos. Por exemplo, a metabolização da lactose em ácido láctico é importante no processamento de leites fermentados; a desnaturação proteica é importante na fase de maturação de alguns queijos; e a produção de diacetil é importante no processamento da manteiga.

São bactérias lácticas:

– Lactobacilos – *L. casei*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. acidophyllus*. São constituintes da chamada microbiota láctica, isto é, são microrganismos que se desenvolvem preferencialmente no leite, tendo-o como substrato principal para seu desenvolvimento. São tão comuns quanto os estreptococos lácteos, entretanto, não são facilmente detectados no leite cru, pois são suplantados em desenvolvimento pelos estreptococos. Têm grande importância nas culturas lácticas. Em condições de acidez e temperatura mais elevadas, podem multiplicar-se juntamente com o desenvolvimento dos estreptococos lácteos ou até mesmo suplantá-los.

– Estreptococos – *St. lactis* e *St. cremoris* (principais), *St. thermophyllus* e *St. diacetylactis*. Desenvolvem-se preferencialmente no leite, são

acidificantes e predominam sobre qualquer outra espécie de microrganismo presente. São as bactérias mais comuns nas culturas ou nos fermentos lácteos. Multiplicam-se entre 10 °C a 40 °C. O *St. thermophyllus* prefere temperaturas ligeiramente superiores a 40 °C e é uma espécie muito importante na cultura do iogurte. O *St. diacetylactis* tem a característica de produzir diacetil, um metabólito aromático importante em muitos derivados lácteos que confere o aroma agradável a queijos, coalhada, manteiga, etc.

–Micrococcos – geralmente são microrganismos saprófitas originários da pele circunvizinha da glândula mamária. Pertencem ao grupo láctico, porém são suplantados pelos demais gêneros que se multiplicam mais facilmente. Também são acidificantes e parte desse grupo é termorresistente, suportando as temperaturas de pasteurização do leite. Nesse caso, são importantes na deterioração do leite pasteurizado, pois sofrem uma seleção favorável.

A presença de taxas elevadas de **bactérias fecais** no leite é um indicador de obtenção e de manipulação em condições higiênicas deficientes. Os coliformes metabolizam a lactose, produzindo, entre outras substâncias, ácido láctico e dióxido de carbono. O ácido láctico, juntamente com o que é produzido pelas bactérias lácticas, provoca aumento da acidez do leite. Portanto, os coliformes colaboram com os lactococos na alteração do leite cru por acidificação. Controla-se esse efeito com a refrigeração do leite, inibindo-se, assim, a multiplicação dos coliformes. O dióxido de carbono tem atuação importante na produção de queijos. Liberado pela intensa e ativa multiplicação dos coliformes nos primeiros dias de maturação do queijo, fica retido na massa, dando lugar à formação de grande número de pequenos buracos. Se o número de coliformes for excessivo, o gás gerado pode causar estufamento do queijo: é o que se conhece por estufamento precoce de queijos.

Quando a maturação avança, o pH terá caído para valores suficientes para inibir a multiplicação dos coliformes, de tal maneira que, depois de dois a três meses de maturação, não se detectam mais coliformes no queijo.

De outro ponto de vista, os coliformes são importantes porque algumas cepas são patogênicas, como a *Escherichia coli* enteropatogênica, podendo representar perigo para saúde do consumidor.

Também é importante a presença no leite de bactérias fecais não fermentadoras de lactose, como as do gênero *Salmonella*; porém, estas são

termolábeis, destruídas pela pasteurização, e seu isolamento em derivados lácteos indica contaminação pós-processamento térmico ou falhas no processamento térmico.

Com relação aos enterococos, o aspecto mais importante é seu caráter termodúrico, que possibilita que sobrevivam à pasteurização. Outro aspecto dos enterococos é sua capacidade de sobreviver em ampla faixa de temperatura, entre 10 °C a 45 °C, e em baixa atividade de água, por isso é possível isolá-los durante o processo de maturação de queijos (quatro a seis meses). Também são acidificantes, mas totalmente indesejáveis, pois exercem uma ação proteolítica e podem ser de origem fecal. Os representantes principais são: *E. faecalis* e *E. durans*.

Como podem indicar contaminação fecal, sua presença é tomada como sinal de condições higiênicas inadequadas, o que coloca em risco o produto obtido, pela possibilidade da coexistência de espécies patogênicas. Ainda, exercem uma ação proteolítica com o aparecimento de odor/sabor sujo e amargo. Em queijos do tipo frescal, são responsáveis pela formação de múltiplas e pequenas olhaduras (buracos), além de odor e sabor desagradáveis. São representados principalmente pela *E. coli* e pela *Enterobacter aerogenes*; entretanto, a maior preocupação quanto aos coliformes é com as espécies patogênicas (Salmonelas, Shiguelas e *E. coli* enterotoxigênica);

Pode ainda fazer parte da microbiota do leite, **bactérias esporuladas**, principalmente do gênero *Bacillus* e *Clostridium*. A importância desses esporos na indústria é principalmente relacionada à produção de leite tratado por UAT (ultra alta temperatura) e para queijos duros e semiduros. Embora esses produtos sejam submetidos a tratamentos térmicos capazes de destruir células vegetativas, os esporos continuam viáveis ou têm um período de maturação longo, que pode propiciar condições para sua germinação e atividade microbiana.

Para os queijos duros ou semiduros, os microrganismos do gênero *Clostridium* são os mais importantes, pois resistem ao processo de pasteurização e permanecem no queijo. A restrição de oxigênio no interior do queijo proporciona condições para os esporos germinarem e as células vegetativas iniciam sua multiplicação, produzindo gás como um dos produtos

resultantes de seu metabolismo. Essa produção de gás faz com que o queijo estufe. Esse processo é chamado estufamento tardio.

Vale ressaltar que nem todos os microrganismos mesófilos são fermentativos, alguns se multiplicam sem deteriorar o leite, como é o caso dos estafilococos. Outro ponto importante é que alguns microrganismos mesófilos têm a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, além de poder possuir estirpes com comportamento mesófilo e outras com comportamento psicotrófico.

Atualmente, além da prova da redutase, a contagem padrão em placas (Standard Plate Count) promove a enumeração por estimativa dos mesófilos aeróbios e facultativos viáveis, capazes de formar colônias visíveis nas condições padronizadas do método quando as placas são incubadas entre 30 °C a 32 °C.

Os principais microrganismos mesófilos capazes de formar colônias nas condições da contagem padrão em placas são:

- **Micrococcus** – *Micrococcus* e *Staphylococcus*;
- **Streptococcus** – *Enterococcus* (de origem fecal), *Streptococcus* lácticos (grupo N), *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* (sendo os três últimos decorrentes de mastite);
- **Bacilos Gram (+)** – *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Bacillus* (esporulado);
- **Bacilos Gram (-)** – *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Alcaligenes*;
- **Miscelânea**: Estreptomicetos, Leveduras e Mofos.

### **3.2 Microrganismos psicotróficos e seus efeitos sobre a qualidade do leite**

Microrganismos psicotróficos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados na água, no solo, nas plantas e nos animais. Predominam em situações em que há deficiência de higiene na ordenha, problemas de limpeza e sanitização de equipamentos de ordenha, ou mesmo quando ocorre resfriamento marginal do leite (resfriamento a temperaturas entre 5 °C a 15 °C) ou o tempo de estocagem é demasiadamente longo.

Quando a legislação vigente estabeleceu que o leite cru deveria ser refrigerado na propriedade rural, as **bactérias psicotróficas** adquiriram maior importância, pois a aplicação do frio acarretou problemas decorrentes da multiplicação desses microrganismos, pois esse grupo de bactérias, cuja característica principal é a capacidade de multiplicação em temperaturas baixas (< 7 °C), apresentam a característica de produção de enzimas que são resistentes a tratamentos térmicos. Assim, mesmo que o aquecimento elimine as bactérias psicotróficas, as enzimas que foram produzidas durante sua multiplicação continuam a agir, causando degradação de proteínas e gordura do leite. A ação das proteases e lipases de origem microbiana acarreta diversos problemas de qualidade, como redução da vida de prateleira de produtos lácteos, alteração de sabor e odor do leite, redução no rendimento industrial na fabricação de queijos e geleificação do leite longa vida.

As bactérias psicotróficas pertencem a dois grandes grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, incluídas em pelo menos 15 gêneros. As *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Serratia* spp., *Listeria* spp., *Yersinia* spp., *Lactobacillus* spp., *Flavobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e *Clostridium* spp. são as principais bactérias psicotróficas. Alguns desses microrganismos, como *Listeria*, *Yersinia* e *Bacillus*, são capazes de provocar doenças em seres humanos pela ingestão do leite cru, em condições especiais.

A maioria dos psicotróficos encontrados no leite são bastonetes Gram-negativos, sensíveis ao aquecimento. Algumas espécies Gram-positivas e termorresistentes têm sido isoladas, podendo causar a deterioração do leite e derivados pasteurizados, por causa de seu próprio desenvolvimento posterior, uma vez que, resistindo à pasteurização, sofrem uma seleção favorável ao não encontrar competidores. Entretanto, seus efeitos deteriorantes estão ligados ao potencial de desenvolvimento, não sendo relatada nenhuma enzima específica.

Psicotróficos termodúricos constituem um grupo de bactérias capazes de resistir a temperaturas similares àquelas do processo de pasteurização (72 °C a 74 °C) e possuem capacidade de multiplicação em temperaturas de 4 °C a 7 °C. Pertencem a esse grupo os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Por apresentar longo tempo de multiplicação em temperaturas baixas (de

refrigeração), essas bactérias têm menor importância quando comparadas com outros psicrótrófos, que se multiplicam rapidamente em temperaturas abaixo de 7 °C.

A maioria dos estudos realizados tem demonstrado que o gênero *Pseudomonas* é o geralmente dominante, seguido, em menor frequência mas quase sempre presentes, de organismos do tipo *Acinetobacter* – como *Achromobacter* e *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e Coli-aerógenos (*Enterobacter liquefaciens*). Outros estudos têm relacionado, ainda, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, alguns microrganismos e estreptococos, além de poucos *Bacillus*.

A deterioração de leite e derivados apresenta duas origens distintas. A primeira está relacionada com a multiplicação e a atividade metabólica de microrganismos psicrótrófos, por exemplo, *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp. e *Flavobacterium* spp. Esses microrganismos Gram-negativos, que habitualmente são lipolíticos e proteolíticos, contaminam o leite. Os agentes proteolíticos possuem a capacidade de desestabilizar as micelas de caseína e de levar a uma “coagulação doce” no leite. Todavia, a deterioração predominante manifesta-se através de odores acres e frutuosos.

A segunda é a multiplicação de bactérias resistentes ao calor, que são capazes de fermentar a lactose até se transformar em ácido láctico. Quando ocorre a queda do pH para 4,6, há a coagulação do leite. Caso estejam presentes esporos de bolores na superfície do leite azedo, estes podem germinar e proliferar-se, elevando o pH até torná-lo neutro, facilitando o crescimento de bactérias proteolíticas. Nos produtos lácteos que apresentam vida de prateleira mais longa, como é o caso do leite UAT (ultra alta temperatura), a deterioração por microrganismos psicrótrófos formadores de esporos é um grave problema. Algumas bactérias, como o *Bacillus cereus*, são capazes de resistir ao processo UAT e, em consequência da longa vida de prateleira, multiplicam-se e sintetizam toxinas, além de poder causar uma “coagulação doce” nos produtos.

As bactérias do grupo Coli-aerógenos aparecem variando de 5% a 33% da microbiota psicrótrófica, contribuindo para a deterioração proteolítica de leites de péssima qualidade estocados sob refrigeração. Altas contagens de coliformes são muito comuns em leites estocados a 30 °C, geralmente em

quantidade que supera 1,00/mL. As principais espécies citadas entre os realmente psicrotróficos são *Enterobacter liquefaciens* e *Klebsiella aerogenes*.

Entre os psicrotróficos esporulados, as cepas psicrotróficas do gênero *Bacillus* têm sido isoladas do solo e da água. Recentemente, pela manutenção do leite por longos períodos sob refrigeração, essas espécies, embora em número reduzido, têm sido encontradas.

*Bacillus coagulans* tem sido um dos mais implicados, possuindo tempo de geração de 24 horas a 30 horas a 2 °C. Outros isolados são *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. lentus*, sempre de produtos pasteurizados, considerando-se que todos eles sobrevivem ao tratamento por UAT. Alguns dados evidenciaram que as cepas citadas são variantes adaptadas de microrganismos mesófilos. Algumas das culturas produzem odor *fruitly* e rancidez no leite e, dada a sua termorresistência, revestem-se de especial importância para leite e produtos pasteurizados.

Os dois grupos de enzimas de maior importância são as proteases e lipases, incluindo fosfolipases, que, por serem produzidas extracelularmente, podem atuar diretamente sobre as micelas de caseína ou glóbulos de gordura do leite. Podem ainda atuar tanto no leite cru quanto no estocado, durante a fase de desenvolvimento dos psicrotróficos, bem como continuar agindo após o tratamento térmico, embora os microrganismos produtores sejam sensíveis à pasteurização.

Entre os psicrotróficos produtores de proteases estão principalmente as bactérias Gram-negativas, cujo maior representante é o gênero *Pseudomonas*, com a *P. fluorescens* sendo a mais comum entre as espécies. São listados como produtores de proteases: *P. fluorescens*, *P. putrefaciens*, *P. fragi*, *P. aureofaciens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Enterobacter liquefaciens*, *Escherichia freundii*, *Flavobacterium* spp., *Xantomonas* spp., *Cytophaga* sp. e *Proteus* sp.

Assim como os produtores de proteases, as espécies mais ativas na produção de lipases pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Têm sido descritas lipases extracelulares diretamente relacionadas com cepas de *P. fluorescens*, *P. fragi* e *Alcaligenes viscoaltis*.

Especificamente para fosfolipases, o gênero *Pseudomonas* é o mais implicado. Cepas de *P. fluorescens* foram descritas como produtoras de fosforilase C. O *Artobacter aerogenes* também tem sido implicado.

### Ação proteolítica

Quando em fase de crescimento exponencial em temperaturas de 4 °C, as bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam capacidade de síntese de proteases, podendo hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis. O efeito dessa proteólise é o aparecimento de sabor amargo no leite graças à presença de peptídeos com todas essas características organolépticas.

Algumas espécies de *Pseudomonas* secretam dois ou três tipos diferentes de protease. A maioria dessas proteases consiste em metaloenzimas contendo um átomo de zinco e até oito átomos de cálcio por molécula. As proteases originárias dos psicrotróficos apresentam capacidade de coagular a proteína do leite e possuem atividade hidrolítica em várias frações da caseína (kappa, beta e gama); no entanto, apresentam baixa atividade sobre as proteínas do soro. A fração proteica representada pela caseína é facilmente degradada pelas proteases dos psicrotróficos em razão de sua estrutura não helicoidal. Adicionalmente, quando o leite é refrigerado, ocorre maior dissociação das micelas de caseína, quando comparado com o leite mantido a 35 °C, e aumenta a fração de caseína solúvel, o que a torna mais susceptível a proteólise pelas enzimas de origem bacteriana.

As proteínas do soro são relativamente resistentes à ação dessas proteases, mas as frações da caseína são muito susceptíveis. Por meio do estabelecimento de algumas de suas propriedades bioquímicas, foi definido que a protease alcalina rompe as cadeias polipeptídicas após os resíduos de arginina ou lisina, com preferência para as ligações de lisina. Dessa ação resulta a hidrólise rápida da beta-caseína, dando origem às frações conhecidas como gama-caseínas e dois componentes da fração proteose-peptona: PP-5 e PP-8F. O componente PP-5 representa uma mistura dos resíduos N-terminais 1-105 e 1-107 da beta-caseína. O componente PP-8F é o fosfopeptídeo N-terminal correspondente aos resíduos 1-28, enquanto as porções 29-209, 106-209 e 108-209 correspondem, respectivamente, às frações anteriormente

denominadas gama-1, gama-2 e gama-3 caseínas. Ainda, o fragmento remanescente da beta-caseína após essa hidrólise (resíduos 29-105 E 29-107) corresponderia à fração protease-peptona, conhecida como componente “8-*slow*”.

Depois da beta-caseína, a fração alfa-S é a mais atingida. A alfa-S2-caseína é rapidamente hidrolisada, enquanto a alfa-S1 sofre um ataque muito mais lento. A fração kappa-caseína tem se mostrado a mais resistente à ação da protease alcalina. Contrariamente, a fração beta-caseína e os fragmentos produzidos a partir dessa fração proteicas não foram identificados.

É interessante verificar que, aliado a um significado prático diferenciado com respeito ao potencial hidrolítico, alguns autores sugeriram que a velocidade ou taxa de hidrólise das caseínas seja: alfa-S1 > beta >> kappa-caseína para os extratos leucocitários; beta > alfa-S1 >>> kappa-caseína para a plasmina bovina; e beta = kappa > alfa-S1 caseína para protease de *Serratia marcescens*.

Para a origem microbiana, há uma concordância de que a maioria das proteases de psicotróficos atuam preferencialmente sobre a fração kappa-caseína, seguida da beta, hidrolisada mais rapidamente que a alfa-caseína. Embora muito menos estudadas, tem-se demonstrado que as proteínas do soro são relativamente insensíveis à ação das proteases de psicotróficos.

Como essas proteases atacam de imediato e principalmente a kappa-caseína, há uma desestabilização da micela que leva à coagulação do leite, de modo semelhante ao que ocorre na coagulação enzimática ou coagulação doce. O produto da hidrólise da beta e alfa-caseínas contribuiria com a acumulação de peptídeos amargos. Consequentemente, vários autores consideram a proteólise decorrente de microrganismos psicotróficos a responsável pelos fenômenos de “gelação ou geleificação”, ou até a coagulação, além do desenvolvimento de odor/sabor sujo e amargo.

As proteases de psicotróficos atuam primariamente durante o manuseio e a estocagem refrigerada do leite, antes do tratamento térmico. Tem-se demonstrado que o desenvolvimento significativo de psicotróficos no leite cru produz níveis de proteases capazes de degradar a  $\beta$  e a k-caseína, em extensão detectável pelas provas de PAGE e SGE.

Nos casos de leite com acentuado desenvolvimento de psicrotróficos serem submetidos a tratamento por UAT e estocados a 30 °C, pode se observar o fenômeno da geleificação. Leites com menos quantidade de *Pseudomonas*, embora permaneçam líquidos por mais de 20 semanas, demonstram a formação gradual de sedimento.

Em leites apresentando geleificação, observa-se que a  $\beta$  e a k-caseína se encontram extensivamente degradadas e alguma perda de  $\alpha_{s1}$  pode ser observada. Não se tem observado a degradação de proteínas do soro, considerando-as resistentes a essas proteases.

A maioria dos trabalhos tem demonstrado que, sempre que a população de *Pseudomonas* ultrapassa  $10^4$  UFC/mL, a degradação da k-caseína é detectada, e a  $\beta$ -caseína é mais degradada que a  $\alpha$ . Algumas cepas mostram ainda a degradação de  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina. Sempre que uma degradação séria das caseínas tenha ocorrido, o leite fica predisposto à coagulação quando submetido ao tratamento térmico por UAT.

Em produtos com adição de culturas lácticas, um dos maiores problemas é a perda de matéria-prima nitrogenada com o soro quando a proteólise tenha sido intensa, repercutindo, inclusive sobre o rendimento de queijos.

Por outro lado, apesar dos efeitos adversos, parece que a ação proteolítica tem efeito estimulante sobre culturas lácticas responsáveis pela manutenção de queijos, principalmente estreptococos e lactobacilos, que requerem aminoácidos livres no meio para seu pleno desenvolvimento.

Outros defeitos citados, porém não necessariamente confirmados, são: odor/sabor sujo em *cottage cheese* e presença de sabor amargo em iogurtes.

Em resumo, a maioria dos trabalhos são consoantes em que a proteólise do leite devido a psicrotróficos é capaz de leva-lo à instabilidade, com geleificação e aparecimento de sabor/odor sujo e amargo. Muitas das proteases de psicrotróficos atuam diretamente sobre a k-caseína, resultando em desestabilização das micelas e coagulação do leite, de maneira análoga à ação da renina. A  $\beta$ -caseína é hidrolisada mais rapidamente que a  $\alpha$ -caseína, e essa hidrólise contribui para a acumulação de peptídeos amargos.

### Ação lipolítica

Os lipídeos presentes no leite encontram-se na forma globular, envoltos por uma camada composta de proteínas, fosfolipídeos, glicolipídeos, esteróis e glicerídeos. Dessa forma, para que as enzimas lipolíticas tenham acesso ao interior do glóbulo de gordura do leite, é necessário que haja o rompimento dessa membrana, o que pode ocorrer por ação mecânica ou enzimática de fosfolipases e glicosidases.

As fosfolipases de origem microbiana podem, assim, hidrolisar os fosfolipídeos da membrana do glóbulo de gordura e, conseqüentemente, aumentar a capacidade lipolítica das lipases sobre os triglicerídeos. O resultado da ação das lipases dos psicotróficos sobre os triglicerídeos é a formação de ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, resultando em altos níveis de ácido butírico e caproico. A presença de ácidos graxos livres como resultado da ação de lipases causa o aparecimento do sabor rançoso no leite e seus derivados, em especial quando esses ácidos são de cadeia curta (menos de 12 carbonos). Quando há taxas excessivas de ácidos graxos livres de baixo peso molecular, particularmente ácido butírico, aparecem os sinais típicos de rancificação hidrolítica.

O leite cru normalmente apresenta alguma atividade lipolítica oriunda de ação de lipases nativas que atuam espontaneamente. Sua ação varia de acordo com o grau de agitação a o que leite tenha sido submetido durante a obtenção e transporte. Entretanto, vários trabalhos têm relatado o aumento de “FFA –*free fatty acids*” em leite cru estocado, em que a microbiota psicotrófica tenha tido razoável multiplicação.

Quando o ácido butírico e outros ácidos graxos saponificáveis de cadeia média são degradados na gordura do leite, fortes odores podem se desenvolver, caracterizando ação lipolítica e rancidez, principalmente em queijos. A baixa incidência de rancidez induzida por bactérias é provavelmente em razão da inacessibilidade dos triglicerídeos às lipases, fazendo que no leite tratado por UAT, diferentemente da ação proteolítica, não haja referências específicas a alta concentrações de ácido graxo livres, mesmo com altas contagens de psicotróficos.

Poucas também são as informações sobre o efeito das lipases de psicotróficos no creme e na manteiga. A decomposição superficial da

manteiga parece estar diretamente relacionada com seu conteúdo de psicrotróficos, principalmente das *Pseudomonas*.

Alguns autores estimam que 80% das lipases de *Pseudomonas* desenvolvidas no leite sejam encontradas no creme e na manteiga, podendo levar à rancidez desta após dois dias, aparentemente por causa dessas lipases.

Queijos feitos com leites pré-cultivados com psicrotróficos lipolíticos frequentemente mostram taxa anormal muito alta de FFA, em decorrência da ação residual de lipases termorresistentes. Vários queijos finos têm sido citados como sujeitos a odores e sabores ranços e anormais graças ao desenvolvimento de psicrotróficos ou à sobrevivência térmica de lipases.

O odor ou sabor ranço tem sido associado à concentração de FFA, sendo de três a dez vezes maior do que os controles feitos com leites sem psicrotróficos. Alguns dados recentes têm mostrado que, em leites estocados por 48 horas a 6 °C, 29% a 100% dos psicrotróficos presentes são lipolíticos, enquanto em outro trabalho sobre a flora psicrotrófica apenas 1% a 10% foram lipolíticos, evidenciando microbiotas regionais distintas.

Como outros microrganismos, alguns psicrotróficos têm a capacidade de produzir fosfolipases, principalmente a fosfolipase C, à qual se atribui uma variedade de defeitos de odor e sabor, como: amargor, sabor sujo, odor frutífero, azedo, etc.

Sugere-se que as fosfolipases extracelulares, oriundas de psicrotróficos que tenham se desenvolvido no leite, possuam o potencial para exacerbar o problema de rancidez pela atuação sobre os fosfolipídeos das membranas dos glóbulos de gordura, que, então, tornariam expostos os triglicerídeos, sobre os quais as lipases agora podem agir, tanto as lipases nativas quanto as dos próprios psicrotróficos.

A presença de bactérias psicrotróficas são um problema para a indústria, e a única maneira de evitá-la baseia-se em: obtenção higiênica de leite, resfriamento imediato do leite (atingir 4 °C em 2 horas) e manutenção dessa temperatura durante as 48 horas de armazenamento, limpeza e higienização de equipamentos e utensílios usados na obtenção, armazenamento, transporte e indústria. Outra alternativa é realizar a

termização do leite para manter as populações de bactérias psicotróficas as mais baixas possíveis.

### 3.3 Microrganismos patogênicos

Além dos pontos já mencionados, as condições microbiológicas inadequadas do leite podem apresentar risco à saúde pública pela ação de **bactérias patogênicas**, especialmente quando o leite é consumido cru. A possibilidade de um indivíduo contrair salmonelose é 158 vezes maior ao consumir leite cru em relação ao pasteurizado.

Tradicionalmente, o leite cru pode transmitir doenças como tuberculose, brucelose, difteria, febre Q e uma série de gastroenterites. No entanto, nos últimos anos, alguns surtos de salmonelose, colibaciloses, listerioses, campilobacterioses, micobacterioses e iersinioses têm despertado a atenção dos pesquisadores, o que levou à classificação das bactérias patogênicas como causadoras de doenças emergentes. Os principais agentes emergentes são *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O27:H20 enterotoxigênica e *Streptococcus zooepidemicus*. Atualmente, alguns pesquisadores acreditam que o *Mycobacterium paratuberculosis* esteja relacionado com a doença de Crohn em humanos, e há também suspeitas de que esse microrganismo possa ser resistente à pasteurização.

De modo geral, os microrganismos patogênicos não sintetizam expressivamente as enzimas responsáveis pelas alterações nas características organolépticas e na composição do leite e, por isso, não causam comprometimento aparente da qualidade industrial e do tempo de prateleira dos produtos lácteos. Por esse motivo, a presença desses microrganismos no leite pode, muitas vezes, ser subestimada ou passar despercebida, o que é um fator gravíssimo se analisado do ponto de vista da saúde pública.

## 4. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, A. K.; SIGHAL, O. P. Effect of heat resistant micro-organisms on the fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage. *Journal of Dairy Science*, v. 45, n. 5, p. 272-277, May, 1992.

- ANDREWS, A. T.; ALICHANIDIS, E. Proteolysis of casein and the proteose-peptone fraction of bovine Milk. *Journal of Dairy Research*, 50: 275, 1983.
- ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 58, p. 440-446, 2006.
- CHAMPAGNE, C. P. et al. Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.
- CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw Milk. *The Australian Journal of dairy Technology*, 51: 59-63, 1996.
- COUSIN, M. A. Presence and activity psychrotrophic microorganisms in Milk and dairy products. *Journal of Food Protection*, 45: 172, 1982.
- COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw Milk. In: ROBINSON, R. K. (Ed.) *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk*. v. 1. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119-63.
- COX, J. M. The significance of psychrotrophic pseudomonas in dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 48, n. 2, p. 108-112, 2001.
- FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.
- KAPLAN, M. M.; ABDUSSALAM, M.; BIJLENGA, G. Enfermidades transmitidas por la leche. In: *Higiene de la leche*. Ginebra: OMS, 1966.
- McKELLER, R.C. *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. 310 p.
- MEER, R. R. et al. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal Food Prot.*, v. 54, p. 969-979, 1991.
- ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de Alimentos. Alimentos de Origem Animal*. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.
- PRATA, L. F. *Fundamentos de Ciência do Leite*. Jabotical: FUNEP, 2001. 128 p.
- RODAS, M. A. de B. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 3, p. 304-309, 2001.
- ROBINSON, R. K. Microbiologia lactológica. Zaragoza: Acribia, 1987.
- SHAH, N. P. Psychrotrophs in Milk: a review. *Milchwissenschaft*, 49: 432-4377, 1994.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, n. 8, p. 35-41, 1997.

STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research*, 53: 481, 1986.

THOMAS, S.B. Sources, incidence and significance of psychrotrophic bacteria in Milk. *Milchwissenschaft*, 21: 270, 1966.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997.

## **CAPÍTULO 4**

### **ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE LEITE**

Carlos Eduardo Gamero Aguilar, Arlindo Saran Netto, Ana Maria Centola  
Vidal

Diversos são os ensaios analíticos que objetivam verificar a qualidade do leite e seus derivados. A variação natural na concentração de componentes do leite e atitudes fraudulentas resultam, cada vez mais, em um número maior de análises. Apresentamos, a seguir, os principais ensaios analíticos para verificar a qualidade da matéria-prima que será processada e posteriormente encaminhada ao mercado consumidor.

#### **1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

As análises físico-químicas descritas a seguir são indicadas para leite cru e pasteurizado. A Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2011) delimita os parâmetros de cada análise a fim de prover produtos seguros e de qualidade. Em sua maioria, são obrigatórias para que o descarregamento do leite cru seja efetivado.

##### **1.1 Teste do alizarol**

###### **Fundamentação da técnica**

O teste do alizarol é uma prova rápida, muito empregada nas plataformas de recepção como indicador de pH e de estabilidade térmica do leite. Consiste na adição de um indicador de pH (alizarina) à solução de álcool etílico, que indica a estabilidade térmica da matéria-prima simulando os efeitos da pasteurização.

###### **Material necessário**

- Solução de alizarol a 2%;
- Tubos de ensaio ou acidímetro de Salut;
- Pipeta graduada de 10 mL.

### **Procedimento**

Adicionar ao tubo de ensaio, ou ao acidímetro de Salut, 2 mL de leite. Acrescentar 2 mL de solução de alizarol. Agitar. Observar a coloração formada e possível presença de grumos ou coagulação. Proceder à interpretação dos resultados:

- 1) Leite normal: coloração vermelho-tijolo, sem precipitados.
- 2) Leite ácido: coloração amarelada e presença de precipitados.
- 3) Leite instável: coloração vermelho-tijolo, e presença de precipitados.
- 4) Leite alcalino: coloração violeta, sem precipitados,

### **Informação importante**

Diversos são os gêneros de bactérias presentes no leite. Entretanto, um grupo denominado mesofílico, que possui temperatura ótima de multiplicação em torno de 37 °C, utiliza a lactose como substrato energético, devolvendo ao meio ácido láctico, responsável pela acidificação do leite e consequente coloração amarela no supracitado teste. Outro grupo de importância e que pode acarretar na rejeição do leite são os psicotróficos, que se multiplicam em temperaturas de refrigeração. Apesar de esse grupo bacteriano não acidificar o leite, pois não utiliza a lactose como substrato energético, as enzimas proteolíticas secretadas por eles desestabilizam porções proteicas, culminando em instabilidade proteica com a formação de precipitados na prova do alizarol.

Em diversos países onde o leite possui uma qualidade microbiológica satisfatória, a prova do alizarol não é mais utilizada. Porém, no Brasil, tal prova deve ser utilizada com bastante critério, visto que variações na estabilidade do leite associadas à estação do ano, à dieta e ao estágio da lactação podem interferir nessa metodologia. Assim, comumente são encontradas amostras de leite de boa qualidade resultando positivamente nessa prova. Amostras de leite contendo colostro, de fim de lactação ou provenientes de tecidos mamários inflamados, podem culminar com resultados positivos na prova do alizarol.

## 1.2. Teste do álcool

### Fundamentação da técnica

O teste do álcool é um ensaio muito utilizado nas plataformas de recepção como um indicador de estabilidade térmica do leite. Consiste na adição de álcool etílico na mesma proporção de leite. Este atua como um agente desidratante, indicando a estabilidade térmica da matéria-prima e simulando os efeitos da pasteurização.

**Tabela 1.** Relação entre a acidez com a precipitação de grumos.

| PRECIPITAÇÃO    | ACIDEZ             |
|-----------------|--------------------|
| Coagulação      | $\geq 22$ °Dornic  |
| Coagulação fina | De 19 a 20 °Dornic |
| Sem coagulação  | $< 19$ °Dornic     |

### Material necessário

- Álcool, concentração mínima de 72°;
- Tubos de ensaio;
- Pipeta graduada de 10 mL.

### Procedimento

Adicionar ao tubo de ensaio 2 mL de leite. Acrescentar 2 mL de álcool na concentração mínima de 72°. Agitar. Observar a possível presença de precipitados ou coagulação. Proceder à interpretação dos resultados:

- 1) Leite normal: sem precipitados.
- 2) Leite instável: presença de precipitados.

### Informação importante

Igualmente ao alizarol, dois grupos bacterianos são importantes no teste do álcool: mesófilos e psicrotróficos. Com o advento da refrigeração e estocagem do leite na propriedade rural, a multiplicação das bactérias mesofílicas diminuiu consideravelmente. Salvo ocasiões em que a obtenção do leite não é realizada de forma higiênica, os psicrotróficos tornaram-se um dos principais problemas microbiológicos, visto que esse grupo bacteriano se multiplica em temperaturas de refrigeração. Além da capacidade de

multiplicação, secretam enzimas proteolíticas extracelulares, responsáveis pela desestabilização da caseína e consequente formação de precipitados na mencionada prova.

É de se esperar que os resultados obtidos na prova do álcool sejam semelhantes aos obtidos na prova do alizarol, visto que o primeiro avalia apenas um parâmetro (estabilidade térmica), e o segundo, dois parâmetros (acidez e estabilidade térmica).

### **1.3 pH**

#### **Fundamentação da técnica**

O pH do leite recém-ordenhado de vacas sadias varia entre 6,2 a 6,8. Por meio do pH, pode-se indicar possíveis problemas higiênico-sanitários na origem do leite.

Em leites oriundos de glândulas mamárias com infecção, o pH pode chegar a 7,5. Quando na presença de colostro, pode cair a 6,0.

#### **Material necessário**

- Amostras de leite;
- pHmetro;
- Soluções de calibração;
- Béquer de 50 mL;
- Pipeta graduada de 20 mL.

#### **Procedimento**

Calibrar o pHmetro com as soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. Inserir no béquer de análise 20 mL da amostra de leite e o sensor. Iniciar a leitura. O valor do pH poderá ser visualizado, após a estabilização, no visor do equipamento.

#### **Informação importante**

Em situações de higiene deficiente na ordenha e ausência de resfriamento do leite, o grupo bacteriano predominante é o mesofílico. Nessas

condições, tais bactérias possuem a capacidade de fermentar a lactose, principal açúcar do leite, produzindo ácido láctico, o que resulta em um aumento da acidez do leite.

Por outro lado, leites alcalinos poderão ser decorrentes da adição fraudulenta de substâncias alcalinas visando à neutralização de ácidos formados, resultante da hidrólise da lactose.

#### **1.4 Acidez do leite**

##### **Fundamentação da técnica**

No teste da acidez titulável, uma substância alcalina (NaOH) é usada para neutralizar o ácido do leite. Uma substância indicadora de pH, a fenolftaleína, é utilizada para mostrar a quantidade do álcali que foi necessária para neutralizar o ácido do leite. O indicador permanece incolor quando misturado com uma substância ácida, mas adquire coloração rosa em meio alcalino. Portanto, o álcali é adicionado ao leite até que este adquirira a coloração rósea. Cada 0,1 mL da solução de hidróxido de sódio gasto no teste corresponde a 1 °D (Dornic) ou 0,1 g de ácido láctico/L.

##### **Material necessário**

- Erlenmeyer de 125 mL;
- Solução de fenolftaleína 1%;
- Bureta de 25 mL e suporte com garra;
- Solução Dornic (solução de hidróxido de sódio a 1/9 N);
- Proveta de 20 mL;
- Pipeta de 1 mL.

##### **Procedimento**

Adicionar 10 mL de leite no Erlenmeyer. Inserir quatro a cinco gotas de fenolftaleína ao leite e agitar. Titular a amostra agitando-a com a solução Dornic até obter coloração constante ligeiramente rosa. Verificar a quantidade de solução Dornic que foi gasta. Esta corresponde ao grau de acidez do leite.

## **Informação importante**

A aferição da acidez do leite é uma das medidas mais constantemente utilizadas no controle da matéria-prima pelos laticínios, visto que a acidez tende a sensibilizar as caseínas propiciando a sua coagulação. Assim, de acordo com a acidez encontrada na matéria-prima, os laticínios a utilizam para a fabricação de determinado produto.

O leite recém-ordenhado normal não contém concentrações elevadas de ácido láctico. Entretanto, apresenta uma acidez detectável pela técnica da titulação. Isso indica que a substância química usada no teste da determinação na titulação se associa com algumas substâncias naturais presentes no leite fresco, conferindo uma acidez aparente. Substâncias como os fosfatos, citratos, a caseína, a albumina e o gás carbônico dissolvido podem conferir tal acidez aparente ao leite fresco.

É importante ressaltar que o termo “acidez aparente” não deve ser confundido com a acidez decorrente da produção de ácido láctico por bactérias mesofílicas (acidez real ou verdadeira). Amostras de leite com acidez titulável mais elevadas (dentro da faixa de normalidade) podem apresentar teores de proteicos e minerais maiores do que aquelas com acidez titulável menor. Por isso, o resultado do teste de acidez titulável pode variar de 14 °D a 18 °D.

Uma das principais causas de leite ácido é a hidrólise da lactose ocasionada por microrganismos mesofílicos, com consequente liberação de ácido láctico. Entretanto, outras causas podem promover o aumento da acidez, como colostro e fatores nutricionais. Em relação a leites alcalinos, alguns itens devem ser observados. Leite fraudado com água, vacas com mastites e resíduos de sanitizante, entre outros, tendem a ter o pH aumentado.

## **1.5 Crioscopia**

### **Fundamentação da técnica**

A temperatura de congelamento do leite (também conhecida como índice crioscópico ou crioscopia do leite) é um importante parâmetro analítico utilizado para determinar a qualidade física do leite. O crioscópio afere a temperatura exata de congelamento, que está diretamente ligada à presença de lactose e cloretos.

### **Material necessário**

- Crioscópio;
- Vidro para teste;
- Amostras de leite;
- Pipeta graduada de 5 mL.

### **Procedimento**

Transferir 2,5 mL da amostra de leite para o vidro de teste do crioscópio. Inserir o vidro contendo a amostra no orifício de resfriamento e acionar para baixo a alça do equipamento até que encaixe. Após o sinal sonoro, efetuar a leitura do índice crioscópico no *display* do aparelho. Levantar a aça e limpar o sensor com lenço de papel.

### **Informação importante**

A temperatura de congelamento do leite é inferior à da água, podendo variar de  $-0,530$  °Horvet a  $-0,550$  °Horvet (equivalentes a  $-0,512$  °C e a  $-0,531$  °C, respectivamente). Com base nessa informação, e sabendo que o ponto de congelamento da água é de  $0$  °C, fraudes por adição de água tendem a aproximar o ponto de congelamento do leite ao da água, ou seja, acima  $-0,512$  °C (tendendo a  $0$  °C).

## **1.6 Densidade**

### **Fundamentação da técnica**

A imersão de um termolactodensímetro com massa constante no leite provoca deslocamento de uma quantidade deste, que é, em volume, igual ao do densímetro utilizado e, em massa, proporcional à densidade da amostra. Esse deslocamento faz o líquido alcançar um valor na escala graduada em graus densitométricos.

Assim, a densidade do leite é uma média da densidade de todos os seus componentes. Naturalmente, oscila de  $1,028$  g/mL a  $1,034$  g/mL em razão da variação da quantidade de cada componente nas diferentes raças bovinas e de outros aspectos que podem interferir na densidade do leite. Tal índice é de suma importância graças à possibilidade de identificar possíveis fraudes.

O leite é mais denso que a água por causa da maior densidade de seus componentes, como pode ser visto na tabela 2.

**Tabela 2.** Densidade dos componentes presentes no leite.

| <b>Componentes</b>          | <b>g/mL</b> |
|-----------------------------|-------------|
| Água                        | 1,000       |
| Gordura                     | 0,930       |
| Proteínas                   | 1,346       |
| Lactose                     | 1,666       |
| Sais Minerais               | 4,120       |
| Cinzas                      | 5,500       |
| Extrato seco desengordurado | 1,608       |

### **Material necessário**

- Termolactodensímetro;
- Proveta de 500 mL;
- Amostras de leite.

### **Procedimento**

Adicionar 500 mL de leite a 15 °C na proveta. Caso não esteja na temperatura anteriormente mencionada, será necessário fazer a correção indicada a seguir.. Inserir o termolactodensímetro na forma vertical. Após 1 a 2 minutos, proceder à leitura da temperatura e da densidade no próprio termolactodensímetro.

Observar a temperatura sempre que possível e fazer a leitura da densidade a 15 °C. Pode-se fazer a correção para 15 °C acrescentando à leitura 0,0002 °C para cada grau acima de 15 °C ou subtraindo 0,0002 °C para cada grau abaixo. Outra forma de correção é a utilização de tabelas de conversão que relacionam a densidade com a temperatura. É inadequada a realização de leitura de densidade em amostras com temperatura inferior a 10 °C ou superior a 20 °C.

### **Informação importante**

A aferição da densidade do leite é uma importante ferramenta que visa principalmente à identificação de atitudes fraudulentas. Quando é adicionada água ao leite, a densidade da matéria-prima tende a se aproximar à da água.

Um aspecto a ressaltar é que a gordura possui densidade de 0,930 g/cm<sup>3</sup>. Assim, no caso de fraudes por desnate de leite, a densidade tende a aumentar.

## **1.7 Determinação de lípidios pelo método de GERBER**

### **Fundamentação da técnica**

A gordura presente no leite encontra-se na forma de pequenos glóbulos suspensos na água. O princípio da técnica baseia-se na quebra da emulsão do leite por meio da inserção de ácido sulfúrico e posterior utilização de uma substância desemulsificante, como o álcool amílico. Tal análise é realizada em uma vidraria específica graduada, denominada butirômetro de Gerber, no qual, por meio da diferença de densidade entre a água e a gordura, se observa a concentração de lipídeos do leite.

### **Material necessário**

- Solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) densidade de 1,820 °C a 1,825 a 20 °C;
- Álcool isoamílico (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O) densidade de 0,81 °C a 20 °C;
- Butirômetro de Gerber para leite;
- Medidores automáticos de 1 mL e 10 mL;
- Pipeta volumétrica de 11 mL;
- Centrífuga de Gerber;
- Banho-maria com temperatura de 65 °C (com variação de 2 °C acima ou abaixo).

### **Procedimento**

Adicionar ao butirômetro 10 mL da solução de ácido sulfúrico. Transferir 11 mL de leite homogeneizado para o butirômetro lentamente e pela parede deste, para evitar sua mistura com o ácido. Acrescentar 1 mL de álcool isoamílico. Limpar as bordas do butirômetro com papel toalha e fechar com rolha apropriada. Envolver o butirômetro em um pano, colocando o bulbo maior na palma da mão de forma que o dedo polegar exerça pressão sobre a tampa, impedindo sua projeção. Agitá-lo, de modo a promover completa dissolução da caseína no interior do aparelho, tomando precauções para evitar acidentes e mantendo o polegar sobre a tampa. Levar o butirômetro ao banho-maria de 3 a

5 minutos à temperatura de 65 °C a 70 °C. Centrifugar, com as rolhas para baixo, de 800 rpm a 1.200 rpm durante 3 a 5 minutos. Após esse procedimento, fazer coincidir a parte inferior da camada de gordura com a leitura zero da escala. Para isso, retira-se ou introduz-se a rolha. Cada divisão da escala do butirômetro será correspondente a 0,1% de gordura. A leitura deverá ser feita na parte inferior do menisco e dará diretamente a porcentagem de gordura.

### **Informação importante**

Leite oriundo de vacas Jersey possuem maiores concentrações de lipídeos do que o de vacas holandesas, por exemplo. Em relação a fatores nutricionais, o teor de gordura diminui à medida que a quantidade de concentrado na dieta se eleva. O aumento de concentrados eleva a produção de ácidos, resultando na redução do pH ruminal. Em pH menor do que 6,0, a degradação das fibras é prejudicada, diminuindo assim a produção de ácido acético, principal precursor da gordura no leite, e ocasionando, por fim, uma queda na concentração dessa na matéria-prima. No que se refere à estação do ano, vacas submetidas a estresse térmico tendem a perder mais CO<sub>2</sub> pela respiração do que a produção deste, culminando em um abaixamento da pressão de CO<sub>2</sub> e conseqüente aumento do pH sanguíneo. Tal aumento eleva a perda renal de substâncias alcalinas, visando promover o equilíbrio do pH próximo à neutralidade. A redução do CO<sub>2</sub> e dessas substâncias alcalinas perdidas via renal afeta a reserva tamponante da saliva, resultando em um menor pH ruminal, o que afeta a degradação das fibras e diminui a quantidade do principal precursor da gordura, o ácido acético.

A metodologia descrita não pode ser realizada para produtos desnatados, visto a concentração baixa de gordura disponível neles.

## **1.8 Nitrogênio total (proteína) –método de micro-Kjeldahl**

### **Fundamentação da técnica**

Baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação, com liberação de amônia, que é fixada em solução ácida e titulada. Para expressar

os resultados em porcentagem (%) de proteínas, a porcentagem do nitrogênio total deverá ser multiplicada por um fator específico.

### **Material necessário**

- Bloco digestor e destilador micro-Kjeldahl;
- Balança analítica.
- Tubo de Kjeldahl de 100 mL;
- Buretas de 25 mL ou 50 mL;
- Frasco de Erlenmeyer de 125 mL ou 250 mL;
- Espátula;
- Papel de pesagem (papel vegetal livre de nitrogênio);
- Pipeta graduada de 1 mL e 10 mL ou material volumétrico similar;
- Provetas de 50 mL ou material volumétrico similar;
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) p.a.;
- Indicador misto: pesar 0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol. Dissolver em 200 mL de solução de álcool etílico a 70% (v/v). Filtrar se necessário e guardar em frasco âmbar. O indicador misto pode ser incorporado à solução de ácido bórico a 4% (m/v) na proporção de 8 mL/L;
- Mistura catalítica:
  - a) Sulfato de potássio p.a., sulfato de sódio anidro p.a. ou bissulfato de potássio p.a.;
  - b) Sulfato de cobre penta-hidratado p.a..Misturar (a) e (b) na proporção de (10 : 1), triturando em gral de porcelana até obter um pó fino.
- Solução de ácido bórico a 4% (m/v);
- Solução de hidróxido de sódio a 50% (m/v);
- Solução padrão de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução padrão de ácido clorídrico 0,1 N.

### **Procedimento**

A presente metodologia é dividida em três etapas.

#### *1) Digestão da amostra*

Em balança analítica, colocar 2 mL da amostra e transferir para o tubo de Kjeldahl. Adicionar 2,5 g de mistura catalítica, previamente feita, e 7 mL de

ácido sulfúrico p.a. Aqueça em bloco digestor, a princípio lentamente, mantendo a temperatura de 50 °C, por uma hora (a etapa de digestão pode variar de acordo com a marca e o modelo do bloco digestor; recomenda-se verificar as instruções do fabricante). Em seguida, eleva-se a temperatura gradativamente até que atinja 400 °C. No momento em que o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, retirar do aquecimento. Deixá-lo esfriar e adicionar 10 mL de água. Caso o produto a ser analisado tenha alta concentração de lipídeos, recomenda-se o uso de antiespumantes (talco, parafina ou silicone).

## 2) Destilação da amostra

Acoplar ao destilador um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% com 4 ou 5 gotas de solução de indicador misto. Adaptar o tubo de Kjeldahl ao destilador e adicionar a solução de hidróxido de sódio a 50%, até que esta se torne enegrecida (cerca de 20 mL). Proceder à destilação coletando cerca de 100 mL do destilado. A solução receptora deve ser mantida fria durante a destilação.

## 3) Titulação

Titular com solução de ácido sulfúrico 0,1 N, ou solução de ácido clorídrico 0,1 N até a viragem do indicador.

O resultado final será expresso por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Nitrogênio Total} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{m}$$

em que:

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

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

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

$m$  = massa da amostra, em gramas.

O método de Kjeldahl quantifica o nitrogênio total da amostra. Para que seja obtido o teor em proteínas, aplica-se um fator chamado fator de conversão Kjeldahl, resultando na seguinte equação:

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ nitrogênio total} \times \text{FCK (Fator de Conversão de Kjeldahl)}$$

FCK = Fator de conversão da relação nitrogênio/proteína = 6,38 para o leite.

### **Informação importante**

Antes de iniciar o trabalho, deve-se verificar as condições do aparelho de destilação com solução-padrão de um sal de amônio, cuja recuperação deve ser de no mínimo 99,5% em nitrogênio, conforme procedimento descrito na IU do destilador.

Como verificado, a metodologia descrita anteriormente torna-se trabalhosa quando a análise é feita rotineiramente. Grande parte dos laticínios utiliza equipamentos eletrônicos que fazem a leitura de proteínas e outros componentes do leite rapidamente, dispensando o uso de metodologias laboriosas.

A estratégia que visa ao aumento do teor proteico no leite tem como fundamento fornecer aminoácidos essenciais na glândula mamária. Entretanto, apenas um aminoácido limitante pode comprometer toda a cadeia proteica. Caso tal aminoácido seja suprido, outro pode se tornar limitante, comprometendo novamente o atendimento pleno para a formação proteica. Diante dos muitos aminoácidos conhecidos, é extremamente difícil o incremento proteico por meio do fornecimento deles no leite. Visto a dificuldade de incremento proteico via alimentação, são realizadas seleções genéticas e de raças com esse intuito. Igualmente à gordura, a proteína possui maior concentração no gado Jersey do que no holandês, por exemplo.

Assim como na gordura, o estresse térmico também pode alterar a concentração proteica no leite, porém não drasticamente.

## 1.9 Extrato seco total

### 1.9.1 Fórmula de Fleishmann

#### Fundamentação da técnica

Um dos métodos mais comumente utilizado para aferir tal variável baseia-se na aplicação da fórmula de Fleishmann, utilizando-se a relação que existe entre a densidade e a percentagem de gordura no leite.

#### Material necessário

- Percentagem de gordura da amostra;
- Densidade da amostra.

#### Procedimento

Aplicar a seguinte fórmula, em que G é a gordura e D, a densidade da amostra:

$$\frac{(1,2 \times G) + (2,665 \times 100) \times D - 100}{D}$$

Formula prática:

$$\frac{G}{5} + \frac{D}{4} + G + 0,26 = \% \text{ Extrato seco Total}$$

Salienta-se que para utilização desta fórmula na densidade são desprezados os dois primeiros algarismos. Por exemplo: na densidade 1,031, considera-se, por exemplo, somente 31.

### 1.9.2 Disco de Ackermann

#### Fundamentação da técnica

Consiste em dois discos com raios diferentes, sobrepostos e unidos pelo centro. O disco menor expressa o resultado de densidade e o disco maior expressa o valor de gordura. Uma metodologia simples e rápida, em que o valor do extrato seco total é determinado fazendo-se coincidir os resultados de gordura e densidade.

### **Material necessário**

- Porcentagem de gordura da amostra;
- Densidade da amostra;
- Disco de Ackermann.

### **Procedimento**

Sobrepor o disco menor (densidade) ao disco maior (gordura) e efetuar a leitura do Extrato Seco Total.

### **Informação importante**

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias. A água constitui, em volume, o principal componente do leite, em torno de 87%. Os outros 13% restantes de matéria seca total compreendem a gordura, a proteína, a lactose e sais minerais.

## **1.10 Extrato seco desengordurado**

### **Fundamentação da técnica**

O extrato seco desengordurado representa a diferença entre o extrato seco total e a gordura presente no leite.

### **Material necessário**

- Porcentagem de gordura da amostra;
- Densidade da amostra.

### **Procedimento**

Aplicar a seguinte fórmula, em que G é a gordura e D, a densidade da amostra:

$$\frac{(1,2 \times G) + (2,665 \times 100) \times D - 100}{D} - G = \text{Extrato Seco Desengordurado}$$

ou

$$\text{Extrato Seco Desengordurado (ESD)} = \text{Extrato Seco Total (EST)} - \text{Gordura}$$

## **Informação importante**

A determinação de sólidos totais e desengordurados é de grande importância nos cálculos de rendimento industrial de derivados do leite, como queijos, leites desidratados, iogurtes, etc. O EST e o ESD são a base da manufatura desses derivados.

Como mencionado, o EST é toda a parcela sólida do leite (gordura, proteína, lactose, sais minerais e vitaminas). Assim, varia de acordo com a concentração de cada constituinte que o compõe. Por exemplo, leite oriundos de vacas leiteiras da raça holandesa tendem a ter um EST menor do que o de vaca da raça Jersey, visto que a primeira produz um leite com menores teores de gordura e proteína.

### **1.11 Peroxidase em leite**

#### **Fundamentação da técnica**

A pesquisa da peroxidase é feita por meio da adição de peróxido de hidrogênio e guaiacol à amostra de leite. A peroxidase, ao hidrolisar o peróxido de hidrogênio, libera oxigênio, que transformará o guaiacol da sua leucobase para a forma corada.

#### **Material necessário**

- Solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% (v/v);
- Solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v);
- Tubo de ensaio e estante para tubos;
- Pipetas graduadas de 2 mL e 10 mL;
- Banho-maria a 45 °C.

#### **Procedimento**

Inserir 10 mL da amostra de leite para um tubo de ensaio. Para fins de ativação da enzima, aquecer a amostra em banho-maria a 45 °C por 5 minutos. Adicionar 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1% ao tubo de ensaio, pelas suas paredes, seguindo-se a adição de 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

Aguarde no mínimo 5 minutos para a leitura da análise; o desenvolvimento de coloração salmão é considerado positivo para a presença da enzima peroxidase.

### **Informação importante**

Durante o processo de pasteurização rápida, ocorre no leite um aquecimento (72 °C a 75 °C), seguido por resfriamento (4 °C). Nessa temperatura, a enzima peroxidase permanece ativa, sua inativação ocorre a 80 °C, e deve estar presente, portanto, no leite pasteurizado.

Em caso de resultado negativo, deve-se analisar cuidadosamente a matéria-prima, visto que esta pode ter sofrido um sobreaquecimento com o objetivo de mascarar um produto de baixa qualidade. Assim, o leite cru e o pasteurizado devem apresentar teste positivo para peroxidase, enquanto o UAT deve ser negativo.

## **1.12 Fosfatase alcalina em leite**

### **Fundamentação da técnica**

A atividade enzimática pode ser verificada adicionando-se um substrato específico que, quando ela está presente, resulta na liberação de compostos que conferem coloração à amostra.

### **Material necessário**

- 0,2 g de sulfato de cobre penta-hidratado;
- 0,150 g de 2,6-dicloroquinona cloroimida;
- 50 mL de álcool etílico p.a.;
- 0,5 g de fenilfosfato dissódico di-hidratado;
- 46,89 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) p.a.;
- 37,17 g de bicarbonato de sódio;
- Balão volumétrico de 1.000 mL;
- Tubo de ensaio e estante para tubos;
- Pipetas graduadas de 2 mL e 10 mL;
- Banho-maria a 40 °C (com variação de 1 °C acima ou abaixo).

## **Procedimento**

*Preparo do catalisador:* dissolver 0,2 g de sulfato de cobre penta-hidratado p.a. em 100 mL de água.

*Solução reagente:* pesar 0,150 g de 2,6-dicloroquinona cloroimida p.a. e dissolver em 50 mL de álcool etílico p.a. Transferir para frasco âmbar e estocar em geladeira. Utilizar no máximo em duas semanas.

*Substrato:* em um béquer, pesar 0,5 g de fenilfosfato dissódico di-hidratado p.a. Dissolver com o tampão carbonato diluído e transferir para balão volumétrico de 500 mL. Completar o volume com o mesmo tampão.

*Tampão carbonato:*

- *Estoque:* pesar 46,89 g de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) p.a. e 37,17 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a. Dissolver em água e transferir para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume.

- *Solução de uso:* retirar uma alíquota de 25 mL da solução-estoque e transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume. O pH desse tampão diluído situa-se entre 9,5 e 9,7.

Adicionar em um tubo de ensaio, 0,5 mL da amostra. Transferir 5 mL do substrato e tampar. Agitar ligeiramente e levar ao banho-maria mantido a 39 °C -41 °C durante 20 minutos. Esfriar o tubo de ensaio em água corrente. Adicionar 6 gotas de solução reagente e 2 gotas do catalisador. Levar o tubo novamente ao banho-maria a 39 °C-41 °C por 5 minutos. Proceder a leitura do teste.

O teste da fosfatase alcalina é qualitativo, ou seja, positivo ou negativo. Considera-se positivo quando há aparecimento de coloração azul intensa e negativo com o aparecimento de coloração cinza.

## **Informação importante**

Desnaturada em temperaturas próximas a 70 °C, a fosfatase alcalina está sempre presente no leite cru. Quanto este é tratado termicamente através dos processos de pasteurização, a fosfatase alcalina é eliminada. Assim, quando o leite cru é analisado, o resultado esperado é positivo, pois ele ainda não sofreu nenhum tipo de processamento térmico. Após a pasteurização, o leite deve apresentar teste negativo para a enzima. Os derivados lácteos que apresentem um teste negativo para fosfatase alcalina são considerados

pasteurizados e próprios para o consumo. Um resultado positivo pode significar que não foi alcançada uma temperatura adequada. Assim, no leite UAT, o teste não é realizado rotineiramente, pois a temperatura para esse tratamento atinge 140 °C, inativando a enzima.

### **1.13 Teste da redutase**

#### **Fundamentação da técnica**

É um método simples para estimar a quantidade de bactérias presente no leite. A amostra de leite é misturada com uma substância indicadora do potencial de oxirredução, resazurina ou azul de metileno. Quando incubadas a temperatura de 37 °C, essas substâncias perdem a coloração como resultado de redução por causa da multiplicação bacteriana. O tempo de redução é inversamente proporcional à quantidade de bactérias presentes na amostra de leite no início da incubação, ou seja, quanto maior a população bacteriana na amostra, mais rapidamente ocasionará a redução da substância indicadora, tornando-a incolor.

#### **Material necessário**

- Tubos de ensaio;
- Pipetas graduadas de 1 mL e 20 mL;
- Banho-maria a 37 °C;
- Solução de azul de metileno.

#### **Procedimento**

##### *Preparo da solução de azul de metileno*

Colocar 1,1 g de azul de metileno em 500 mL de água destilada estéril e armazenar a solução obtida refrigerada em vidro escuro. Transfira 1 mL dessa solução para um frasco contendo 39 mL de água destilada estéril e aquecer a 100 °C por alguns minutos.

Inserir 10 mL de leite em um tubo de ensaio. Adicionar 1 mL da solução de azul de metileno. Fechar e misturar. Deixar em banho-maria a 37 °C. Verificar o tempo decorrido desde a mistura do leite com o corante até o

descoloramento completo. Proceder à leitura dos resultados de acordo com a tabela 3.

**Tabela 3.** Relação entre o tempo de descoloração e a quantidade de microrganismos presente no leite.

| <b>Tempo de descoloração</b> | <b>No. De microrganismos</b> | <b>Qualidade do leite</b> |
|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| > 4 h 30 min                 | < 500.000                    | Boa                       |
| 2 h a 4 h 30 min             | 500.000 a 4.000.000          | Aceitável                 |
| 20 min a 2 h                 | 4.000.000 a 20.000.000       | Ruim                      |
| < 20 min                     | > 20.000.000                 | Péssima                   |

### **Informação importante**

Pelo fato de o leite ser mantido em temperatura de refrigeração na propriedade rural e transportado em caminhões isotérmicos, é de se esperar que o grupo bacteriano predominante, caso procedimentos de boas práticas forem adotados na ordenha, seja de bactérias que têm a capacidade de se multiplicar nessas temperaturas, denominadas de psicotróficas. Tal grupo possui, juntamente com o grupo de bactérias termodúricas, atividade redutora menor do que a das mesofílicas. Assim, apesar de padronizado o tempo *versus* populações microbianas, o teste da redutase deve ser interpretado com cautela.

Caso o leite analisado possua resíduos de antimicrobianos, o resultado do teste também será alterado, já que o antibiótico age nas bactérias presentes na amostra.

## **2. PESQUISA DE FRAUDES**

### **2.1 Teor de cloretos**

#### **Fundamentação da técnica**

Quando presentes na amostra, os íons cloretos reagem com nitrato de prata com conseqüente formação de cloreto de prata. O excesso de nitrato de prata reage com o indicador (cromato de potássio) para formar um precipitado de coloração marrom. Assim, quando o teor de cloretos está dentro da faixa normal do leite, a quantidade de nitrato de prata adicionada é excessiva, reagindo com o indicador para a produção de coloração marrom. Todavia,

quando o teor de cloretos está acima do normal, há uma menor quantidade de prata disponível para reagir com o indicador, resultando em uma menor quantidade de precipitado, ocasionando uma intensidade de coloração menos aparente. Em suma, quanto maior a concentração de cloretos na amostra, menor a intensidade da coloração.

### **Material necessário**

- Solução de cromato de potássio ( $K_2CrO_4$ ) a 5% (m/v);
- Solução de nitrato de prata ( $AgNO_3$ ) 0,1 N;
- Tubo de ensaio e estante para tubos;
- Pipetas graduadas de 1,5 mL e 10 mL.

### **Procedimento**

Em tubo de ensaio, inserir 10 mL de leite. Adicionar 0,5 mL de solução de cromato de potássio a 5% e 4,5 mL de solução de nitrato de prata 0,1 N e agitar.

O teste de cloretos é qualitativo, ou seja, positivo ou negativo.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: coloração marrom com precipitados.
- 2) Leite com cloretos: surgimento de coloração amarelada.

### **Informação importante**

O teste da presença de cloretos deve ser interpretado com cautela. Um resultado positivo não significa obrigatoriamente fraude por adição de cloretos ao leite com o intuito de correção de crioscopia em decorrência da aguagem. Pode apenas significar que a concentração de cloretos é superior à quantidade fisiológica encontrada em animais (0,08% a 0,1%). Diversos fatores podem influenciar na quantidade de cloretos no leite, entre eles diferenças individuais, alimentação, estado de hidratação, raça, espécie, número de lactações, variações diurnas, estágio de lactação, sazonalidade, além de alterações patológicas. Ainda, com o avanço do período de lactação ou na fase precoce da lactação, a presença de cloreto também pode se elevar.

No caso de mastites, por causa do aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos e da destruição dos sistemas de bombeamento iônico, o teor de íons cloretos no leite é superior ao fisiológico.

## **2.2 Álcool etílico**

### **Fundamentação da técnica**

Quando há álcool etílico em meio ácido ocorre a redução do cromo<sup>+6</sup> a cromo<sup>+3</sup>, modificando a coloração da solução sulfocrômica. Assim, acidifica-se o meio com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e verifica-se o resultado.

### **Material necessário**

- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);
- Dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>);
- Kitasato de 500 mL, com rolha para vedação da abertura superior;
- Pipeta graduada de 10 mL;
- Pipeta Pasteur;
- Proveta de 100 mL;
- Tubo de ensaio;
- Tubo de silicone ou látex.
- Placa aquecedora;
- Amostra de leite.

### **Procedimento**

Dissolver 1,15 g de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) em 10 mL de água, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Medir 100 mL da amostra de leite e transferir para o kitasato. Adicionar 3 mL de antiespumante e misturar. Transferir para um tubo de ensaio 2 mL da solução sulfocrômica e mergulhar nessa solução a extremidade da pipeta Pasteur acoplada ao kitasato por um tubo de silicone ou látex, de modo a formar um sistema fechado. Aquecer a amostra contida no kitasato mantendo em fervura por 5 minutos. Proceder a leitura.

## **Resultado**

- 1) Leite normal: coloração da solução sulfocrômica inalterada.
- 2) Leite com álcool etílico: surgimento de coloração de tonalidade verde.

## **Informação importante**

A análise da presença de álcool etílico em amostras de leite é fundamental, visto que, quando constatada, é considerada uma ação fraudulenta. Quando há adição de água ao leite, o índice crioscópico deste é alterado, conforme visto anteriormente. Com o intuito de corrigir a crioscopia, é adicionado álcool etílico, pois este possui temperatura de congelamento inferior à do leite e à da água, equilibrando o índice crioscópico.

## **2.3 Amido**

### **Fundamentação da técnica**

O amido é um polímero da glicose, sendo um importante material de reserva de energia das plantas. É constituído por dois polímeros: a amilose, que possui estrutura helicoidal, e a amilopectina. Quando aquecida, a cadeia helicoidal da molécula de amido é aberta, o que possibilita a adsorção do iodo à amilose. O complexo formado possui coloração azul característica após resfriamento.

### **Material necessário**

- Solução de lugol;
- Tubos de ensaio;
- Pipeta graduada de 10 mL;
- Banho-maria a 100 °C.

### **Procedimento**

O teste do amido pode ser realizado para leite fluído ou leite desidratado (deve ser reconstituído pesando-se entre 1,0 g e 1,3 g, com adição de 10 mL de água). Transferir 10 mL de leite fluído ou leite reconstituído para um tubo de ensaio. Promover o aquecimento até a ebulição em banho-maria e deixar por 5

minutos. Esfriar em água corrente. Adicionar duas gotas de solução de lugol e observar a coloração produzida.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: sem alteração de coloração.
- 2) Leite com amido: coloração azulada.

### **Informação importante**

O amido não é um constituinte natural do leite, sendo sua presença neste considerada um ato fraudulento. Por ser uma substância de baixo custo, o uso do amido tem por objetivo corrigir a densidade do leite, quando este também é fraudado com água. Salienta-se que tal teste é qualitativo, sendo o resultado expresso de modo positivo ou negativo.

## **2.4 Sacarose**

### **Fundamentação da técnica**

Os açúcares, em meio ácido, sofrem desidratação produzindo furfurais, os quais se condensam com fenóis, por exemplo, a resorcinol. Como resultado dessa reação, aparece uma coloração avermelhada.

### **Material necessário**

- Ácido clorídrico (HCl);
- Resorcina ( $C_6H_6O_2$ );
- Tubo de ensaio;
- Pipetas graduadas de 10 mL;
- Espátula;
- Banho-maria.

### **Procedimento**

Adicionar 10 mL de leite em um tubo de ensaio. Inserir 1 mL de ácido clorídrico concentrado e 0,1 g de resorcina. Agitar e aquecer em banho-maria

por 5 minutos. Na presença de sacarose, aparecerá imediatamente um composto de coloração rósea.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: sem imediata alteração.
- 2) Leite com sacarose: imediato surgimento de coloração rósea.

### **Informação importante**

Caso a coloração rósea aparecer posteriormente, mas não imediatamente, o teste deverá ser desconsiderado, pois o resultado será devido à hidrólise da lactose. Tal ensaio analítico é qualitativo, portanto é detectada a presença ou a ausência da substância no leite.

A presença de sacarose no leite é considerada fraude. Geralmente é utilizada pelos fraudadores para corrigir a densidade do leite quando este é misturado com água visando aumentar o volume do produto.

## **2.5 Formaldeído**

### **2.5.1 Metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

#### **Fundamentação da técnica**

A análise é realizada em duas etapas. A primeira consiste em separar o formaldeído do leite por destilação. Na segunda etapa, o formaldeído é aquecido com ácido cromotrópico em presença de ácido sulfúrico, originando um produto de condensação que, depois de oxidado, se transforma em um composto p-quinoidal de coloração violeta.

#### **Material necessário**

- Balão de fundo redondo de 1.000 mL com junção esmerilhada;
- Condensador de LIEBIG ou de GRAHAM com junta esmerilhada;
- Joelho adaptador para condensador com extremidades esmerilhadas;
- Erlenmeyer de 125 mL;

- Pipeta graduada de 5 mL;
- Provetas de 25 mL e 200 mL;
- Tubos de ensaio;
- Ácido fosfórico p.a.;
- Solução de ácido cromotrópico sal dissódico di-hidratado a 0,5% (m/v) em solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v);
- Solução de formaldeído a 37% na diluição de 1.000 vezes.
- Banho-maria a 100 °C;
- Manta de aquecimento ou bico de Bunsen.

### **Procedimento**

Transferir 100 mL de leite homogeneizado para o balão de destilação juntamente com 100 mL a 150 mL de água. Acidificar o meio com 2 mL de ácido fosfórico p.a. Destilar lentamente recolhendo cerca de 50 mL de destilado. Em tubo de ensaio, adicionar 5 mL de solução de ácido cromotrópico a 0,5% a 1 mL de destilado. Colocar em banho-maria fervente durante 15 minutos e proceder a leitura dos resultados.

É importante proceder à análise acima com um controle negativo (100 mL de água) e um controle positivo (adicionar 500 µL da solução-estoque em 100 mL de água).

### **Resultado**

- 1) Leite normal: qualquer coloração, exceto violeta.
- 2) Leite com formol: coloração violeta, cuja intensidade é proporcional à quantidade da substância presente na amostra.

### **2.5.2 Outras metodologias**

#### **Material necessário**

- Tubos de ensaio;
- Pipetas graduadas de 2 mL e 5 mL;
- Pera de sucção;
- Ácido Sulfúrico 50%;

- Percloroeto de ferro 2%;
- Banho-maria a 100°C.

### **Procedimento**

Adicionar 5 mL de leite em um tubo de ensaio. Acrescentar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado a 50% a 1 mL de percloroeto de ferro a 2%. Aquecer a mistura até a ebulição. Proceder à leitura analisando a coloração.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: coloração amarela.
- 2) Leite com formol: coloração violeta.

### **Informação importante**

O formaldeído não é um componente natural a ser encontrado no leite. Portanto, constatando-se a presença dele no leite, é indicativo de fraude. Os fraudadores utilizam esse tipo de produto visando à conservação do leite, visto que inibe a multiplicação bacteriana. O consumo crônico de alimentos contendo formaldeído pode causar neoplasias, motivo pelo qual diversos produtos têm sofrido análises rigorosas com o objetivo de coibir a presença dessa substância neles.

## **2.6 Hipoclorito de sódio**

### **Fundamentação da técnica**

A adição de iodeto de potássio ao leite promoverá desenvolvimento de coloração alaranjada em presença de hipoclorito em decorrência da liberação de iodo.

### **Material necessário**

- Iodeto de potássio 10% (m/v) SR (conservar sob refrigeração);
- Pipeta graduada de 1 mL;

- Tubo de ensaio;
- Suporte para tubo de ensaio.

### **Procedimento**

Misturar no tubo de ensaio partes iguais (1 mL) de leite e de iodeto de potássio 10%. Proceder com a agitação do tubo e observar a coloração formada imediatamente.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: sem alteração imediata.
- 2) Leite com formol: imediato aparecimento de coloração alaranjada.

### **Informação importante**

O hipoclorito, igualmente ao formaldeído, não é um componente natural a ser encontrado no leite. Portanto, constatada a presença dele no leite, é indicativo de fraude. Os fraudadores utilizam esse tipo de produto visando à conservação do leite, visto que inibe a multiplicação bacteriana.

## **2.7 Peróxido de hidrogênio**

### **Fundamentação da técnica**

A detecção de peróxido de hidrogênio no leite é obtida por meio do aparecimento de uma coloração salmão em presença de guaiacol. A enzima peroxidase, que é encontrada naturalmente no leite, degrada o peróxido de hidrogênio, oxidando o indicador a tetraguaiacol, responsável pela coloração característica.

### **Material necessário**

- Solução hidroalcoólica de guaiacol a 1%;
- Tubo de ensaio;
- Estante para tubo de ensaio;
- Pipetas graduadas de 2 mL e 10 mL;

- Termômetro com divisão de pelo menos 1 °C;
- Banho-maria a 35 °C (com variação de 2 °C acima ou abaixo).

### **Procedimento**

*Preparação da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1%:* Adicionar 1 mL de guaiacol em um béquer de 50 mL. Colocar 10 mL de álcool etílico p.a. e agitar para dissolver. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água. Guardar em frasco âmbar.

Transferir 10 mL da amostra para um tubo de ensaio e aquecê-lo em banho-maria a 35 °C (com variação de 2 °C acima ou abaixo) por 5 minutos. Adicionar 2 mL da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1 % e 2 mL de leite cru. Agitar. O teste é qualitativo e o resultado é expresso como positivo (desenvolvimento de coloração salmão) ou negativo.

### **Resultado**

- 1) Leite normal: sem alteração de coloração.
- 2) Leite com peróxido de hidrogênio: coloração salmão.

### **Informação importante**

O peróxido de hidrogênio é adicionado de forma fraudulenta ao leite com o objetivo de prevenir a multiplicação de microrganismos. Esses microrganismos provocam a hidrólise da lactose com consequente produção de ácido láctico. O aumento da acidez, por sua vez, acarreta a precipitação da caseína, tornando-o impróprio para o processamento.

O resultado para a presença do peróxido de hidrogênio deve ser negativo para todos os tipos de leite. A grande limitação dessa análise é que o peróxido de hidrogênio se decompõe em água e oxigênio, resultando em negatização do teste. Esse fato reduz a chance de detecção da fraude no leite pela adição desse composto com o passar do tempo e, principalmente, após o tratamento térmico.

## **2.8 Pesquisa de substâncias alcalinas**

### **2.8.1 Método ácido rosólico**

#### **Fundamentação da técnica**

O ácido rosólico é um indicador de pH que, em presença de substâncias alcalinas, resulta na obtenção de uma coloração vermelho-rosa.

#### **Material necessário**

- Pipeta graduada de 5 mL;
- Pipeta graduada de 10 mL;
- Tubo de ensaio;
- Conta-gotas;
- Álcool etílico neutralizado;
- Ácido rosólico 2% (m/v) em álcool etílico neutralizado.

#### **Procedimento**

Adicionar 5 mL da amostra de leite em um tubo de ensaio. Transferir 10 mL de álcool etílico neutralizado para o mesmo tubo. agitá-lo e adicionar 2 gotas da solução de ácido rosólico 2% em álcool etílico neutralizado. Proceder à leitura do resultado.

#### **Resultado**

- 1) Leite normal: coloração alaranjada.
- 2) Leite com neutralizante de acidez: coloração vermelho-rosa.

#### **Informação importante**

Os neutralizantes são substâncias usualmente adicionadas ao leite de forma fraudulenta, pois mascaram a acidez produzida pelos microrganismos por causa da fermentação da lactose com resultante produção de ácido láctico. Os principais neutralizantes usados são os carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos.

## 2.8.2 Método fenolftaleína

### Fundamentação da técnica

A fenolftaleína é um dos indicadores de pH mais utilizados em análises laboratoriais de lácteos. A presença de substâncias alcalinas é revelada por meio do seu uso após uma neutralização com hidróxido de sódio e reacidificação com ácido sulfúrico.

### Material necessário

- Solução alcoólica de fenolftaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) a 1% (m/v);
- Solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0,025 N;
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N.
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Pipeta graduada de 2 mL e 10 mL;
- Bureta de 10 mL ou 25 mL, suporte e agarrador;
- Tripé e tela de amianto;
- Bico de Bunsen;
- Banho de gelo.

### Procedimento

Adicionar 11 mL da amostra de leite em um erlenmeyer de 250 mL. Inserir 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titular com a solução de hidróxido de sódio 0,1 N até a obtenção de coloração rósea persistente. Reacidificar com 1 mL de solução de ácido sulfúrico 0,025 N e aquecer até a ebulição, esfriando rapidamente em banho de gelo. Adicionar 2 mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Proceder à leitura do resultado. A coloração rósea indica a presença de neutralizantes de acidez, como o carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) e o bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ).

### Resultado

Leite com neutralizante de acidez: coloração rosa.

### **Informação importante**

O teste de neutralizantes de acidez é qualitativo, ou seja, seu resultado é expresso como positivo ou negativo. Sempre é esperado negativo para todos os tipos de leite, isto é, não deve apresentar adição de agentes neutralizantes da acidez.

## **3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS**

As metodologias dos ensaios microbiológicos que seguem descritas foram preconizadas para a análise de leite cru e leite pasteurizado, em atendimento à Instrução Normativa n. 62/2011 do MAPA — algumas são obrigatórias para a autorização do descarregamento do leite nos laticínios; outras são realizadas para monitoramento rotineiro.

### **3.1 Contagem bacteriana total –CITÔMETROS**

Os equipamentos mais comumente utilizados nos laboratórios de controle da qualidade de leite baseiam-se na mensuração de pulsos eletrônicos após a emissão de fluorescência com base na incidência de uma fonte de radiação *laser* em um marcador intercalado no DNA. A intensidade e a altura dos pulsos de fluorescência são gravadas e utilizadas como parâmetros seletivos. Os pulsos selecionados são traduzidos em contagens. Assim, para o funcionamento da análise eletrônica por citometria de fluxo, é necessário o uso de um corante, a exemplo do corante fluorescente brometo de etídio, para a coloração do DNA celular. Além do corante, é preciso um fluido carreador para levar as células coradas fluorescentes através do *flow cell*. Em razão da presença do corante fluorescente, cada célula que passa pelo feixe de *laser* produz curta “emissão” de luz, a qual passa por uma série de filtros e lentes que focalizam em comprimentos de onda apropriados. O pulso de luz é contabilizado, ampliado e filtrado eletronicamente por tamanho para a determinação das células. O computador acoplado ao instrumento reconhece os pulsos elétricos como células. É realizada uma transformação estatística dos resultados no próprio equipamento, convertendo os resultados de contagem bacteriana individual (CBI) em unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de uma equação de regressão.

### **Material necessário**

- Amostra de leite em frasco estéril com azidiol,
- Citômetro de fluxo.

### **Procedimento**

Após a coleta da amostra em frasco estéril, que contém uma substância bacteriostática chamada azidiol — com o intuito de não permitir a multiplicação bacteriana —, essa amostra é enviada a um laboratório dotado de equipamento adequado. No laboratório, ela é inserida no trilho do citômetro, com sua tampa removida, e inicia-se a análise pelo equipamento, que emite o resultado em poucos segundos em seu monitor.

### **Informação importante**

A quantificação bacteriana do leite cru auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha e armazenamento na propriedade rural e, ao mesmo tempo, permite inferir os prováveis efeitos adversos sobre o rendimento industrial e a segurança alimentar do leite. É de fundamental importância o monitoramento frequente dessa variável a fim de obter uma melhoria contínua de qualidade. É sabido que os tratamentos térmicos convencionais eliminam a microbiota patogênica do leite, exceto formas esporuladas, que podem se tornar infectantes novamente caso condições favoráveis sejam fornecidas a elas. Além disso, enzimas e toxinas termorresistentes, que são liberadas pelas bactérias antes do processamento do leite, continuam viáveis, podendo acarretar perigos à saúde de quem o consumir. Assim, a contagem bacteriana total serve de ferramenta para direcionamento de trabalho no campo, orientando os técnicos a solucionar problemas em produtores específicos.

### **3.2 Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos**

A contagem de microrganismos mesófilos é amplamente utilizada em laboratórios de controle de qualidade de leite, visto que pode indicar deficiências higiênicas na obtenção da matéria-prima, no seu processamento inadequado, na manipulação inadequada do produto ou em sua manutenção em condições impróprias.

## **Fundamentação da técnica**

Baseia-se na semeadura da amostra de leite em profundidade de ágar padrão para contagem e posterior incubação deste em temperatura de 36 °C (com variação de 1 °C acima ou abaixo) por 48 horas.

## **Material necessário**

- Agar padrão para contagem (PCA);
- Solução salina peptonada 0,1%;
- Balança semianalítica;
- Banho-maria regulado para 46 °C a 48 °C;
- Homogeneizador de amostras e diluições;
- Estufa de incubação regulada para 36 °C (com variação de 1 °C acima ou abaixo);
- Contador de colônias;
- Espátulas de inox;
- Pipeta graduada de 1 mL e 25 mL;
- Tubos de ensaio;
- Placas de Petri.

## **Procedimento**

Inicialmente devem ser realizadas as diluições em série da amostra. A diluição  $10^{-1}$  poderá ser realizada adicionando-se 25 g ou 25 mL em 225 mL de água peptonada. Proceder à homogeneização da amostra por aproximadamente 60 segundos. Após o processo, 1 mL da diluição  $10^{-1}$  deve ser transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, resultando em uma diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até atingir a diluição desejada.

Transfira 1 mL da amostra e/ou das suas diluições em placas de Petri esterilizadas. Adicione cerca de 15 mL de ágar padrão para contagem fundido e mantido em banho-maria a 46 °C a 48 °C nas placas de Petri. Homogeneizar o ágar com o inóculo durante 15 segundos. Aguardar até que o ágar solidifique e incubar as placas a 36 °C (com variação de 1 °C acima ou abaixo) por 48 horas.

Após a incubação, realizar a contagem de todas as colônias presentes nas placas, que devem conter entre 25 e 250 colônias. O resultado deverá ser multiplicado pelo fator de diluição e expresso em UFC/g ou mL.

### **Informação importante**

A contagem padrão em placas (CPP) foi um dos primeiros métodos utilizados para caracterizar a qualidade microbiológica do leite. Apesar de ser um método antigo, ainda hoje é reconhecido como o método de referência.

As diluições das amostras deverão ser feitas de acordo com o grau de contaminação esperado do produto, ou seja, produtos que tenham a possibilidade de albergar maiores quantidades de microrganismos devem ter mais diluições realizadas com o objetivo de encontrar uma placa viável para contagem.

### **3.3 Número mais provável (NMP)**

#### **Fundamentação da técnica**

O método do Número Mais Provável permite calcular o número de um microrganismo específico em uma amostra de leite, por meio da relação do número de tubos positivos/tubos negativos com uma tabela, denominada Hoskins. Essa técnica é amplamente utilizada para verificar as populações de enterobactérias, cuja presença é indicadora de condições higiênico-sanitárias de obtenção e processamento do produto.

#### **Material necessário**

- Caldo lauril sulfato triptose;
- Caldo bile verde brilhante 2%;
- Caldo *Escherichia coli*;
- Solução salina peptonada 0,1%;
- Balança semianalítica;
- Estufa de incubação regulada para 35 °C;
- Estufa de incubação regulada para 45,5 °C;
- Alça de níquel-cromo;
- Pipeta graduada de 1 mL e 10 mL;

- Tubos de ensaio;
- Tubos de Durham.

## **Procedimento**

A metodologia do número mais provável é dividida em três etapas.

### *1ª etapa: Teste presuntivo*

Adicionar 25 mL de leite em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%. Homogeneizar e incubar a amostra por 24 horas a 37 °C. Continuar as diluições seriadas. Transferir 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, resultando em uma diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até atingir a diluição desejada, no caso  $10^{-3}$ . A partir dessas diluições, deve ser inoculado 1 mL, respectivamente, em três tubos de caldo lauril sulfato triptose com tubo de Durham invertido. Incubar a 35 °C por 24 a 48 horas e proceder à leitura. Serão considerados positivos apenas aqueles tubos que revelaram multiplicação bacteriana e produção de gás no interior do tubo.

### *2ª etapa: Teste confirmatório/Coliformes totais*

Dos tubos considerados positivos, no teste presuntivo, transferir com auxílio de uma alça de níquel-cromo uma alçada da cultura para tubos correspondentes contendo caldo lactose – bile verde brilhante – a 2% e tubo de Durham invertido. Incubar a 35 °C por 24 a 48 horas. Serão considerados positivos os tubos que revelaram a presença de multiplicação bacteriana e produção de gás. O resultado final será obtido ao se comparar os números de tubos positivos com os dados da tabela de Hoskins, considerando sempre três diluições consecutivas a partir da maior diluição com três tubos positivos.

### *3ª etapa: Coliformes a 45 °C/Termotolerantes*

Os tubos de caldo lauril sulfato triptose que forem considerados positivos no teste presuntivo para coliformes totais deverão ser inoculados em tubos correspondentes contendo caldo *Escherichia coli* (Caldo EC) e tubo de Durham invertido. A incubação deverá ser realizada em banho-maria a 45,5 °C (com variação de 0,2 °C acima ou abaixo) por 24 horas (podendo ter variação de 2 horas a mais ou a menos), e os tubos que apresentarem multiplicação bacteriana e produção de gás serão considerados positivos. O resultado final

será obtido ao se comparar os números de tubos positivos com os dados da tabela de Hoskins, considerando sempre três diluições consecutivas a partir da maior diluição com três tubos positivos.

### **Informação importante**

A legislação brasileira que determina a quantidade máxima de coliformes a 30 °C a 35 °C e coliformes a 45 °C é a Instrução Normativa n. 62. Imediatamente após a pasteurização, os leites pasteurizados devem apresentar coliformes a 30 °C a 35 °C menor que 0,3 NMP/mL. Em relação a coliformes a 45 °C, para leites pasteurizados, os resultados devem ser, obrigatoriamente, negativos.

### **3.4 *Salmonella* spp.**

As salmonelas ocupam uma posição de destaque entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), e os produtos lácteos ainda são um dos mais importantes veículos de sua transmissão, sendo os queijos frescos e/ou artesanais os que apresentam maiores perigos de causar a enfermidade. A contaminação destes por esse agente tem sido atribuída, principalmente, ao consumo de leite e derivados lácteos sem tratamentos térmicos e/ou com deficiências nesses processos, ou ainda contaminações pós-processamento. Apresentamos a seguir a metodologia clássica para isolamento do gênero.

### **Material necessário**

- Água peptonada tamponada a 0,1%;
- Caldo Rappaport-Vassiliads;
- Caldo selenito;
- Novobiocina;
- Ágar verde brilhante;
- Ágar Mac Conkey;
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI);
- Ágar lisina ferro (LIA);
- Ágar Lúria Bertani (LB);
- Estufa bacteriológica a 37 °C;

- Proveta de 250 mL;
- Pipeta graduada de 2 mL e 20 mL;
- Alça de níquel-cromo.

### **Procedimento**

Adicionar 25 mL de leite em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%. Homogeneizar e incubar por 24 horas a 37 °C. Continuar as diluições seriadas. Transferir 1 mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada, resultando em uma diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até atingir a diluição desejada. Decorrido o período, alíquotas de 2 mL da cultura pré-enriquecida deverão ser repassadas para tubos contendo 20 mL de caldo selenito, acrescidos de solução de novobiocina (0,004%) e 0,2 mL para tubos contendo 20 mL de caldo Rappaport-Vassiliads, também acrescido de solução de novobiocina (0,004%). Incubar a 37 °C por 24 horas. Após o procedimento, com o auxílio da alça de níquel-cromo, as culturas devem ser semeadas em placas contendo ágar verde brilhante e ágar Mac Conkey. Incubar a 37 °C por 24 horas. Decorrido o período, verificar a presença de colônias sugestivas do gênero *Salmonella* nas placas. As colônias bacterianas que exibirem crescimentos compatíveis com o gênero *Salmonella*, devem ser transferidas para o ágar tríplice açúcar ferro (TSI) inclinado e ágar lisina ferro (LIA) inclinado e incubadas a 37 °C por 24 horas. As colônias que apresentarem características sugestivas do gênero *Salmonella* devem ser semeadas em ágar Lúria Bertani (LB) e posteriormente incubadas a 37 °C por mais 24 horas.

### **Informação importante**

Outro problema recorrente de contaminação por *Salmonella* spp. é o fator humano, em especial com a falta de higiene na manipulação dos alimentos, visto que as salmonelas têm o trato intestinal do homem e de animais como *habitat* natural. Portanto, procedimentos visando à boa prática de manipulação são necessários, principalmente para os profissionais que trabalham na área alimentícia, visando minimizar os riscos de transmissão de patógenos por alimentos manipulados.

A legislação que determina a quantidade aceitável de microrganismos em leite expressa a obrigatoriedade de ausência de *Salmonella* spp. em 25 g da amostra. Assim, o resultado negativo deve ser expresso como “ausência”.

#### **4. CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

A microscopia direta é o método de referência para a determinação da contagem de células somáticas em leite cru. Tal método foi descrito inicialmente por Prescott e Breed (1910). Apesar de ser uma metodologia com mais de um século de utilização, ainda é atual, já que é a referência para a calibração de novos métodos. Entretanto, por ser um método laborioso, é inviável utilizá-lo quando se possui um grande número de amostras. Nesse caso, utilizam-se contadores eletrônicos, como os citômetros.

##### **4.1 Método de contagem eletrônica**

###### **Fundamentação da técnica**

Na análise realizada por meio de citometria de fluxo, uma alíquota da amostra é coletada pelo instrumento, aquecida a 67 °C e levada a uma seringa contendo brometo de etídeo, que serve de corante. Em seguida, 50 µL da amostra são carreadas até o *cell* por um líquido carreador, no qual ocorre a incidência de raio *laser* sobre essa amostra. Os núcleos corados emitem fluorescência, que passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de ondas apropriados e é captada como pulso elétrico. Esse pulso é ampliado, filtrado eletronicamente e convertido em contagem de células somáticas.

###### **Material necessário**

- Amostra de leite em frasco estéril com componente bactericida;
- Citômetro de fluxo.

###### **Procedimento**

Após a coleta em frasco estéril, que contém uma substância bactericida, como o bronopol, a amostra é enviada a um dos laboratórios da Rede

Brasileira de Qualidade do Leite. Após a chegada da amostra, é feito o alinhamento no trilho do citômetro, a tampa da amostra é removida e inicia-se a análise pelo equipamento, que emite o resultado em poucos segundos em seu monitor.

### **Informação importante**

Internacionalmente aceita, a contagem de células somáticas é uma das medidas para a determinação da qualidade do leite. Níveis altos dessas células estão diretamente relacionados com a ocorrência de mastite, o que resulta na redução da produção leiteira e em alterações na composição do leite. Embora a infecção na glândula mamária seja o fator mais importante que ocasiona o aumento da quantidade de células somáticas no leite, há outros fatores que também podem alterar a contagem de células somáticas, como diferenças entre rebanhos e raças, ordem de parto, estações do ano, estresse térmico e estágio de lactação.

## **4.2 Microscopia direta**

### **Fundamentação da técnica**

Baseia-se em determinado volume de leite em uma área conhecida, possibilitando, assim, a contagem das células somáticas que ficam coradas após passarem por técnicas de coloração, como a de Moats e a de Newman-Lampert modificado por Lebowitz-Weber (Corante LW/NL-T). As porções citoplasmáticas dos corpos celulares fixam a cor mais abundantemente, ficando com seus contornos bem delimitados. A região nuclear das células é a que fixa mais fortemente a cor, permitindo diferenciá-las individualmente, o que possibilita a observação de diferentes tipos de célula.

#### **4.2.1 Coloração de Moats**

##### **Material necessário**

- Microscópio;
- Lâmina;
- Pipeta graduada de 0,1 mL;

- Xilol;
- Corante de Moats
- Solução fixadora:
  - álcool etílico 100%;
  - ácido acético glacial;
- Solução de ácido periódico a 0,5%:
  - 0,5 g de ácido periódico;
  - 100 mL de água destilada;
- Solução de metabissulfito de sódio ou potássio a 5%:
  - 5 g de metabissulfito;
  - 100 mL de água destilada;
- Solução de corante de azul de toluidina a pH 4,0:
  - 1 g de Azul de Toluidina;
  - 1,292 g de ácido cítrico mono-hidratado;
  - 1,093 g de fosfato de sódio bibásico anidro;
  - 100 mL de água destilada.

### **Procedimento**

Inicialmente, devem ser preparadas as quatro soluções mencionadas anteriormente:

- *Solução fixadora*: três partes de álcool 100% para uma parte de ácido acético glacial. Esta solução deve ser recente para o seu uso.
- *Solução de ácido periódico a 0,5%*: dissolver 0,5 g de ácido periódico em 100 mL de água destilada.
- *Solução de metabissulfito de sódio ou potássio a 5%*: dissolver 5 g de metabissulfito em 100 mL de água destilada. Esta solução pode ser estocada por longos períodos, desde que armazenada em frasco fechado.
- *Solução de corante de azul de toluidina a pH 4,0*: dissolver 1 g de azul de toluidina, 1,292 g de ácido cítrico mono-hidratado e 1,093 g de fosfato de sódio bibásico anidro em 100 mL de água destilada. Esta solução pode ser estocada por tempo indeterminado, desde que armazenada em frasco fechado.

Após o preparo das soluções, definir na lâmina uma área de 1 cm<sup>2</sup> (100 mm<sup>2</sup>). Adicionar no centro da área delimitada, 0,01 mL de leite utilizando uma pipeta graduada de 0,1 mL. Com uma alça de platina em forma de agulha,

espalhar o leite com cuidado. Colocar a lâmina para secar em temperatura ambiente ou no máximo a 40 °C em estufa. Após a completa secagem, inicia-se o processo de coloração cobrindo a área da amostra com o corante de Moats. Mergulhar a lâmina em xilol por 1 minuto. Em seguida, removê-la e secá-la em ar forçado. Submergir a lâmina no fixador por 10 a 30 minutos. Retirar e secar. Colocar a lâmina na solução de ácido periódico por 5 minutos. Remover e mergulhar rapidamente em etanol 100% e deixar secar. Colocar a lâmina em solução de metabissulfito de sódio ou potássio por 5 minutos. Remover e enxaguar delicadamente com água. Inserir a lâmina na solução de corante de azul de toluidina por 5 minutos. Lavar delicadamente com água e deixar secar. Proceder à leitura.

#### **4.2.2 Coloração de LW/NL-T**

##### **Material necessário**

- Microscópio;
- Lâmina;
- Pipeta graduada de 0,1 mL;
- Corante LW/NL-T:
  - 0,6 g de azul de metileno;
  - 54 mL de álcool etílico 95%;
  - 40 mL de tetracloroetano;
  - 6 mL de ácido acético glacial;
  - Erlenmeyer de 500 mL;
  - Banho-maria a 60 °C/70 °C.

##### **Procedimento**

Para a produção do corante LW/NL-T, devem ser misturados 54 mL de álcool etílico 95% com 40 mL de tetracloroetano em um Erlenmeyer de 500 mL. Aquecer em banho-maria a 60 °C/70 °C. Adicionar 0,6 g de azul de metileno. Agitar. Em seguida, resfriar e estocar em refrigerador a 4 °C por ao menos 24 horas. Decorrido o período, adicionar 6 mL de ácido acético glacial e misturar. Filtrar a solução em capela de exaustão e estocar em vidro tampado ao abrigo da luz. Antes de utilizá-la, realizar novamente a filtração.

Uma vez pronta a solução corante, definir na lâmina uma área de  $1\text{cm}^2$  ( $100\text{mm}^2$ ). Adicionar no centro da área delimitada  $0,01\text{mL}$  de leite utilizando uma pipeta graduada de  $0,1\text{mL}$ . Com uma alça de platina em forma de agulha, espalhar o leite com cuidado. Colocar a lâmina para secar em temperatura ambiente ou no máximo a  $40^\circ\text{C}$  em estufa. Após a completa secagem, iniciar o processo de coloração cobrindo a área da amostra com o corante LW/NL-T (ou outros) e deixar agir por 2 minutos. Retirar o excesso do corante com cuidado e deixar a lâmina apoiada na posição vertical sobre papel absorvente. Deixar secar. Para acelerar o processo de secagem, pode-se utilizar estufa. Entretanto, deve-se tomar cuidado para que o filme não “rache”. Enxaguar a lâmina por três vezes em água morna. Deixa secar novamente e proceda a leitura em microscópio em aumento de 1.000 vezes.

### **Informação importante**

Pelas metodologias descritas, serão contadas somente as células somáticas intactas. No caso de aparecimento de células danificadas ou fragmentadas, estas não devem entrar na contagem. Deverão ser contadas as células somáticas polimorfonucleadas (dois ou mais lóbulos no núcleo), com núcleo claramente identificável pela coloração. Deve ser feita a contagem em 10 a 15 campos microscópicos diferentes e calculada a quantidade média de células nesses campos.

**Observação:** O Fator Microscópico (FM) deverá ser calculado, pois é diferente entre equipamentos de fabricantes distintas. Por exemplo, com o microscópio Zeiss – modelo Axiostar, no aumento de 1.000 vezes, tem-se:

- diâmetro do campo microscópico =  $0,018\text{cm}$ ;
- área do campo microscópico =  $0,000254\text{cm}^2$ ;
- número de campos em  $1\text{cm}^2 = 3.930$ .

## **5. PESQUISA DE ANTIBIÓTICOS**

Os antibióticos são utilizados em larga escala na pecuária leiteira mundial, seja por administração local, seja por sistêmica. Independentemente da via de administração dos antibióticos, estes podem entrar em contato com o leite e, portanto, ser secretados com ele. Assim, cuidados devem ser tomados

para que o leite com resíduos de antibióticos tenha um destino adequado, a fim de não ocasionar riscos à saúde pública e problemas tecnológicos.

Os métodos para controle de resíduos de antibióticos em laboratório são, em geral, trabalhosos; por isso, novas tecnologias têm sido adotadas. A seguir, são apresentados alguns dos métodos mais comumente utilizados.

## **5.1 Delvotest®**

### **Fundamentação da técnica**

Este ensaio utiliza cubetas contendo esporos de *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* em meio de cultura sólido contendo um indicador de pH (bromocresol). Nesse meio, além da amostra de leite, são adicionados os nutrientes necessários para a multiplicação da bactéria, seguido de aquecimento. A ausência de antibióticos na amostra permite a multiplicação do microrganismo no meio, com conseqüente produção de ácido, alterando o pH do meio e, assim, a cor do indicador, de roxo para amarelo. A não multiplicação do microrganismo não altera a cor, o que indica a presença de antibióticos na amostra.

### **Material necessário**

- Delvotest®;
- Banho-maria a 64 °C (com variação de 1 °C acima ou abaixo);
- Pipeta graduada de 1 mL.

### **Procedimento**

Inserir um comprimido de nutriente à cubeta e 0,1 mL da amostra de leite que será testada. Incubar as cubetas em banho-maria na temperatura de 64°C (com variação de 1 °C acima ou abaixo) por 2 horas e meia. Observar o resultado por meio da mudança de cor do meio.

### **Resultado**

- 1) Antibiótico negativo: coloração amarelada.
- 2) Antibiótico positivo: coloração roxa.

## **Informação importante**

O ensaio é qualitativo, ou seja, indica presença ou ausência de antibióticos. É de fundamental importância o respeito aos períodos de carência dos medicamentos administrados nos animais do rebanho, assim como a via de administração recomendada pela fabricante.

Para fins de identificação de responsáveis por leite captados com antibióticos, no momento da coleta na propriedade rural, o transportador recolhe uma amostra do leite do produtor. Caso na plataforma de recepção seja constatado resíduo de antibiótico no tanque de transporte, todos os produtores da linha de coleta têm seu leite analisado por alguma das metodologias descritas. Ser for detectada a presença de antibiótico no leite, algumas medidas, como descontos monetários ou proibição de envio de leite ao laticínio são impostas pela empresa receptora do leite.

Pelo fato de a análise de antibiótico não ser um teste de triagem no ato da coleta, cabe ao laboratório do laticínio realizar esses ensaios, respeitando, assim, a legislação vigente.

## **5.2 IDEXX Snap®**

### **Fundamentação da técnica**

Com o auxílio de uma enzima, o antibiótico presente na amostra de leite é capturado por uma proteína ligante em uma matriz com suporte sólido absorvente localizado em uma unidade plástica moldada. Quando há antibiótico na amostra, um *spot* colorido poderá ser observado e comparado a um *spot* controle (de concentração conhecida), possibilitando, assim, a verificação de presença ou ausência de antibiótico na amostra.

### **Material necessário**

- IDEXX Snap®.

### **Procedimento**

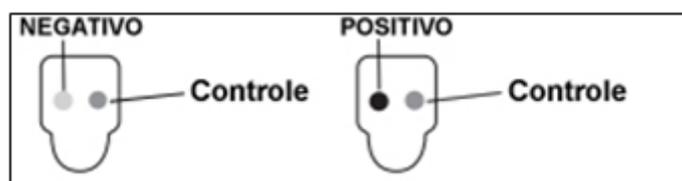
Com o auxílio da pipeta que acompanha o *kit* do IDEXX Snap®, transferir 450 µL de leite para o vidro de provas contendo o reagente em seu interior. Agitar suavemente de três a quatro vezes até a completa

homogeneização da amostra com o reagente. Transferir o leite do tubo de provas para o equipamento plástico. Quando o leite iniciar o desaparecimento do círculo de ativação, pressionar o SNAP até que seja ouvido um travamento. Aguardar 6 minutos e proceder à leitura.

## Resultado

- 1) Antibiótico negativo: coloração da amostra mais fraca que a da amostra controle.
- 2) Antibiótico positivo: coloração da amostra mais escura que a da amostra controle.

**Figura 1.** Interpretação do IDEXX Snap® Test.



Fonte: IDEXX, 2013

## Informação importante

O tempo entre o início do desaparecimento do círculo de ativação e o travamento do SNAP não deve ser superior a 60 segundos, pois resultados imprecisos podem ser obtidos após esse período.

Esse método pode ser utilizado por produtores, pois é de fácil obtenção, manuseio e rápido resultado. É amplamente utilizado nos laticínios como método de presença ou ausência de antibióticos em plataformas de recepção. É de extrema importância, principalmente na indústria, o emprego de métodos confiáveis e rápidos para a liberação do descarregamento do leite, visando uma logística melhor para os transportadores de leite.

## 6. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade do leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta do leite cru

refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 dez. 2011, n. 251, p. 6-11. Seção1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para controle de Leite e Produtos lácteos. Brasília, 2006.

COSTA, F. M. A. et al. Variação do teor de gordura no leite bovino cru. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27(5), 763-769, 1992.

DA COSTA, M. M. F. S.; MACHADO, A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na Região Norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, 31(1), 2001.

DE ALMEIDA, L. P. et al. Resíduos de antibióticos em leite de propriedades rurais da região de Uberlândia-MG. *Bioscience Journal*, 19(3), 2006.

IDEXX. Snap Beta-Lactam ST Test. In: *Users manual*. 2013. Disponível em: <[https://idexxcom-live-b02da1e51e754c9cb292133b-9c56c33.aldryn-media.com/filer\\_public/1c/0f/1c0fe8ae-8008-46e2-b3a1-2fa24e2cd172/snap-beta-lactam-st-insert-en.pdf](https://idexxcom-live-b02da1e51e754c9cb292133b-9c56c33.aldryn-media.com/filer_public/1c/0f/1c0fe8ae-8008-46e2-b3a1-2fa24e2cd172/snap-beta-lactam-st-insert-en.pdf)>. Acesso em: 13 março 2018.

LANGONI, L. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 3, n. 3, 2000.

MORAES, C. R. et al. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(3): 259-264, 2005.

NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, P. A. Study of good lineal correlation between standard count in plate, psychrotrophics count and redutase test in raw milk. *Higiene alimentar*, 16(97):81-86, jun. 2002.

PRATA, L. F. *Fundamentos de ciência do leite*. São Paulo: Ed. da Unesp, 1998. 119 p.

## **CAPÍTULO 5**

### **TECNOLOGIAS APLICADAS A LEITE E DERIVADOS**

Higor Oliveira Silva, Ana Maria Centola Vidal, Arlindo Saran Netto

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os processos tecnológicos são diversos em aplicações e funcionalidades, incluindo subtração, adição e/ou separação de componentes, agregação de valor comercial do leite e dos produtos derivados e, ainda, com o propósito de eliminar microrganismos, neste caso, os processamentos térmicos são os mais amplamente usados no âmbito industrial.

Todos os processos, contudo, só serão eficazes em seus desígnios, incluindo os tratamentos térmicos, em condições sanitárias adequadas e com equipamentos próprios para essa finalidade. Logo, é importante conhecer as tecnologias e processos que possibilitem alcançar os resultados desejados.

A temperatura é um dos agentes que mais influencia no desenvolvimento microbiano. O calor inativa sistemas enzimáticos e/ou coagula proteínas celulares; no entanto, há uma série de fatores que vão determinar a quantidade de microrganismos destruídos e a velocidade com que estes serão afetados. Duas modalidades se destacam entre os tratamentos pelo calor: a pasteurização, que retarda a deterioração do leite eliminando bactérias patogênicas e deteriorantes; e a esterilização, assim chamada por possibilitar alcançar a esterilidade comercial, inativando substancialmente todos os microrganismos e esporos capazes de se desenvolver no produto enquanto armazenados.

Quando se aumenta a temperatura em níveis superiores ao máximo do desenvolvimento de determinado microrganismo, é possível inibir sua multiplicação e até mesmo ocasionar-lhe danos irreparáveis. Esse aspecto possibilita alcançar decréscimos progressivos de populações microbianas conforme o tempo de exposição, como será mais bem descrito no decorrer deste capítulo.

Da mesma forma, o emprego de baixas temperaturas, um dos métodos mais antigos de conservação de alimentos, também possibilita o controle de microrganismos. O efeito conservador proporcionado pelo frio, baseia-se na inibição total ou parcial dos principais agentes responsáveis pela deterioração. Assim, a aplicação do frio pela indústria, não só de lácteos, possibilitou que o homem alcançasse longos períodos de armazenamento dos produtos comerciais perecíveis.

Por se tratar de um produto perecível, é necessária a aplicação de tecnologias ao leite para aumentar sua vida de prateleira, também denominada *Shelf life*, garantindo a qualidade nutricional e a segurança alimentar dos consumidores.

Diante disso, o emprego de tecnologias com esses princípios possibilita às indústrias muitas alternativas para a obtenção de uma gama de produtos, e com alta qualidade. Pode-se dizer, portanto, que essas tecnologias, que serão apresentadas com detalhes neste capítulo, representam um avanço na produção e no armazenamento de alimentos perecíveis, incluindo o do leite e seus derivados.

### **Beneficiamento**

Conforme o artigo 251 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – RIISPOA (BRASIL, 2017), o processamento do leite após a seleção e a recepção em qualquer estabelecimento compreende, entre outros processos aprovados pelo DIPOA (departamento de inspeção de produtos de origem animal), o pré-beneficiamento do leite, as etapas de filtração sob pressão, clarificação, bactofugação, microfiltração, padronização do teor de gordura, termização, homogeneização e refrigeração; já o beneficiamento do leite, além do já descrito para o pré-beneficiamento, inclui os tratamentos térmicos de pasteurização, ultra alta temperatura (UAT) ou esterilização e etapa de envase.

### **Filtração**

De acordo com o artigo 252 do RIISPOA (BRASIL, 2017), a filtração é a retirada de impurezas do leite por processo mecânico, mediante passagem sob

pressão por material filtrante apropriado. Deve ser a primeira operação realizada no leite cuja finalidade seja a destinação ao consumo, antes de qualquer medida de beneficiamento. Os filtros são constituídos de aço inoxidável ou plástico.

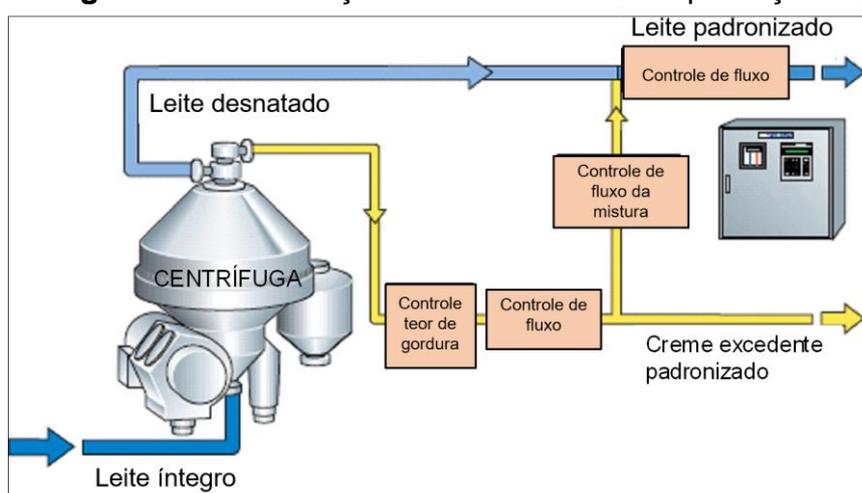
A filtração é a remoção de compostos sólidos insolúveis pela passagem do leite através de um material poroso resultando em um filtrado.

### Padronização

A padronização é a retirada de parte da gordura do leite e a manipulação de seu teor no próprio leite ou nos derivados, por adição do creme<sup>1</sup> extraído ao leite desnatado, ajustando-o ao teor de gordura desejado. Esse processo de separação é realizado por centrífugas desnatadeiras, como pode ser observado na figura 1.

Geralmente o leite é aquecido entre 45 °C e 55 °C antes de separar a gordura. Após a separação, o creme possui teor de gordura predefinido, que será misturado em quantidade adequada ao leite desnatado para a produção dos diferentes produtos. Isso possibilita ao laticínio padronizar produtos com teor de gordura constante, como o leite UAT, por exemplo, mantido a 3% de gordura, e destinar o creme excedente para a produção de outros produtos derivados (creme de leite, requeijão, queijo, manteiga, entre outros).

**Figura 1.** Padronização do leite em linha de produção.



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995.

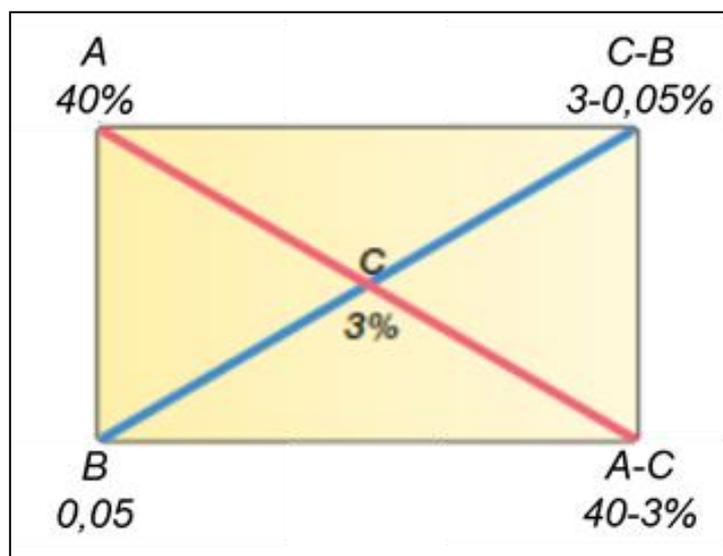
<sup>1</sup> Entende-se por creme de leite o produto lácteo rico em gordura retirada do leite por meio de processo tecnológico específico, que se apresenta na forma de uma emulsão de gordura em água (BRASIL, 2017).

Existem vários métodos para calcular as diferentes quantidades de leite e creme que devem ser misturados para se obter determinado teor final de gordura. Um desses métodos é descrito no *Dictionary of Dairying* e demonstrado com um exemplo prático a seguir.

Exemplo: *Quantos quilogramas de creme com A% de gordura devem ser misturados com leite desnatado com B% de gordura a fim de se obter um produto final com C% de gordura?*

A resolução desse tipo de cálculo pode ser obtida com base em um esquema representado por um retângulo, como ilustrado na figura 2 a seguir, cujos valores apresentados para teores de gordura são dispostos e cruzados com o teor desejado. Considerando o creme com teor de gordura de 40% (A) e o leite desnatado com teor de 0,05% (B), com a finalidade de se obter um produto final com 3%, e subtraindo os valores de conteúdo de gordura nas diagonais ( $C - B$  e  $A - C$ ), tem-se a proporção necessária para cada constituinte. Dessa forma,  $(C - B) = 2,95$  e  $(A - C) = 37$ , ou seja, a mistura deve conter 2,95 kg de creme (40%) e 37 kg de leite desnatado (0,05%) para se obter 39,95 kg de um produto padronizado com 3% de gordura.

**Figura 2.** Representação do cálculo de adequação do teor de gordura em produtos lácteos.



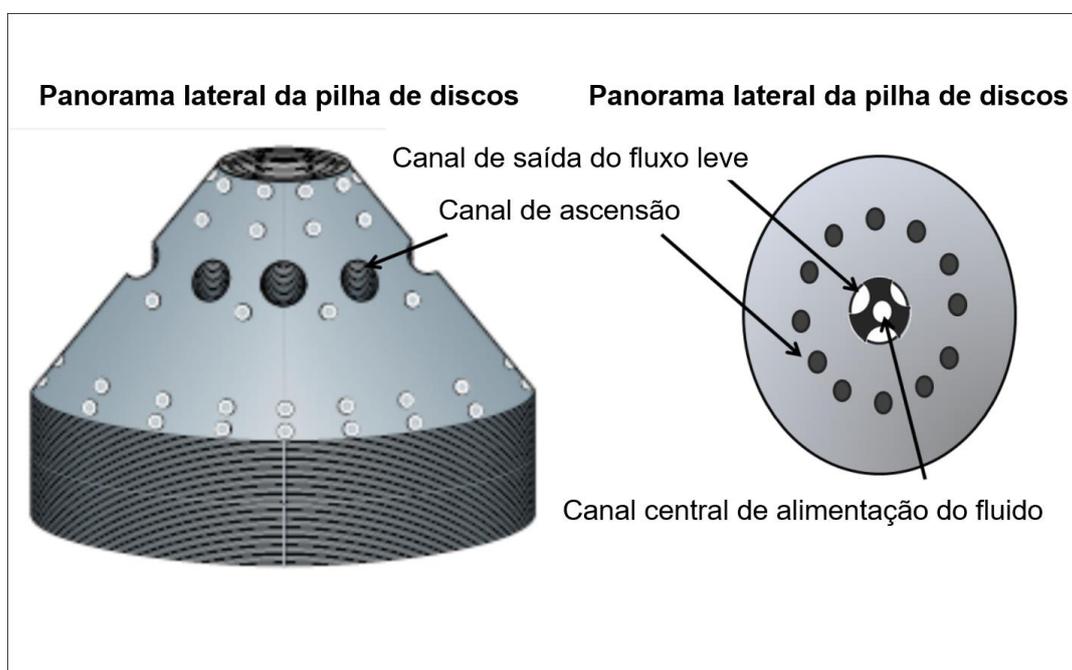
Fonte: *Dictionary of Dairying*, Tetra Pak, 1995.

## Centrifugação ou clarificação

De acordo com o artigo 253 do RIISPOA (BRASIL, 2017), entende-se por clarificação a retirada das impurezas do leite por processo mecânico, mediante centrifugação ou outro processo tecnológico equivalente, aprovado pelo DIPOA. Existem basicamente duas principais aplicações para a centrifugação: a separação de líquidos imiscíveis e a separação de sólidos de líquidos.

Um dos equipamentos utilizados nesse processo é a centrífuga de discos – que pode ser observada na figura 3 – que consiste em um tambor cilíndrico, com diâmetro entre 0,2 m e 1,2 m, contendo um conjunto de cones de metal que possuem um espaçamento fixo de 0,5 mm a 1,27 mm entre si. A força motriz é gerada na base do conjunto de discos, que atingem velocidade de rotação entre 2.000 rpm e 7.000 rpm. A força centrífuga gerada durante a rotação possibilita a separação dos componentes.

**Figura 3.** Visualização interna de uma centrífuga de discos.



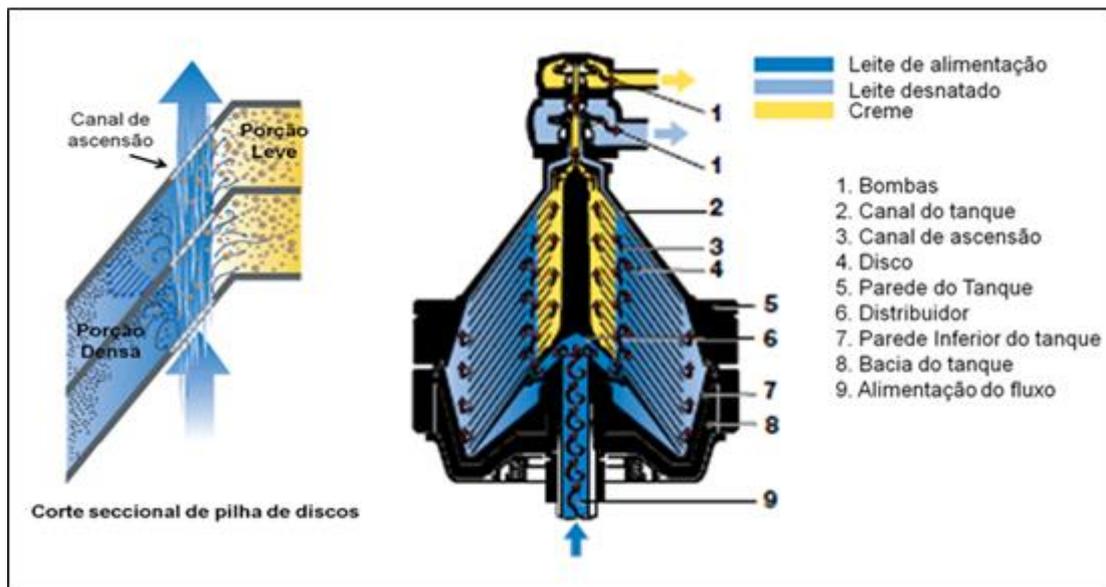
Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995 e Ordóñez, 2005a.

Os discos que compõem a centrífuga possuem furos emparelhados que formam canais e possibilitam o fluxo dos líquidos. Os discos constituem uma espécie de unidade, como uma pilha de discos, que se apoiam uns sobre os outros em pequenas tiras soldadas. Essas tiras mantêm uma distância entre os

discos e formam canais de separação entre eles, por onde ocorre a passagem do leite, como demonstrado na figura 4.

Com a ação da centrifugação, as frações mais leves são deslocadas em direção ao centro dos discos e escoam ao longo da parte superior, enquanto as porções mais densas escoam no sentido contrário; assim, ambas as correntes de líquido são removidas continuamente pelo sistema de drenagem na parte superior da centrífuga de modo semelhante ao sistema de tambor tubular. As centrífugas de discos são usadas para separar o creme de leite. Esse tipo de centrífuga tem capacidade para até  $150.000 \text{ L h}^{-1}$ .

**Figura 4.** Corte seccional e vista interna de equipamento de centrífuga.



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995.

### **Bactofugação**

A bactofugação é um processo utilizado para eliminar bactérias contidas no leite, utilizando força centrífuga. Para aumentar a eficiência do tratamento, geralmente é realizada sobre o leite aquecido, pois dessa forma ocorre menor resistência ao deslocamento das bactérias. Por essa razão, o bactofugador acaba sendo integrado ao sistema de pasteurização rápida. Quando o leite alcança a temperatura desejada na seção de pasteurização, ele é submetido à bactofugação, seguindo para a regeneração e o resfriamento.

A eficácia do tratamento aumenta conforme a temperatura do leite e varia em função do tamanho e do tipo de bactéria, uma vez que o efeito da força centrífuga é maior sobre bactérias maiores e mais densas. Em geral, o leite sai do bactofugador com uma redução de cerca de 90% da população microbiana. Portanto, a bactofugação é um complemento da pasteurização, mas não a substitui. Esse tratamento elimina a maior parte dos microrganismos que porventura sobrevivam à pasteurização, principalmente os microrganismos esporulados, além de resíduos bacterianos que podem conter enzimas intracelulares, prolongando e resultando dessa forma, em maior tempo de conservação do leite e dos produtos lácteos pasteurizados.

O equipamento é uma centrífuga, de pilha de discos, contendo bocais periféricos que permitem fluir a fase separada. As bactérias e os esporos podem ser descarregados em intervalos predefinidos através dos bocais.

Uma desvantagem associada a esse processo é a perda de 5% do leite, que acaba sendo descartado juntamente com as bactérias. Entretanto, essa perda pode ser reduzida a 0,15% em equipamentos modernos.

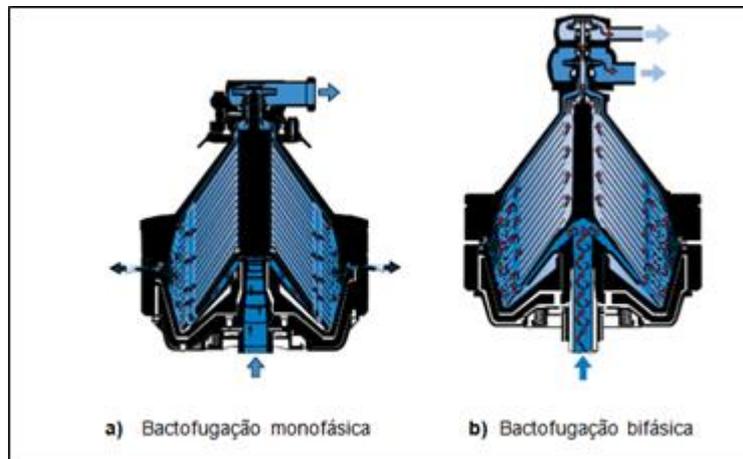
A bactofugação pode ser aplicada na elaboração de produtos que necessitam de um longo período de conservação, como o leite em pó destinado à reconstituição e queijos pouco ácidos com massa cozida ou queijos fundidos, nos quais a ação das bactérias esporuladas butíricas constituem um importante risco de contaminação.

O processo de bactofugação é mais eficiente em temperatura entre 55 °C e 60 °C; entretanto, nessa temperatura, ocorre também aumento da quantidade de proteína extraída do leite junto ao sedimento.

Pode-se destacar dois tipos de bactofugação, que podem ser observadas na figura 5:

- **Bactofugação monofásica:** com apenas uma saída no topo do recipiente para o leite com redução de bactérias. A fase separada contendo as bactérias é recolhida e descarregada em intervalos predefinidos.
- **Bactofugação bifásica:** com duas saídas na parte superior, uma para contínua descarga de concentrado de bactérias através de um disco de topo especial, e outra para uma segunda fase, com quantidade reduzida de bactérias.

**Figura 5.** Tipos de bactofugação.



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995.

## Homogeneização

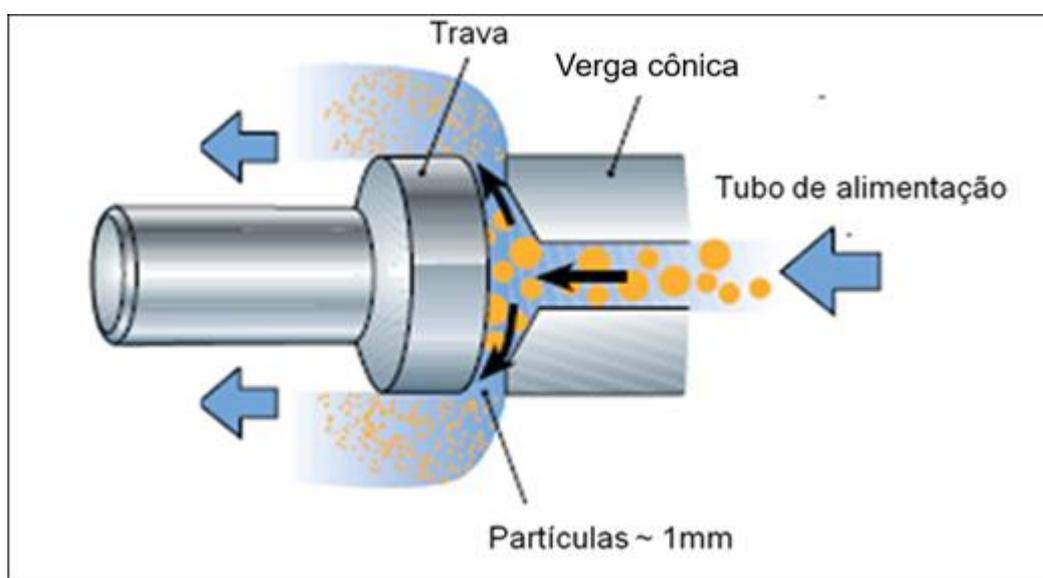
A homogeneização tem o objetivo de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura do leite e evitar a separação do creme por gravidade. Em poucas palavras, o processo consiste em aplicar uma grande pressão ao leite forçando-o a passar por um canal estreito que acaba rompendo os glóbulos de gordura. Esse processo proporciona maior estabilidade à emulsão de gordura, evitando que ocorra floculação e impedindo, assim, a separação da nata.

A homogeneização modifica as micelas, aumenta a viscosidade, ativa a lipase em decorrência da agitação e destrói aglutininas, promovendo um leite mais branco, pois, conseqüentemente, aumenta o número de partículas no leite e a reflexão de luz. Para romper os glóbulos de gordura, o leite é submetido a pressão.

A temperatura da homogeneização deve ser maior do que 50 °C, sendo ideal a 65 °C, pois em baixas temperaturas ocorre cristalização dos glóbulos de gordura e, nesse caso, sendo menos eficiente. Em seguida, o leite é resfriado a 4 °C e armazenado em tanques isotérmicos de estocagem até o seu envase ou para processamento de derivados.

O procedimento é realizado em um homogeneizador. O leite, entre 65 °C e 70 °C entra com forte pressão (25 MPa) em um tubo cujo extremo possui uma verga cônica de aço ou ágata, que se mantém na posição desejada graças a um sistema de regulação externo; o leite deve vencer a resistência oferecida pela trava e abrir caminho entre ela e a parede. A ruptura dos glóbulos se produz pelo choque com a trava e pela laminação que eles sofrem ao sair por um canal tão estreito, como ilustrado na figura 6. Nesse momento, o leite expande-se e provoca a explosão dos glóbulos.

**Figura 6.** Efeito do homogeneizador sobre as partículas de gordura.

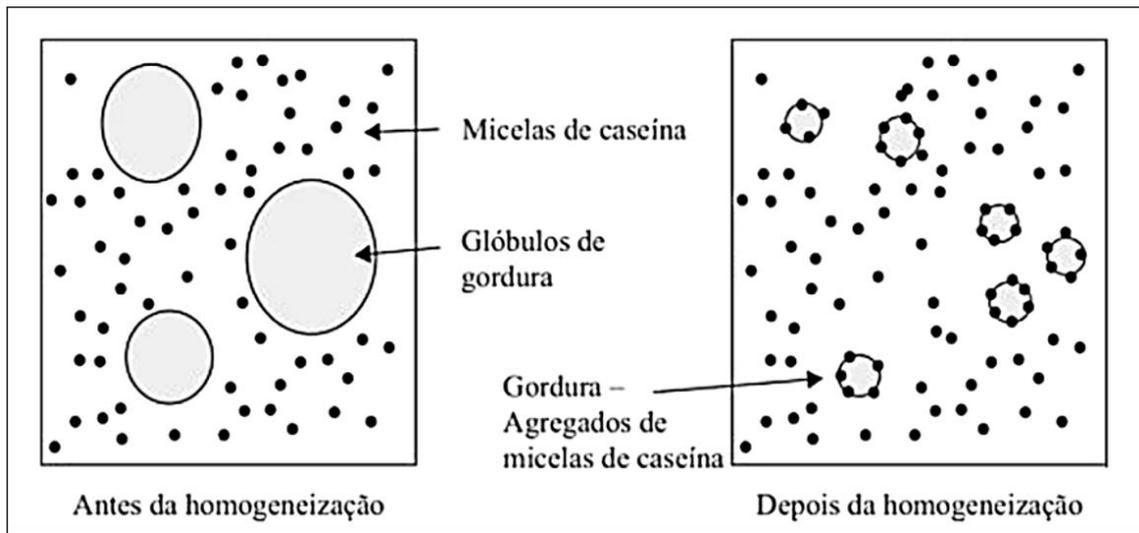


Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995.

A homogeneização pode ser feita em duas fases. Esse processo consiste em fazer o leite passar por uma segunda válvula a pressão menor (3,5 MPa a 5 MPa). Com isso, evita-se o reagrupamento dos glóbulos e consegue-se mantê-los a diâmetros em torno de 1  $\mu$ m a 2  $\mu$ m, prolongando sua estabilidade.

Entre os efeitos da homogeneização, que podem ser observados na figura 7, além da redução do tamanho dos glóbulos, que é o principal efeito desejado, ela provoca uma série de efeitos secundários:

**Figura 7.** Efeitos da homogeneização nos glóbulos de gordura e nas micelas de caseína.



Fonte: Porto, 2013.

1. Modificação da membrana. A homogeneização aumenta consideravelmente a superfície total de glóbulos de gordura. Os componentes originais da membrana não são suficientes para recobrir os novos glóbulos que se formaram. Por isso, eles se reestruturam espontaneamente formando uma nova membrana, que inclui restos da antiga e de novas proteínas (caseínas e proteínas do soro), fazendo que a fração proteica aumente cerca de quatro vezes.

2. A cor se torna mais branca em razão de maior efeito dispersante da luz.

3. Aumenta-se a tendência de formação de espuma, por causa do maior conteúdo proteico da membrana, sobretudo proteínas do soro.

4. A nova membrana não protege a gordura da mesma forma que a membrana original. Por isso, as lipases, de estrutura proteica, se aderem parcialmente à superfície das micelas de gordura e chegam mais facilmente aos triglicerídeos do interior.

5. O recobrimento parcial dos glóbulos com caseína faz que eles se comportem como se fossem grandes micelas. Qualquer reação que resulte em agregação das micelas (acidificação ou aquecimento excessivo) provocará a agregação dos glóbulos homogeneizados.

A alta turbulência durante o processo de homogeneização provoca colisão dos glóbulos de gordura, unindo-se ao mesmo tempo com uma micela de caseína e formando grumos de homogeneização.

Geralmente, os grumos contam com cerca de  $10^6$  glóbulos, e a principal consequência de sua formação é o aumento da viscosidade, que pode chegar a multiplicar-se 30 vezes.

## 2. APLICAÇÃO DO CALOR

### Termorresistência microbiana

A tecnologia de alimentos utiliza a temperatura para aumentar a vida útil do leite e derivados, por se tratar de um dos agentes que mais influem no desenvolvimento microbiano, provocando a destruição dos microrganismos pela ação letal do calor.

Simplificadamente, pode-se dizer que existem duas modalidades de tratamento térmico aplicado ao leite: a pasteurização, cuja finalidade básica é obter um leite livre de microrganismos patogênicos não esporulados, e a esterilização comercial, cuja finalidade é destruir os microrganismos presentes, esporulados ou não, que possam se multiplicar no produto final.

Quando os microrganismos são submetidos a temperaturas acima do seu ponto máximo de desenvolvimento, à medida que essa temperatura se eleva gradativamente, eles são inicialmente inibidos. Posteriormente, ocorrem danos subletais que os impossibilitarão de se multiplicar enquanto o dano não for reparado e, finalmente, quando a temperatura estiver suficientemente alta, ocorrerá um dano letal.

Em populações microbianas homogêneas, os tratamentos térmicos provocam reduções progressivas, de forma que, quanto mais elevada for a temperatura e mais prolongado o tempo, maior será a redução populacional.

Uma equação demonstra essa destruição, ajustada a uma escala logarítmica:

$$N_t = N_0 \cdot e^{-kt}$$

em que:

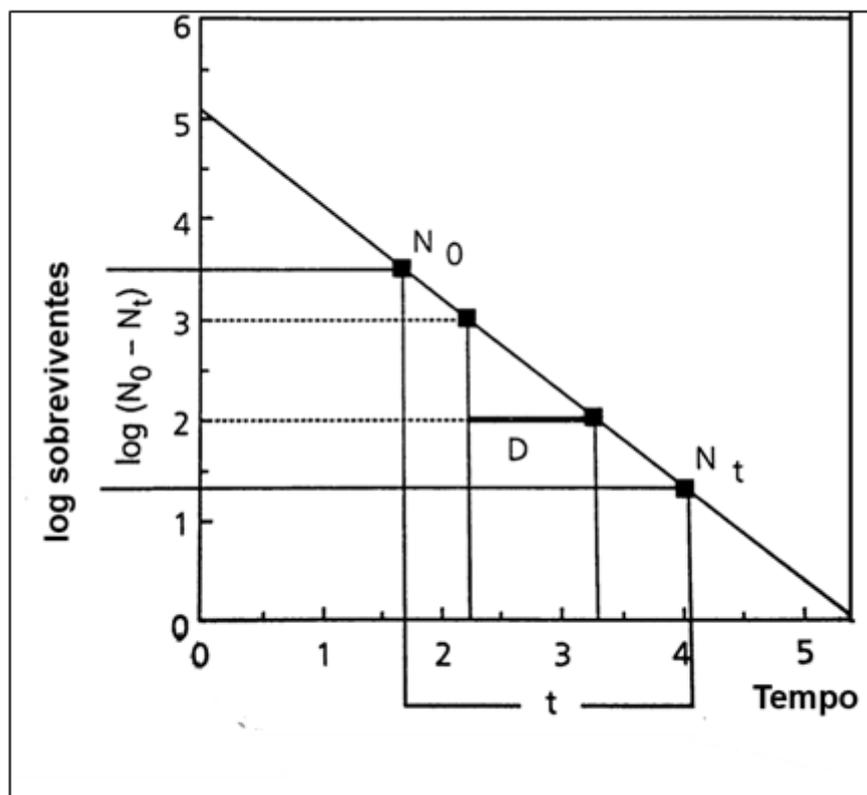
$N_t$ : número de microrganismos em um tempo  $t$ ;

$N_0$ : número inicial de microrganismos;  
 $t$ : tempo;  
 $e$ : constante de Euler = 2,718;  
 $K$ : coeficiente de letalidade térmica ( $\text{tempo}^{-1}$ ).

O coeficiente de letalidade térmica define a destruição dos microrganismos durante um tratamento térmico. Entretanto, geralmente utiliza-se com mais frequência o *tempo de redução decimal* (valor D), que é o tempo necessário para destruir 90% dos microrganismos presentes.

O valor D é representado no gráfico a seguir (figura 8) como uma reta, obtida do número de sobreviventes em função do tempo. O valor D é, portanto, o tempo necessário para se reduzir um ciclo logarítmico.

**Figura 8.** Representação da redução populacional de microrganismos.



Fonte: Ordóñez, 2005a.

Portanto, quando um microrganismo possui  $D_{110\text{ °C}} = 1\text{ min}$ , significa que a cada minuto de tratamento térmico à temperatura de 110 °C a população microbiana reduzirá em 90%.

Nesse caso, a redução logarítmica de microrganismos demonstra que não é possível reduzi-los a zero absoluto, por mais que se prolongue o tempo de tratamento. Isso por que, obtendo-se reduções sucessivas de 90%, as subsequentes serão de 99%, 99,9%, 99,99%, representando, assim, a sobrevivência de 10% no primeiro caso e 1%, 0,1%, 0,01%, respectivamente. Fato importante a se considerar na redução populacional microbiana é que ela está amplamente relacionada ao nível de contaminação inicial, portanto, para se atingir níveis desejáveis, é conveniente que seja utilizada matéria-prima com a menor contaminação possível.

Assim, o termo “esterilizado” não implica que o produto está necessariamente estéril no sentido microbiológico propriamente dito, sendo mais correto utilizar o termo “esterilização comercial”. A esterilização comercial situa-se em valores entre  $1 \times 10^{-4}$  e  $1 \times 10^{-5}$ , o que significa, em termos práticos, que o tratamento deve atingir uma redução de microrganismos a ponto de o risco de alteração ser de 1 produto entre 10.000 a 100.000 fabricados.

A termorresistência microbiana depende de diversos fatores intrínsecos, ligados ao tipo de microrganismo e à forma como se encontra, e extrínsecos, como o pH, a atividade de água, e a temperatura em que a bactéria se esporula. As bactérias esporuladas apresentam maior resistência ao calor. Entre aquelas não formadoras de esporos, as termófilas apresentam maior resistência do que as mesófilas. Já os microrganismos psicrófilos e psicrotróficos são mais termolábeis que os mesófilos.

### **Pasteurização**

Conforme o Art. 255 do RIISPOA (BRASIL, 2017), entende-se por pasteurização o tratamento térmico aplicado ao leite com objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de microrganismos patogênicos eventualmente presentes e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais.

A pasteurização é um recurso usado para retardar a deterioração do leite e, quando bem executada, permite eliminar bactérias patogênicas e reduzir as deteriorantes.

O ponto mais importante do processo de pasteurização é o tratamento térmico. Esse tratamento foi ajustado, já há anos, de acordo com os parâmetros térmicos de uma das bactérias patogênicas não esporuladas e mais termorresistentes, o *Mycobacterium tuberculosis* ( $D_{72} = 1$  segundo), e com a termoestabilidade da fosfatase alcalina, que é desativada a  $71,7\text{ °C}$  por 15 segundos. Por isso, os valores do binômio anterior foram tomados como condições da pasteurização; esse tratamento leva à redução de aproximadamente 15 D para *M. tuberculosis*. Quando se desativa a enzima, tem-se a segurança de ter destruído o microrganismo a níveis estatisticamente desprezíveis. Esse tratamento é equivalente aos de  $62,7\text{ °C} = 30\text{ min}$  e  $88,4\text{ °C} = 1\text{ s}$ .

Dois outros microrganismos, uma riquetsia (*Coxiella burnetti*) e uma bactéria (*Listeria monocytogenes*) apresentam mais resistência que a *M. tuberculosis* (valores  $D_{72}$  de 1,3 e 1,2 segundo, respectivamente). Por isso, em 1996, a Organização Mundial de Saúde recomendou que, nas áreas geográficas onde a *C. burnetti* fosse endêmica, deveria se elevar a temperatura em dois graus para assegurar a ausência desse microrganismo no leite pasteurizado. O aparecimento de graves surtos de listeriose nos Estados Unidos, nos primeiros anos da década de 1980, pelo consumo de leite e de queijo fresco culminou em pesquisas que puderam determinar a termorresistência de *L. monocytogenes* em diversos meios, embora alguns pesquisadores tenham obtido resultados que indicam ser essa bactéria mais termorresistente que *M. tuberculosis*. A Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América – FDA), embasada nos resultados publicados, afirmou que as condições utilizadas nos Estados Unidos para a pasteurização de leite eram suficientes também para destruir a *L. monocytogenes*.

No entanto, na Espanha, é permitido ultrapassar a temperatura de  $72\text{ °C}$  a fim de se obter uma taxa de microbiota banal inferior a  $10^5$  UFC/mL após a

incubação do leite pasteurizado a 6 °C durante cinco dias (Diretrizes EU). Dessa forma, vale ressaltar que particularidades podem ocorrer por causa de regiões de alta endemia. Naquele país, para se cumprir a diretriz, pode ser necessário aproximar dos 78 °C a temperatura de pasteurização durante o tratamento térmico, aumentando, conseqüentemente, a eficiência do tratamento para assegurar a destruição da *L. monocytogenes*.

A pasteurização é um tratamento indispensável e obrigatório, existindo diferentes tipos que se aplicam de acordo com a destinação do leite. Cada um desses processos será descrito e detalhado nas sessões subseqüentes, de acordo com o permitido pela legislação:

A. Pasteurização lenta: também conhecida como LTLT (*Low Temperature Long Time*, ou seja, temperatura baixa e tempo longo), consiste no aquecimento indireto do leite entre 63 °C e 65 °C por um tempo de 30 minutos, mantendo-se o leite sob agitação mecânica, lenta, em aparelhagem própria (BRASIL, 2017).

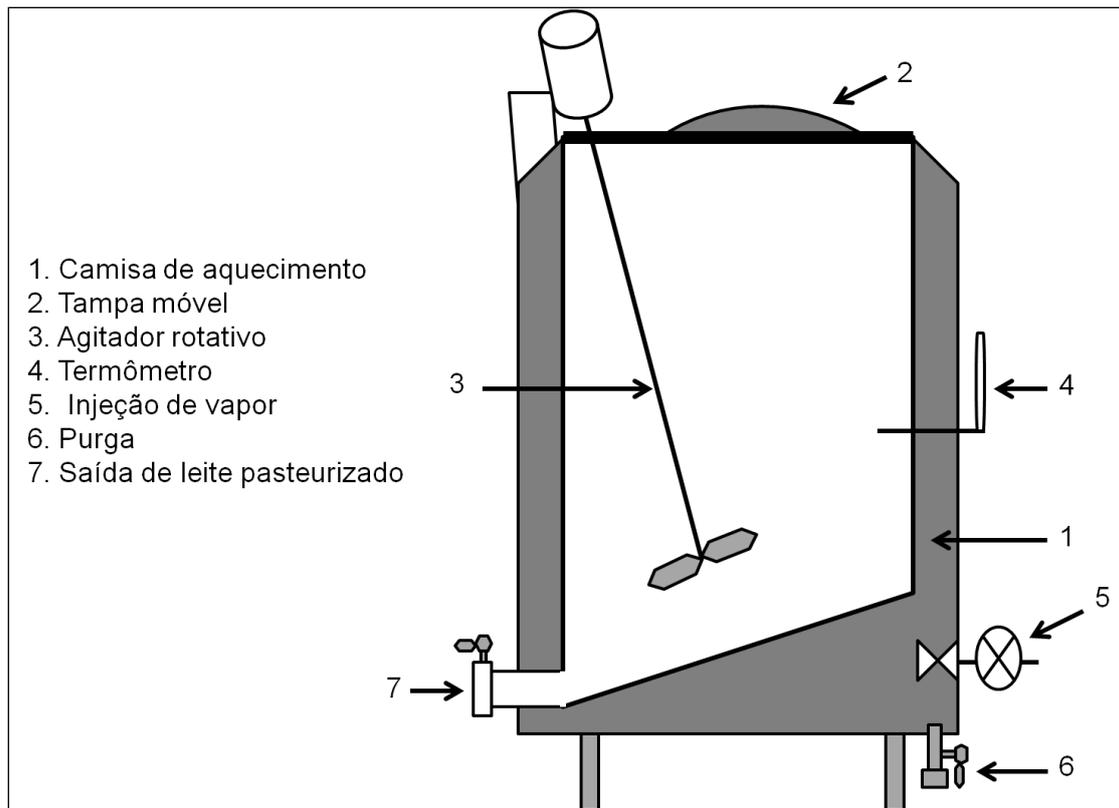
B. Pasteurização rápida: também conhecida como HTST (*High Temperature and Short Time*, ou seja, alta temperatura e curto tempo), consiste no aquecimento do leite em camada laminar entre 72°C e 75°C por um tempo de 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria (BRASIL, 2017).

### **Pasteurização lenta**

A pasteurização lenta ocorre há temperaturas de 63 °C a 65 °C durante 30 minutos. Esse método reduz a carga bacteriana em torno de 95%, exigindo, portanto, que o leite seja obtido e mantido, até sua pasteurização, em condições rigorosas de higiene.

Geralmente, é realizada em tanques de parede dupla, como ilustrado na figura 9, onde o leite é mantido sob agitação mecânica e aquecido e, depois, resfriado com circulação de água fria. Os tanques dessa natureza são de aço inoxidável, material de fácil limpeza, inerte e resistente à acidez do ácido láctico.

**Figura 9.** Esquema representativo de tanque de camisa dupla.



Fonte: Adaptado de Tronco, 2013.

A legislação brasileira não permite a utilização desse tipo de pasteurização quando se objetiva obter leite para consumo direto, entretanto é permitida para a fabricação de derivados (principalmente queijos) ou ainda para produtos cuja destinação seja fins filantrópicos, em que o consumo é realizado rapidamente.

Todos os diferentes tipos de pasteurização alteram de alguma forma a composição do leite, desnaturando proteínas, destruindo vitaminas e enzimas, entre outros. Entretanto, as alterações são mínimas à temperatura da pasteurização lenta, mantendo as propriedades do leite o mais próximo possível do seu estado *in natura*; nesse caso, a preservação da composição do leite é importante para o pronto desenvolvimento da cultura láctea e uma coagulação eficiente.

Por este motivo, para a fabricação de queijo, a pasteurização lenta é uma alternativa viável. O calor atribuído ao leite nas pasteurizações rápidas

promove alterações nos sais de cálcio, que aumentam o tempo de coagulação, além de fundir glóbulos de gordura.

No entanto, também se observam importantes desvantagens da pasteurização lenta, pois se trata de um processo descontínuo, que requer tempo, grande quantidade de calor e frio, equipamentos que exigem muito espaço, e esses fatores tornam esse processo oneroso. Assim, a pasteurização lenta é mais indicada para pequenas produções de queijo (principalmente em volumes superiores a 150 litros de leite), em razão do custo e da demora no resfriamento, que reduz a efetividade da pasteurização; por isso esse sistema está praticamente fora de uso na indústria.

Além disso, a pasteurização lenta tende a formar espuma no tanque, que favorece o desenvolvimento de microrganismos termorresistentes, principalmente os denominados termodúricos e termófilos.

Os microrganismos termodúricos são capazes de resistir a temperaturas relativamente elevadas, apesar de não se multiplicarem em tais temperaturas; em se tratando de leite, destacam-se os *Streptococcus* e os *Lactobacillus*. Já os microrganismos termófilos, além de resistirem a elevadas temperaturas, necessitam delas para se multiplicar; pode-se destacar, entre os termófilos, os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

### **Pasteurização rápida**

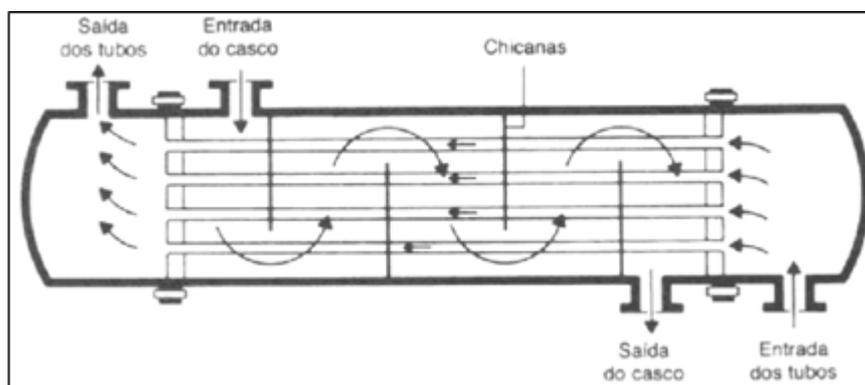
Consiste no aquecimento do leite em trocadores de calor tubulares ou de placas, de forma contínua. O leite é aquecido e resfriado por meio de circulação, em fluxo contínuo a pressão constante, entre as placas, em camadas muito finas, em circuito fechado, ao abrigo de ar e de luz, à temperatura de aquecimento entre 72 °C a 75 °C, durante 15 segundos, e é resfriado com água gelada a uma temperatura de 4 °C. A eficiência desse tipo de pasteurização é de 99,5%.

Esse tipo de pasteurização apresenta vantagens em comparação com a pasteurização lenta, como: permite maior controle e segurança do processo; apresenta maior eficiência; por se tratar de um processo contínuo, é efetuado com muita rapidez; possibilita o tratamento de grande volume de leite; o

processo de limpeza é automatizado; as instalações exigem menos espaço e apresentam maior economia de energia pelo processo de regeneração que ocorre no interior do aparelho.

Os trocadores de calor do tipo tubo-casco são constituídos basicamente por um feixe de tubos envolvidos por um casco, normalmente cilíndrico, circulando um dos fluidos externamente ao feixe e outro pelo interior dos tubos (figura 10).

**Figura 10.** Estruturação de trocador de calor do tipo tubo-casco.

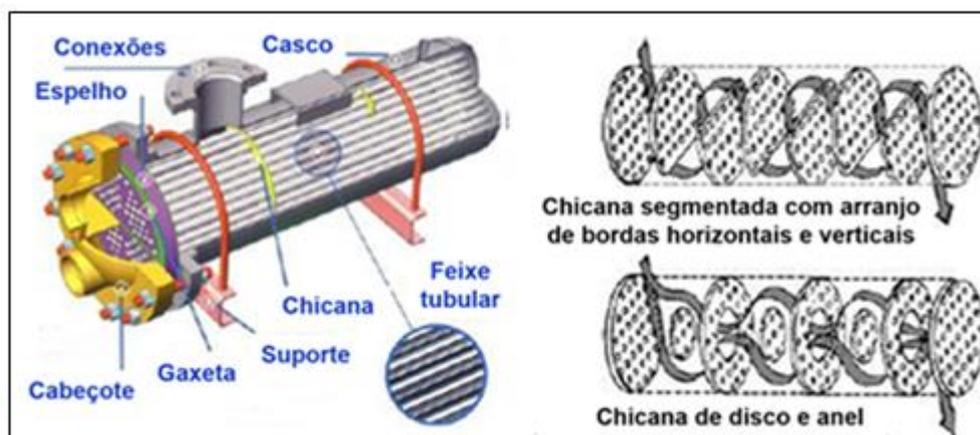


Fonte: Adaptado de Araújo, 2002.

O fluxo em contracorrente e as chicanas geram turbulência e, assim, aumentam a taxa de transferência de calor. Esse equipamento pode operar sob pressões muito altas (até  $2.000 \times 10^3$  Pa). A turbulência pode ser aumentada ainda mais à custa de produção ou tamanho máximo de partícula pela modificação das posições relativas dos tubos.

Os componentes principais dos trocadores do tipo tubo-casco são representados pelo cabeçote de entrada, casco, feixe de tubos e cabeçote de retorno ou saída (figura 11). Para promover maior tempo de residência do fluido no casco e maior turbulência, dispõem no feixe, de forma espaçada, placas de metal perfuradas chamadas chicanas, que podem ser de tipos diferentes.

**Figura 11.** Trocador de calor do tipo tubo-casco.



Fonte: Adaptado de Araújo, 2002

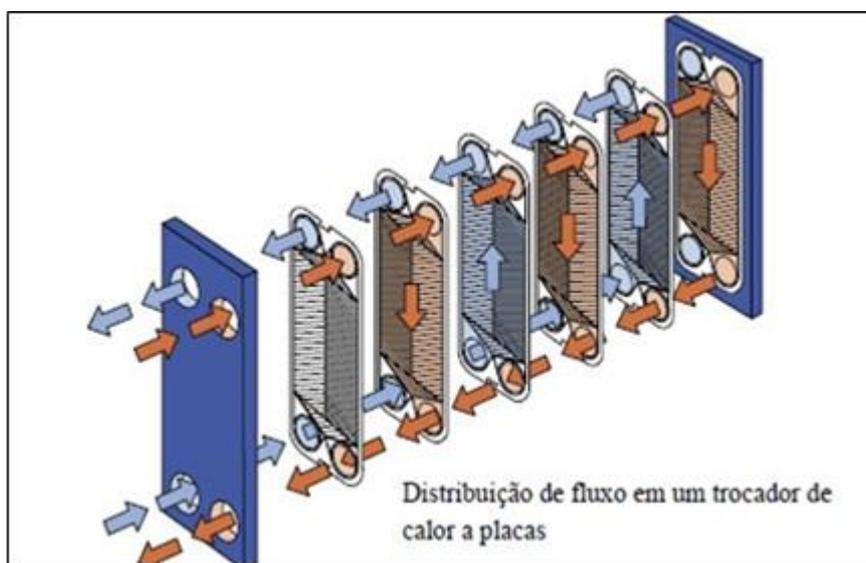
Existem muitos modelos de trocadores de calor do tipo tubo-casco, como o trocador de calor de tubo concêntrico, que é uma combinação do projeto de placas e tubular.

A pasteurização rápida utiliza mais comumente os pasteurizadores de placas. Esses equipamentos consistem em um grupo de placas retangulares onduladas ou com nervuras, em número variável, colocadas em posição vertical, fechadas umas contra as outras, mas separadas por uma junta de borracha que deixa entre elas um espaço de circulação. Por este espaço circula leite, vapor e água quente ou fria, podendo a circulação ser em contracorrente.

O trocador de calor de placas consiste em uma série de finas placas verticais de aço inoxidável juntas em uma armação de metal. As placas podendo ser orientadas vertical ou horizontalmente e possuem entradas e saídas por onde circulam os agentes de calor; geralmente é utilizada água quente ou vapor saturado sob pressão. O meio de aquecimento mais utilizado é água quente, geralmente com temperatura de 2 °C a 3 °C mais alta que aquela que se deseja atingir no produto. O vapor é fornecido por caldeiras a uma pressão de 600 kPa a 700 kPa (6 bar a 7 bar). Essas caldeiras formam canais paralelos, e o agente de aquecimento (água quente ou vapor) é bombeado através dos canais alternados, normalmente com fluxo em contracorrente, como ilustrado na figura 12.

O leite circula em fluxo contínuo, a pressão constante, na camada delgada de uma das superfícies das placas, e os agentes de aquecimento e de resfriamento circulam na outra porção, produzindo-se a pasteurização, o esfriamento e a recuperação. No pasteurizador, o leite frio que entra no sistema se aquece em contato com o leite que já foi pasteurizado e que deixa o sistema, produzindo um resfriamento parcial desse leite. Com essas trocas, ocorre recuperação de calor em torno de 80% a 90%.

**Figura 12.** Conformação de trocador de calor a placas.

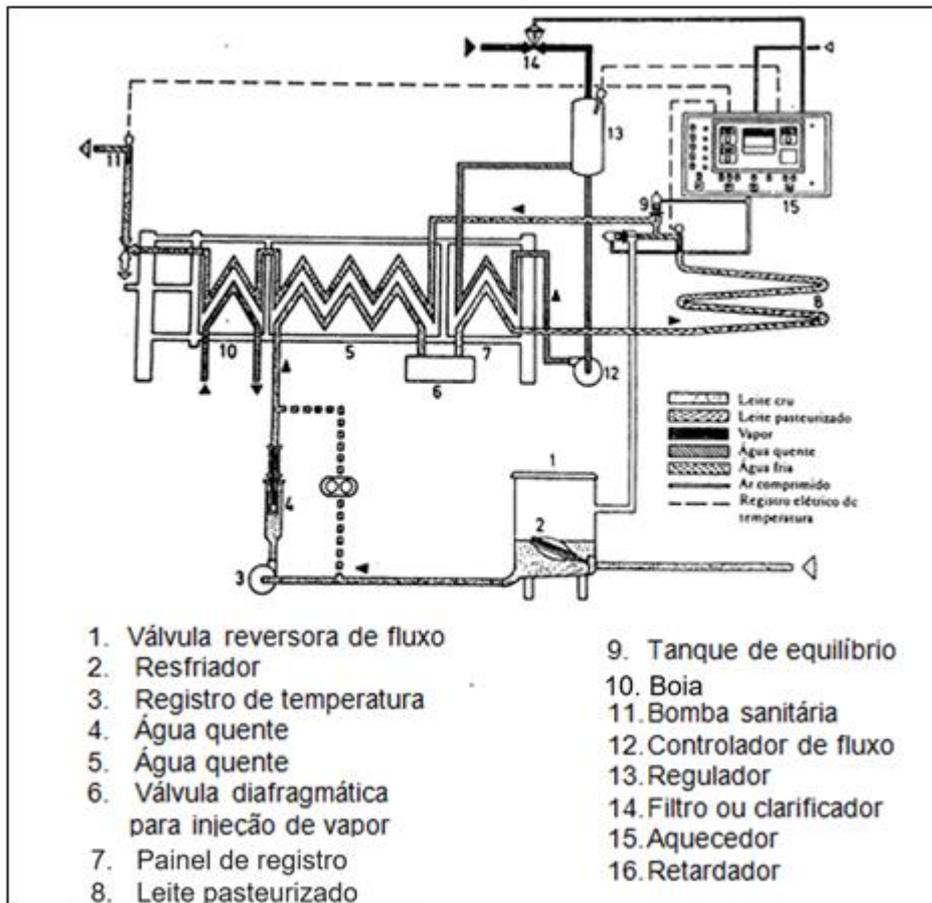


Fonte: Flowgasket, 2016.

Cada placa é provida de um selo de borracha sintética para vedação, evitando a mistura do produto com os meios de aquecimento e de resfriamento. As placas são conjugadas para induzir turbulência no líquido, o que, com a alta velocidade provocada pelo bombeamento, reduz a espessura da cama de fluxo, gerando altos coeficientes de troca térmica ( $3.000$  a  $11.500 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ). Fluxos mais turbulentos nas paredes dos trocadores possibilitam uma troca de calor mais uniforme e também promovem reduções consideráveis de depósitos de sedimentos de leite. A capacidade do equipamento varia conforme o tamanho e o número de placas, sendo de até  $80.000 \text{ L h}^{-1}$ .

Na figura 13, pode-se acompanhar a trajetória do leite no pasteurizador de placas.

**Figura 13.** Processo de pasteurização HTST.



Fonte: Tronco, 2013

O leite cru a 4 °C desce por gravidade até o tanque de equilíbrio, o qual possui um flutuador que regula o fluxo de leite que entra e sai na bomba. O leite é injetado para o trocador de placas, onde ocorrerá a permuta de calor do leite refrigerado com o leite já pasteurizado, elevando sua temperatura para aproximadamente 30 °C a 45 °C. Do trocador de calor o leite segue para a centrífuga desnatadeira, onde ocorre a separação do leite e do creme, além das impurezas. A desnatadeira é regulada para que o teor de gordura seja adequado ao desejado. Após a etapa de desnate, segue-se o processo de homogeneização. Depois, o leite vai para o setor de aquecimento, onde sua temperatura é elevada a 75 °C pela troca de calor com a água quente em contrafluxo; nessa temperatura o leite entra no retardador, onde tem sua velocidade reduzida e permanece por 15 segundos, com o objetivo de garantir a destruição dos microrganismos patogênicos. Na saída do retardador, existe

uma válvula de desvio de fluxo controlada automaticamente pela temperatura do leite nesse ponto. Se essa temperatura for inferior a 75 °C, o leite retorna ao tanque de equilíbrio, através de uma válvula que se fecha. Se a temperatura for igual ou superior a 75 °C, o leite segue para o trocador de calor, agora para aquecer o leite frio que está entrando. Por último, o leite pasteurizado entra no setor de resfriamento, onde trocará calor inicialmente com água industrial, ficando com uma temperatura em torno de 10 °C, para finalmente trocar calor com água gelada (0 °C), saindo a uma temperatura de 4 °C. Após o pasteurizador, o leite pode seguir dois caminhos: envase imediato, a fim de evitar recontaminação, ou conservação em silos isotérmicos.

A temperatura de pasteurização do leite é suficiente para destruir bolores e leveduras, todas as bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas. Entretanto, microrganismos termodúricos e termófilos resistem ao processo, dentre os quais o gênero *Bacillus* e *Clostridium*

Além da destruição microbiana, durante a pasteurização ocorre desnaturação parcial ou total de enzimas e vitaminas, desnaturação parcial de proteínas do soro (10% a 20%), insolubilização de sais, entre outros efeitos. No leite UAT, 100% das soroproteínas são desnaturadas.

O número e o tipo de microrganismo do leite cru são condicionantes da qualidade do leite pasteurizado. Se o leite cru contiver grandes quantidades de termodúricos ou termorresistentes, mesmo sendo eficiente o tratamento térmico, a vida de prateleira do produto será menor.

### **Tratamento por ultra alta temperatura (UAT)**

O tratamento térmico pelo processo conhecido como UHT (*Ultra High Temperature*), também denominado UAT (ultra alta temperatura) ou ultrapasteurizado, consiste na conservação de alimentos líquidos por meio de uma breve e intensa exposição a um aquecimento adequado e suficiente para se obter um produto bacteriologicamente estéril e que mantenha as características nutritivas e organolépticas do produto fresco.

Entende-se por processo de ultra alta temperatura ou UHT (*Ultra High Temperature*) o tratamento térmico aplicado ao leite a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, por um período de dois a quatro segundos, mediante processo de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32

°C e envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2017).

O resultado é a destruição dos microrganismos, proporcionando um produto final de alta qualidade e com uma vida de prateleira em temperatura ambiente de até 180 dias. Por isso, o leite UAT é comumente chamado de leite longa vida.

Vale ressaltar que esse tipo de tratamento destrói bactérias em suas formas vegetativas, não sendo capaz, porém, de destruir esporos. Nesse caso, é importante entender que a denominação de “estéril” não implica esterilidade no sentido microbiológico, porque, para a obtenção de uma esterilização absoluta, seria necessária uma severidade ainda maior do tratamento térmico e isso acarretaria numa série de desvantagens, como alteração de cor, de sabor e de valor nutricional. Dessa maneira, na prática o termo “esterilizado”, refere-se à inativação substancial ocasionada pelo processamento térmico, de todos os microrganismos e esporos que, se presentes, seriam capazes de se desenvolver no alimento enquanto estiverem armazenados.

Nas temperaturas do processo por UAT, ocorrerão reações e modificações químicas dos componentes do leite; contudo, o coeficiente de destruição bacteriano é consideravelmente superior à velocidade das reações químicas.

Antes do tratamento por UAT, o leite cru deve passar por um tratamento térmico prévio, sendo mais adotada, nessa etapa, a pasteurização rápida para eliminar bactérias, como as psicrotróficas, e enzimas termossensíveis por elas produzidas. Após esse aquecimento prévio, o leite é homogeneizado e aquecido a altas temperaturas e imediatamente resfriado e envasado, em condições assépticas e em embalagens esterilizadas e fechadas hermeticamente.

A determinação direta de microrganismos no leite por métodos microbiológicos demanda muito tempo e, nesse caso, a realização de um teste simples, e de menor custo, de verificação da atividade de fosfatase é utilizada rotineiramente a fim de verificar se o processo térmico foi realizado adequadamente.

O sistema UAT pode ser classificado em dois tipos: esterilização com equipamento de aquecimento direto e esterilização com equipamento de aquecimento indireto.

### **Esterilização por aquecimento direto**

Na esterilização por aquecimento direto, ocorre mistura de vapor a elevada pressão ( $965 \times 10^3$  Pa) com o leite, seja por injeção de vapor, seja por pulverização do leite no vapor. Nesse processo, ocorre adição de água ao produto e, em consequência, há eliminação dessa água por regulação de sólidos durante o processamento com a evaporação da água. O aquecimento e o resfriamento do leite ocorrem de forma rápida e, por conseguinte, a carga total de calor é menor em comparação com o aquecimento indireto, no qual o produto não entra em contato direto com a fonte de calor, sendo aquecido por meio de trocadores de calor.

O sistema direto, por atingir a temperatura máxima desejada de forma quase imediata, promove menores alterações do leite pelo calor e também passa por uma câmara de vácuo que contribui para a redução do sabor e do odor sulfuroso.

### **Esterilização por aquecimento indireto**

Nesse processo não ocorre mistura do leite com o agente térmico. A troca de calor é realizada em placas ou pasteurizadores tubulares. O leite é preaquecido no trocador de placas a  $65$  °C a  $75$  °C, depois passa por um homogeneizador antes de, finalmente, chegar à sessão de esterilização a  $140$  °C a  $150$  °C para então ser resfriado. As plantas UAT modernas são totalmente automatizadas e operam em quatro etapas básicas: esterilização, produção, limpeza por CIP (*Clean in place* ou sistema em circuito fechado) e limpeza asséptica intermediária. Os equipamentos desse tipo de processo são de menor custo em comparação com os de aquecimento direto e sua manutenção é mais simples.

No sistema indireto, o leite demora mais para atingir a temperatura desejada, com maior desnaturação proteica, intensificação do escurecimento causado pela reação de Maillard; ainda, a concentração de oxigênio tende a

ser maior, predispondo a maior oxidação lipídica e consequente rancificação do produto.

Colocando os sistemas de esterilização direto e indireto em paralelo, os efeitos oriundos do processo são semelhantes.

A pasteurização é um tratamento térmico relativamente brando e, mesmo quando combinado a outras operações, acontecem apenas pequenas mudanças nas características nutricionais e sensoriais na maioria dos alimentos. No entanto, a vida de prateleira dos alimentos pasteurizados em geral é aumentada por poucos dias ou semanas, em comparação com os vários meses que se obtém ao utilizar a ultra pasteurização. Para assegurar uma vida de prateleira adequada, é essencial evitar a contaminação pós-processamento.

O leite cru e o pasteurizado apresentam uma diferença de coloração em virtude da homogeneização, pois a pasteurização por si só não tem efeito significativo nesse aspecto.

O tratamento promove, também, o desenvolvimento de sabor de leite cozido, por causa da desnaturação de proteínas do soro, que formam sulfetos de hidrogênio, além da formação de lactonas e metilcetonas a partir dos lipídeos.

O tratamento térmico promove perdas nutricionais no leite, entretanto a literatura científica demonstra que são negligenciáveis. O objetivo maior da esterilização é aumentar a vida de prateleira dos alimentos e, nesse caso especificamente, permite o armazenamento do leite em temperatura ambiente. Em razão da importância dessa finalidade, a esterilização fundamenta-se basicamente nos efeitos deletérios do tratamento sobre os microrganismos.

### **Concentração ou evaporação**

A evaporação corresponde à eliminação de água do leite pelo processo de ebulição, utilizado para a fabricação do leite em pó. Também pode ser realizada em evaporadores de película descendente, em plantas modernas; entretanto, existem outras técnicas mais econômicas, por exemplo, os processos de membrana, como a ultrafiltração e a osmose reversa.

A ultrafiltração consiste num método de separação dos constituintes sólidos por meio de membranas de permeabilidade seletiva, empregando gradiente de pressão, que permite a retenção de partículas coloidais e macromoléculas e a permeação de moléculas menores. O retentado é rico em proteínas e tende a apresentar conformação e propriedades funcionais inalteradas em relação às proteínas originais.

No caso do processamento do leite, adota-se a evaporação para a retirada de água em menor temperatura (50 °C), que impede o desenvolvimento de microrganismos e ocasiona menores alterações pela ação do calor nos constituintes e nas propriedades do leite, reduzindo os custos da desidratação total. Posteriormente, é realizada a dessecação, que consiste na eliminação de água mediante a aplicação de calor a temperatura acima da ambiente com secador de cilindros ou *spray dryer*.

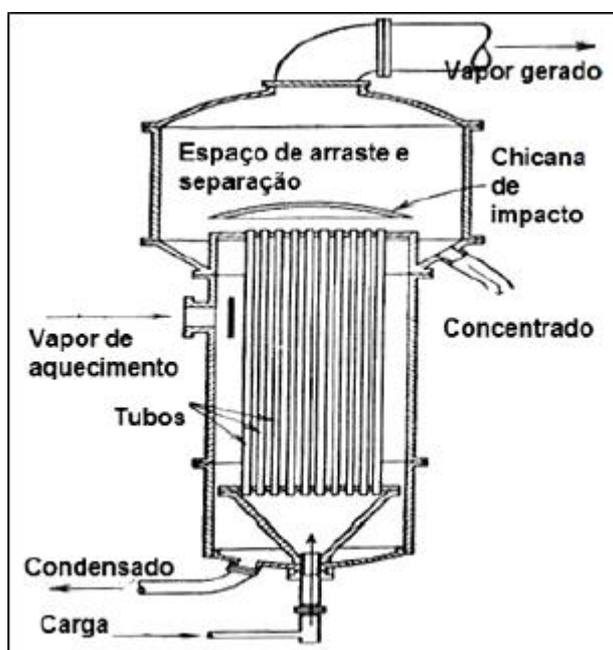
A separação em um evaporador é alcançada pela diferença de volatilidade entre água e solutos. O ideal é que ela remova seletivamente a água sem mudar a composição do soluto, de forma que o produto original seja obtido por diluição. Chega-se perto disso em alguns equipamentos, porém, quanto mais perto do ideal, maior o custo.

O secador de cilindros é constituído de um ou mais cilindros rotativos, com diâmetro variável (0,5 m a 1,5 m), medindo de 2 m a 5 m de comprimento, aquecidos internamente pelo uso de vapor à temperatura de 130°C a 150 °C. Já o processo *spray dryer* consiste em pulverizar o leite concentrado em forma de gotículas muito pequenas no interior de uma câmara onde circula uma corrente de ar quente a uma temperatura de entrada de 150 C a 220 °C.

Os evaporadores de tubos longos consistem em um conjunto vertical de tubos, todos com até 5 cm de diâmetro, contidos dentro de uma carcaça de vapor de 3 m a 15 m de altura. O fluido é aquecido quase ao ponto de fervura antes de entrar no evaporador. Ele é, então, mais aquecido dentro dos tubos e começa a ferver. A expansão do vapor força a subida de uma fina película de licor concentrado rapidamente pelas paredes de cada tubo (figura 14). O concentrado é separado do vapor e removido do evaporador, passando a efeitos subsequentes em um sistema de múltiplos efeitos, ou recirculando.

A fina película de leite é forçada para cima pelo tubo do evaporador e, por isso, esse arranjo é conhecido como evaporador de película ascendente. Quando a alimentação de calor é introduzida no topo do tubo, denomina-se evaporador de película descendente. A força gravitacional suplementa a força promovida pela expansão do vapor, produzindo altas taxas de fluxo de licor (acima de  $200 \text{ m s}^{-1}$  no final do tubo de 12 m). Por causa disso, o evaporador de película descendente é o equipamento de eleição no caso de fluidos mais viscosos, ou mais sensíveis ao calor.

**Figura 14.** Evaporador de tubos longos em conjunto vertical.



Fonte: Rogério, 2013.

Os evaporadores de película descendente são os mais comumente utilizados pela indústria. Esse processamento apresenta uma série de efeitos sobre o leite, alguns indesejáveis, como a perda de componentes de aroma, pois estes são mais voláteis que a água. Entretanto, no leite a vantagem se dá pelo fato de haver também a perda de compostos voláteis indesejáveis, consequentemente contribuindo com a qualidade do leite concentrado.

Na tabela 1, a seguir, é apresentada uma comparação de nutrientes perdidos na conservação do leite por evaporação com a esterilização UAT.

**Tabela 1.** Perda de vitaminas em leite concentrado e esterilizado por UAT.

| Produto           | Perdas (%) |             |              |              |                 |
|-------------------|------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|
|                   | Tiamina    | Vitamina B6 | Vitamina B12 | Ácido Fólico | Ácido Ascórbico |
| Leite evaporado   | 20         | 40          | 80           | 25           | 60              |
| Leite concentrado | 10         | <10         | 30           | 25           | 25              |
| Leite UAT         | <10        | <10         | <10          | <10          | <25             |

Fonte: Fellows, 2006.

### Concentração por membranas (hiperfiltração ou ultrafiltração)

Osmose reversa (ou hiperfiltração) e ultrafiltração são operações nas quais a água e alguns solutos são removidos seletivamente por uma membrana semipermeável de uma solução. Essas duas operações são semelhantes no fato de que em ambas os fluidos são forçados sobre a membrana por pressão.

Entretanto a osmose reversa é usada para separar água dos solutos de baixo peso molecular (sais, monossacarídeos e compostos aromáticos) que apresentam alta pressão osmótica. Para essa operação é usada uma pressão de  $4.000 \times 10^3$  Pa a  $8.000 \times 10^3$  Pa, pressão de 5 a 10 vezes maior que a pressão usada na ultra filtração, por isso o termo “osmose reversa”.

A maior aplicação comercial da osmose reversa é na concentração de soro de leite.

Entre as vantagens da concentração por membranas sobre a concentração por evaporação, destacam-se:

- O leite não necessita ser aquecido e, portanto, a perda de voláteis, ou mudanças no valor nutricional, e a perda da qualidade sensorial são desprezíveis.
- Não necessita de caldeiras para produção de vapor.

Entre as limitações, podemos citar:

- Os custos de investimento são mais altos que os da evaporação.
- A concentração máxima de sólidos totais é de até 30%.
- As incrustações das membranas (deposição de polímeros) reduzem o tempo de operação entre as limpezas das membranas.

Há diferentes tipos de membrana, e estas membranas limitam ou selecionam os solutos por amplitudes específicas de peso molecular, os quais são denominados ponto de corte.

Para a osmose reversa, o ponto de corte varia entre 100 Da e 500 Da. Para a ultrafiltração, a faixa de peso molecular é de 2.000 Da a 300.000 Da. Portanto, a ultrafiltração possui uma porosidade maior e retém somente moléculas grandes, como proteínas ou coloides, que têm pressão osmótica mais baixa. Solutos menores são transportados com a água através das membranas.

Assim, a ultrafiltração opera em pressões mais baixas ( $50 \times 10^3$  Pa a  $1.000 \times 10^3$  Pa). A aplicação comum da ultrafiltração é para a concentração de soro de leite antes da fabricação de derivados lácteos, para concentração de soro até 20% de sólidos ou para a remoção seletiva da lactose e sais.

Na fabricação de queijos, a ultrafiltração apresenta vantagens em relação ao rendimento e ao valor nutritivo (que são superiores), à padronização do teor de sólidos mais simples, ao consumo de renina mais baixo e ao processamento mais fácil.

O movimento das moléculas através da membrana de osmose reversa é realizado por difusão, e não por fluxo de líquido. As moléculas dissolvem-se em um lado da membrana, são transportadas através dela e, então, são removidas pelo outro lado.

Tanto em osmose reversa como em ultrafiltração, as taxas de fluxo através das membranas dependem da resistência do material da membrana, da resistência das camadas limite e do grau de saturação.

As membranas têm alta estabilidade e força mecânica para resistir a pressões de operações.

### **Atomização**

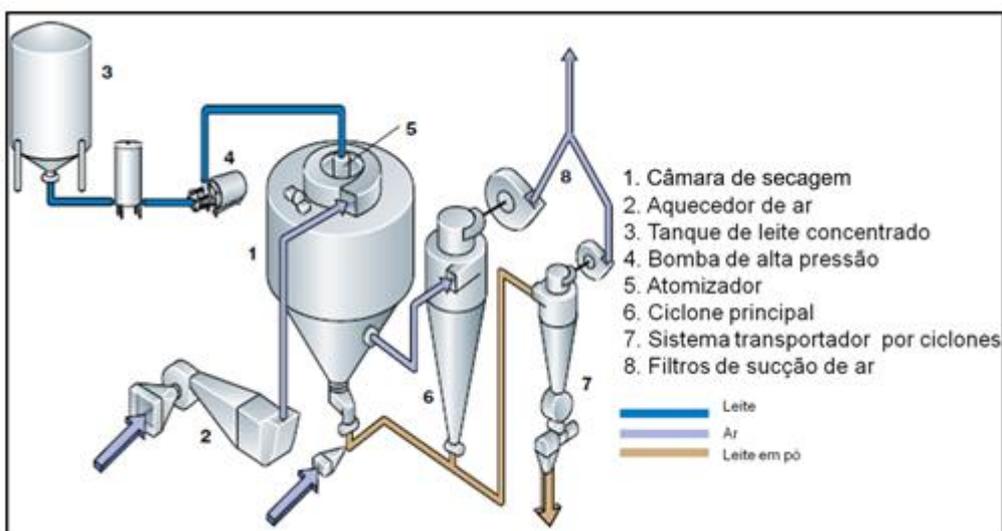
A atomização é uma operação de desidratação por meio de pulverização. A desidratação tem como objetivo principal prolongar a vida de prateleira dos alimentos reduzindo a atividade de água, inibindo, assim, o desenvolvimento bacteriano e a atividade enzimática. Além disso, a redução do

volume e do peso diminuem os custos com armazenamento e transporte e fornece um produto conveniente ao consumidor.

Entre os equipamentos utilizados para essa operação, o atomizador do tipo *spray dryer* é o mais comum. No atomizador de pressão, o alimento é bombeado para o bico atomizador a altas pressões e é obrigado a passar por um orifício de diâmetro bastante reduzido. As pressões nesse tipo de bico são em torno de  $100 \text{ kgf/cm}^2$  a  $600 \text{ kgf/cm}^2$ .

A pulverização forma gotículas de leite que são lançadas em uma câmara fechada. Essas gotículas são aspergidas dentro de uma corrente de ar quente paralela ou contracorrente a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  em uma câmara de secagem, evaporando a umidade. A figura 15 representa o esquema de secagem de um *spray dryer* atomizado para produção de leite em pó.

**Figura 15.** *Spray dryer* com atomizador para produção de leite em pó.



Fonte: Adaptado de Tetra Pak, 1995.

A eficácia da pulverização por esse processo está baseada no princípio do aumento da área de contato entre o leite a ser seco e o agente dessecante, ou seja, o ar quente quando é atomizado por um bico de *spray*. Ao diminuir o tamanho das partículas de leite, há um aumento considerável na sua área superficial.

### 3. COAGULAÇÃO

A coagulação do leite é um processo físico-químico decorrente de alterações nas micelas de caseína do leite, que podem ocorrer por meio de acidificação ou por ação enzimática.

A coagulação ácida é obtida por via biológica através da produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento ou pela adição direta de ácidos orgânicos ao leite.

Já a coagulação enzimática do leite é realizada por meio da adição de enzimas específicas, conhecidas como coalho ou coagulante. É mais realizada em comparação com a coagulação ácida. Os chamados coalhos referem-se às enzimas obtidas do abomaso de ruminantes. Existem duas enzimas principais: a quimosina e a pepsina.

A caseína representa a fração mais importante das proteínas do leite, perfazendo 80% do total de proteínas. Encontra-se na forma de um complexo, o fosfocaseinato de cálcio, graças a sua união com grupos fosfatos e cálcio. A precipitação da caseína pode ser realizada pela coagulação ácida ou enzimática, sendo esta a mais utilizada industrialmente.

#### Coagulação ácida

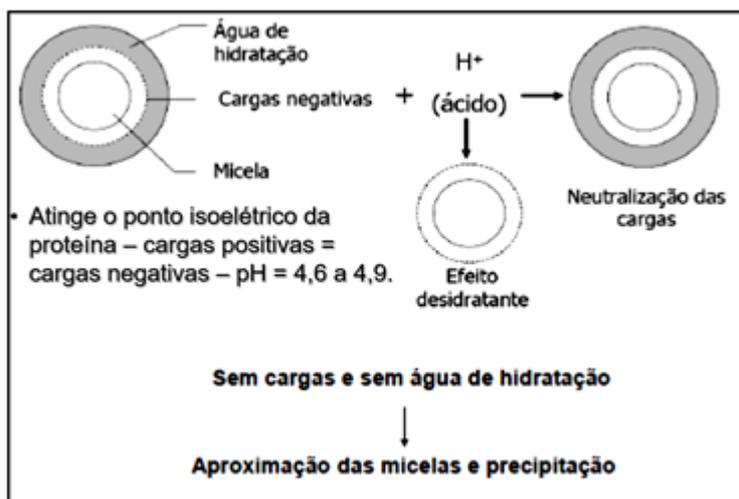
A coagulação ácida, também denominada láctica, consiste na redução do pH por acúmulo de ácido láctico ou por adição de outros ácidos orgânicos, o que determina a solubilização dos sais cálcicos das micelas de caseína, produzindo migração progressiva do cálcio e dos fosfatos para a fase aquosa e promovendo a desmineralização das caseínas, que é total no ponto isoelétrico<sup>2</sup>, em pH 4,6, em que a caseína apresenta menor solubilidade. A solubilidade dos minerais Ca e P, do interior da micela, na fase aquosa, a deixam desprovida de seus minerais, então ela se desintegra e se precipita. Em razão da importância do cálcio e dos fosfatos na estrutura da micela, a solubilização desses minerais é acompanhada de desestabilização das micelas, favorecida ainda pela neutralização de sua carga superficial.

---

<sup>2</sup> Ponto isoelétrico é o valor de pH em que uma molécula, ou um aminoácido, ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. Ou seja, o ponto isoelétrico é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína

De forma simplificada, as partículas coloidais da caseína em pH próximo da neutralidade são carregadas negativamente, existe repulsão entre as partículas; com o abaixamento do pH até 4,6, as partículas se neutralizam e a repulsão deixa de existir, permitindo que as partículas se unam e formem um coágulo (figura 16).

**Figura 16.** Esquema representativo da coagulação ácida.



Fonte: Silva; Marques, 2016.

Em baixas temperaturas, entre 0 °C e 5 °C, pode-se acidificar o leite com pH até 4,6, sem que ocorra a formação do coágulo; só será observado aumento de viscosidade. Já em altas temperaturas, a precipitação das caseínas ocorre com certa variação dos valores de pH, uma vez que o aumento da temperatura favorece a solubilização dos minerais. Logo, enquanto a 20 °C a coagulação ocorre em pH 4,6, a 40 °C ela ocorrerá em pH próximo a 5,2.

O coágulo obtido é o resultado da formação de um retículo proteico insolúvel que engloba em sua rede tridimensional a gordura e a totalidade da fase aquosa.

### **Coagulação enzimática**

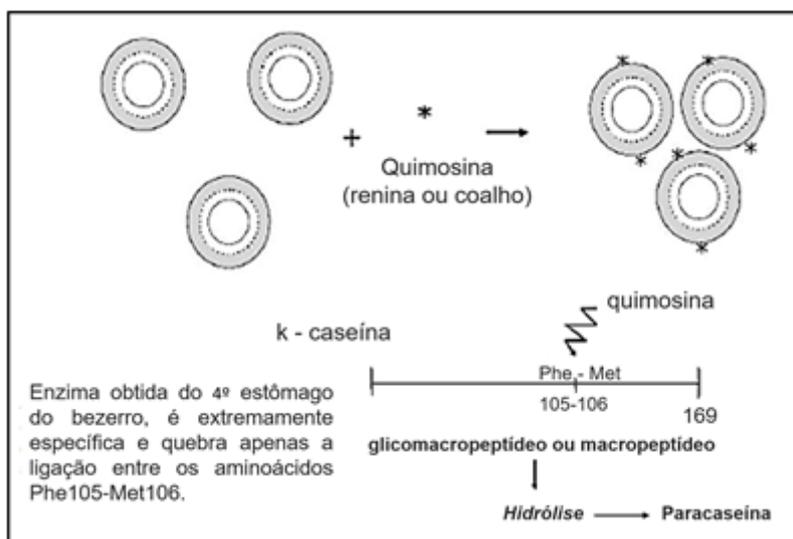
Por muito tempo, designava-se como coalho ou renina (enzima) o extrato procedente do abomaso de bezerros lactantes, cujo princípio ativo é a quimosina, que contém apenas pequenas quantidades de pepsina. Os coalhos modernos costumam conter quantidades variáveis de pepsina (entre 10% e

60%, em média 35%), indicando que utilizam grande quantidade de estômagos de animais para sua obtenção.

A coagulação ocorre no pH próximo ao natural do leite entre 6,0 e 6,5. Produz um coágulo firme e elástico no início e precipitado consistente e elástico no final.

A caseína é constituída por quatro frações denominadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  (alfa s1 e s2, beta e capa, respectivamente). As frações  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$  são sensíveis ao cálcio, podendo precipitar na sua presença. A fração  $\kappa$  é muito resistente ao cálcio e exerce um papel protetor sobre as frações  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ , evitando a coagulação na presença de cálcio solúvel. Na coagulação enzimática há hidrólise das ligações peptídicas estabelecida entre a Phe<sub>105</sub> e Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, eliminando a capacidade estabilizante desta e gerando como produtos uma porção hidrofóbica (para- $\kappa$ -caseína) e uma porção hidrofílica chamada glicomacropeptídeo, ou mais apropriadamente caseínomacropeptídeo, provocando a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (figura 17).

**Figura 17.** Esquema representativo da coagulação enzimática.



Fonte: Silva; Marques, 2016.

Tradicionalmente os coalhos são de origem animal, principalmente de bezerros e suínos, como no caso da renina. Mas pode-se encontrar no mercado coalhos de origem vegetal e microbiana.

O pH é um fator que influi na velocidade de agregação das micelas de para- $\kappa$ -caseína e na consistência da coagulação. O tempo de coagulação é reduzido à medida que o pH também se reduz, de tal forma que o tempo de coagulação é cerca de sete vezes menor em pH 5,6 em relação ao que apresenta um leite normal com pH em torno de 6,7. A consistência da coagulação também é influenciada pelo pH, por causa da desmineralização das caseínas por acidificação. A natureza e a quantidade da enzima também influenciam no tempo de coagulação—no caso de coalho animal, na proporção de quimosina/renina.

#### **4. ENZIMAS APLICADAS À TECNOLOGIA**

As enzimas estão presentes naturalmente no leite, oriundas da glândula mamária ou de microrganismos. São classificadas em hidrolíticas (proteolíticas ou lipolíticas), oxirredutoras, entre outras. Elas modificam o leite de diversas formas, tanto prejudiciais, implicando perda de qualidade sensorial (alterando cor e odor) e nutritiva, entre outras, quanto benéficas, por exemplo, as modificações que permitem transformar a matéria-prima em um produto novo, como no caso dos queijos. Essas enzimas têm alta especificidade e atuam como catalisadores bioquímicos, provocando importantes modificações em baixas concentrações.

Existem dois fatores que influenciam fortemente a ação enzimática: a temperatura e o pH. Via de regra, enzimas são mais ativas em um intervalo de temperatura ideal entre 25 °C e 50 °C. Sua atividade diminui se a temperatura é aumentada além dessa faixa, podendo cessar por completo entre 50 °C e 120 °C. A temperatura de inativação varia de um tipo de enzima para outro, fato que possibilita sua utilização com a finalidade de determinar a eficiência da pasteurização de leite.

Várias enzimas no leite são utilizadas como testes de controle de qualidade. Entre as mais importantes estão a peroxidase, a catalase, a fosfatase e a lipase. A vantagem de utilizar enzimas na elaboração de outros produtos deve-se a sua capacidade de catalisar determinadas reações em razão de sua especificidade sem causar reações secundárias.

A utilidade das enzimas nas indústrias alimentícias se apoia em três aspectos básicos:

- Análise de alimentos

As vantagens oferecidas pelo uso das enzimas nas análises dos alimentos são a grande sensibilidade e a rapidez (minutos); os principais inconvenientes devem-se ao alto custo e à necessidade de conhecer e controlar perfeitamente a especificidade da enzima.

- Processamento de alimentos

As principais aplicações são na melhoria do sabor, na mudança de textura, do aroma, da digestibilidade e da viscosidade, além de modificações que visam ampliar a vida útil do produto.

- Indicadores de tratamentos tecnológicos

### **Enzimas utilizadas no controle do grau de aquecimento do leite**

A determinação direta de microrganismos no leite por métodos microbiológicos demanda muito tempo e, nesse caso, a realização de um teste simples, e de menor custo, de verificação da atividade de fosfatase é utilizado rotineiramente.

#### A) Fosfatase alcalina

A enzima fosfatase alcalina está sempre presente no leite cru e tem utilidade na indústria para controle da eficiência do processo de pasteurização. Isso ocorre pelo fato de esta ser desnaturada em temperaturas próximas à de pasteurização (aproximadamente 70 °C).

Por ser destruída pelas temperaturas de pasteurização (lenta ou rápida), sua presença no leite demonstra que este não sofreu tratamento térmico adequado, ou, ainda, indica recontaminação ou uma possível mistura com leite cru após o processo de pasteurização.

A fosfatase é capaz de hidrolisar alguns ésteres do ácido fosfórico, propriedade utilizada para sua determinação qualitativa na prática. A resistência a altas temperaturas é ligeiramente superior à das bactérias patogênicas.

## B) Peroxidase

A peroxidase é uma enzima oxidante e libera oxigênio do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{peroxidase} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ ). Ela é destruída à temperatura aproximada de 80 °C; se a temperatura da pasteurização for ultrapassada, essa enzima não será encontrada no leite.

É possível verificar se a pasteurização foi conduzida dentro das temperaturas e dos tempos corretos analisando a atividade enzimática da peroxidase e da fosfatase alcalina. A primeira é uma das enzimas mais termorresistentes; logo, se ela tiver sido desnaturada, há indícios de que houve um excessivo tratamento térmico. Por outro lado, se comprovada a atividade enzimática da fosfatase alcalina no leite pasteurizado, há indícios de que a pasteurização não foi conduzida corretamente. Para os leites classificados como longa vida, em razão da elevada temperatura empregada, ambas as atividades enzimáticas devem estar negativas.

## 5. CONSERVAÇÃO PELO FRIO

O resfriamento é utilizado para reduzir atividades biológicas naturais e microbiológicas e prolongar, assim, a vida de prateleira do produto já processado. O resfriamento causa mudanças mínimas nas características sensoriais e nutricionais, garantindo grande aceitação do consumidor. Geralmente, o resfriamento é utilizado em combinação com outros tratamentos, como a pasteurização. Essa combinação não se dá por acaso, pois a combinação desses processos permite maior efeito de conservação em comparação a essas mesmas operações isoladamente.

Visando inibir o desenvolvimento microbiano, a redução da temperatura deve atingir níveis inferiores aos da temperatura mínima necessária para o desenvolvimento microbiano, estendendo o tempo de geração dos microrganismos e retardando, portanto, seu desenvolvimento.

O resfriamento evita o desenvolvimento de microrganismos termófilos e muitos dos mesófilos, entre os quais a maioria dos patógenos importantes. Entretanto, a maior preocupação está relacionada à quantidade de patógenos que podem se desenvolver em temperaturas de refrigeração; essa

preocupação se intensifica quando o armazenamento se dá por longos períodos.

Destacam-se quatro grandes categorias de microrganismos conforme temperatura de desenvolvimento:

1. Termófilos: mínimo: 30 °C a 40 °C; ótimo: 55 °C a 65 °C;
2. Mesófilos: mínimo: 5 °C a 10 °C; ótimo: 30 °C a 40 °C;
3. Psicotróficos: mínimo: < 0 °C a 5 °C; ótimo: 20 °C a 30 °C;
4. Psicrófilos: mínimo: < 0°C a 5 °C; ótimo: 12 °C a 18 °C.

Os microrganismos psicotróficos possuem temperaturas ótimas de desenvolvimento entre 20 °C e 30°C, mas podem se multiplicar a 5 °C ou em temperaturas ainda menores. Isso permite que predominem no leite refrigerado.

Nesse sentido, é essencial que as boas práticas de fabricação sejam utilizadas durante a produção. Portanto, é fundamental que a refrigeração do leite seja feita o mais rapidamente possível após coleta.

## 6. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. C. da C. *Trocadores de Calor*. São Paulo: Ed. da UFSCAR, 2002. (Apontamentos).

BEUX, S. *Tecnologia de leite e derivados*. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012. 89 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 9.013/2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 29 març. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade do leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 dez. 2011, n. 251, p. 6-11. Seção1.

FELLOWS, P. J. *Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e práticas*. Porto Alegre: Artmed; 2006.

FLOWGASKET. Trocadores de calor a placas. Disponível em: <<http://flowgasket.com/itt-standard-xchange/placas-con-juntas/>>. Acesso em: 17 out. 2016.

ORDOÑÉZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 155-156, 2005a.

ORDOÑÉZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 219-39, 2005b.

PORTO, E. *Pasteurização do leite*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Pasteurizacao.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

RAMESH, M. N. Food preservation by heat treatment. In: RAHMAN, M. S. (Ed.) *Handbook of Food Preservation*. New York: Marcel Dekker, 2007. p. 95-172.

RODRIGUES, E. et al. Qualidade do leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices. In: RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária: Superintendência de Desenvolvimento Sustentável. *Manual Técnico*, 37. Niterói: Programa Rio Rural, 2013.

ROGERIO, H. A.; COSTA, A. O. S.; COSTA, E. F. J. Aplicações industriais de evaporadores de múltiplo efeito. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA. Centro Científico Conhecer. Goiânia, v. 9, n.16, p.2815-2834, 2013.

SILVA, P. F.; MARQUES V. F. Coagulação de Proteínas do leite. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia. Disponível em: <[http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/disciplinas/t\\_qb\\_kit\\_ponto\\_iseletrico\\_e\\_coagulacao\\_de\\_proteinas.pdf](http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/disciplinas/t_qb_kit_ponto_iseletrico_e_coagulacao_de_proteinas.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2016.

TETRA PAK. Tetra Pak Processing Systems AB. *Dairy Processing Handbook*. Lund, Sweden, 1995.

TRONCO, V. M. *Manual de Inspeção da Qualidade do Leite*. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2013.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVIA, L. C. *Processamento do leite*. Universidade Estadual do Espírito Santo, Espírito Santo, 2007a.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. *Características do leite*. Boletim Técnico, Universidade Estadual do Espírito Santo, Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, PIE-UFES:02207, v.1007, n.6, 2007b.

## CAPÍTULO 6

### FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE LEITE E DERIVADOS

Gabriel Augusto Marques Rossi, Ana Maria Centola Vidal, Arlindo Saran Netto,  
Carlos Eduardo Gamero Aguilar

#### 1. INTRODUÇÃO

Os produtos obtidos a partir do processamento do leite como matéria-prima são denominados derivados lácteos. Esses produtos servem como alimentos na dieta dos seres humanos, que possuem o hábito de consumir manteigas, cremes de leite, leites fermentados, queijos, doces e o próprio leite pasteurizado ou tratado por UAT. Estima-se que somente o consumo de queijo por um brasileiro anualmente seja cerca de cinco quilogramas, valor que deverá crescer até oito quilogramas em 2017 (MILKPOINT, 2015).

Neste capítulo, abordaremos o processamento do leite e dos principais derivados lácteos, descrevendo as características e as etapas de processamento, além de eventuais falhas que podem ser observadas durante a preparação dos produtos, decorrentes de utilização de matéria-prima de baixa qualidade, ou durante o processamento.

Para facilitar a compreensão deste capítulo, os produtos e respectivos processamentos serão abordados individualmente. Entretanto, cabe r ressaltar que a qualidade, tanto microbiológica como físico-química, de qualquer derivado lácteo está intimamente relacionada com a qualidade microbiológica e físico-química inicial do leite cru refrigerado que será utilizado como matéria-prima no laticínio (COELHO et al., 2014).

Sabe-se que a presença de bactérias deteriorantes, como as do gênero *Pseudomonas* spp., são comumente relatadas em elevadas quantidades quando a obtenção do leite não é realizada com a higiene necessária e poderão afetar diretamente a qualidade dos derivados, reduzindo a vida de prateleira desses produtos, mesmo após tratamentos térmicos, visto que suas

enzimas proteolíticas e lipolíticas podem ser termorresistentes (STOECKEL et al., 2016). Então, destaca-se que, para a obtenção de um derivado lácteo com qualidade, se deve processar sempre o leite cru de boa qualidade, ordenhado sob condições higiênicas e obtido de animais saudáveis, cujo armazenamento e transporte, sob refrigeração, foi realizado conforme a legislação vigente.

O estabelecimento industrial é responsável pelo controle de qualidade na recepção e seleção da matéria-prima destinada ao beneficiamento ou à industrialização, conforme especificações definidas no RIISPOA (BRASIL, 2017) e em normas complementares.

## **2. LEITE PASTEURIZADO**

O leite beneficiado pode ser dividido em duas categorias: leite pasteurizado tipo A e leite pasteurizado.

Por leite pasteurizado tipo A entende-se o leite classificado, quanto ao teor de gordura, em integral, semidesnatado ou desnatado, produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado Granja Leiteira. As dependências de beneficiamento, industrialização e envase deverão estar localizadas no mesmo prédio da ordenha ou contíguas a essa e obedecer a normas específicas (BRASIL, 2011).

Os procedimentos específicos para controle de qualidade do leite tipo A utilizado como matéria-prima no processamento consistem na contagem padrão em placas (máximo de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL), contagem de células somáticas ( $3,6 \times 10^5$  céls./mL – até o presente momento da redação deste material), pesquisa de resíduos de antibióticos, determinação do índice crioscópico ( $-0,512$  °C a  $-0,531$  °C), teor de sólidos não gordurosos (8,4%), densidade relativa (1,028 g/mL a 1,034 g/mL), acidez titulável (14 g a 18 g de ácido láctico/mL), teor de gordura (mínimo de 3%), proteína total (2,9 g/100 g), estabilidade ao alizarol 72%, além da aferição da temperatura (4 °C a 7 °C) (BRASIL, 2011).

As indústrias devem dispor de equipamentos em aço inoxidável, de bom acabamento, para a realização das operações de beneficiamento e envase do

leite, em sistema automático de circuito fechado constituído de: refrigerador a placas para o leite proveniente da ordenha, tanque regulador de nível constante provido de tampa, bombas sanitárias, filtro-padronizadora centrífuga, pasteurizador, tanque isotérmico para leite pasteurizado e máquinas de envase.

A matéria-prima a ser utilizada deve ser o leite cru refrigerado tipo A, que será avaliado laboratorialmente (como descrito anteriormente), para depois passar pelos processos de filtração (remoção de sujidades maiores) e preaquecimento (para evitar a instabilidade do leite), clarificação (redução da CCS e CBT), homogeneização (redução dos glóbulos de gordura), pasteurização (redução do risco ao consumidor decorrente da redução da microbiota contaminante), resfriamento e envase asséptico em embalagens plásticas. Tal produto deve ser mantido em refrigeração a 4 °C.

A finalidade do preaquecimento é diminuir a viscosidade do leite, o que irá facilitar a clarificação, com temperatura atingida entre 40 °C e 45 °C. A clarificação é realizada por centrifugação, que visa retirar bactérias e células somáticas do leite, melhorando suas qualidades e aspectos para o processo; é feita por centrífugas antes da pasteurização.

No conjunto de equipamentos, é obrigatório o emprego do homogeneizador se a validade do produto for superior a 24 horas (BRASIL, 2011). A homogeneização do leite é utilizada para evitar a separação de gordura e sedimentação em produtos lácteos, para melhorar a viscosidade, o sabor e a textura. Deve ser realizada em temperaturas entre 50 °C e 60 °C; nesse processo é utilizada alta pressão (15 kPa a 20 kPa) para fragmentação dos glóbulos de gordura.

O pasteurizador deve ser de placas e possuir painel de controle, termorregistrador automático, termômetros e válvula automática de desvio de fluxo, bomba positiva ou homogeneizador; a refrigeração a 4 °C máximos após a pasteurização deve ser feita igualmente em seção de placas.

Na pasteurização, devem ser rigorosamente observados os limites quanto à temperatura e ao tempo de aquecimento de 73 °C a 75 °C por 15 s a

20 (BRASIL, 2017). Na refrigeração subsequente, a temperatura de saída do leite não deve ser superior a 4 °C (BRASIL, 2011).

Após a pasteurização, o leite será empacotado em embalagens plásticas (garrafas ou sacos), confeccionadas em bobina pigmentada branca, esterilizadas por luz UV (ultravioleta), garantindo proteção apropriada, e acondicionadas em câmaras a 4 °C até o momento da expedição.

Para ter sua expedição autorizada, o leite pasteurizado tipo A integral deverá apresentar valor mínimo de 3% de gordura (0,6% a 2,9% se for semidesnatado e máximo de 0,5% se for desnatado), 14 g a 18 g ácido láctico/mL, estabilidade na prova do alizarol 72%, mínimo de 8,4% de sólidos não gordurosos, índice crioscópico entre -0,512 °C a -0,531 °C, negativo na prova da fosfatase alcalina e positivo na prova da peroxidase. Em relação aos parâmetros microbiológicos, deve ser analisado quanto à presença de *Salmonella* spp., coliformes termotolerantes e totais (35 °C) e contagem padrão em placas (BRASIL, 2011).

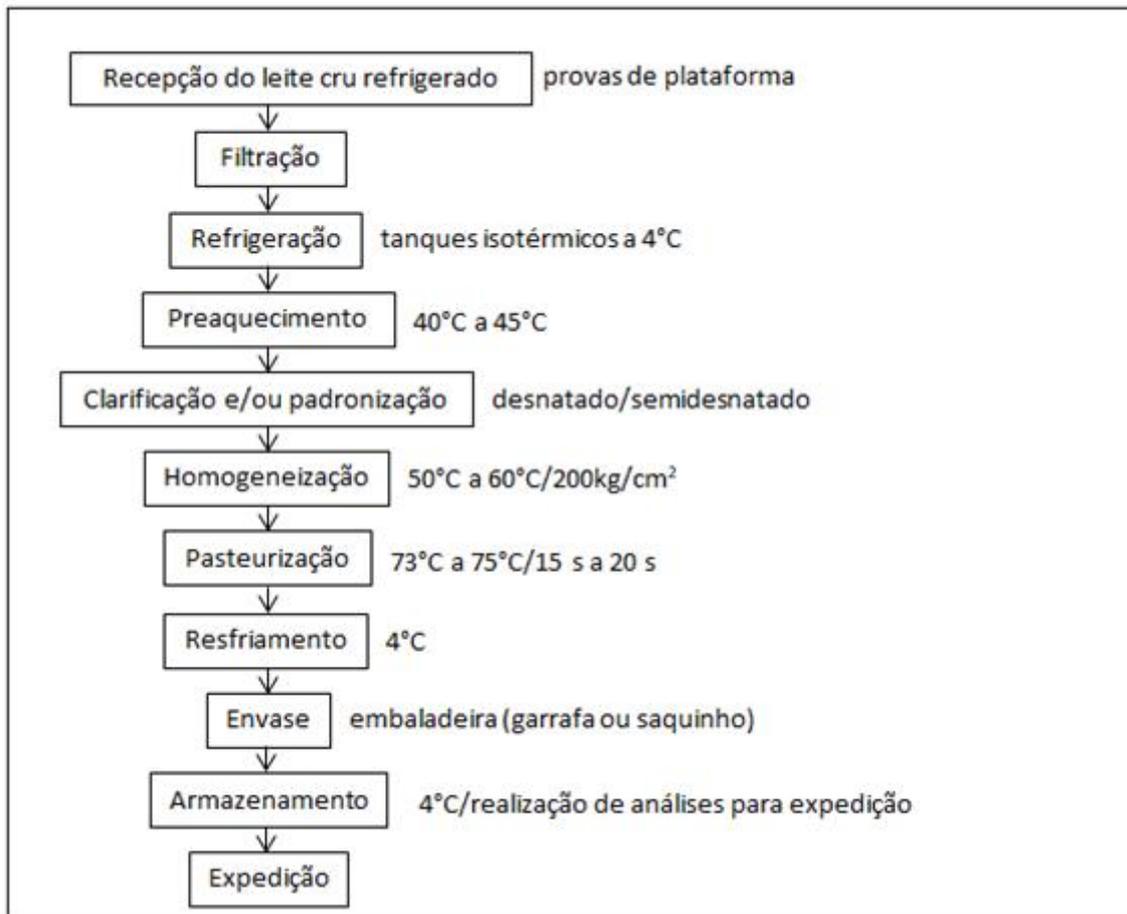
Já o leite pasteurizado é elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, que apresenta as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador. O processo de pasteurização deverá ser o mesmo já descrito para o leite pasteurizado tipo A.

No momento da recepção do leite cru refrigerado no laticínio, serão coletadas amostras do leite transportado e realizadas as seguintes análises (provas de plataforma): temperatura (máxima de 7 °C), teste do álcool/alizarol 72% (estável), acidez titulável (14 g a 18 g de ácido láctico/mL), índice crioscópico (-0,512 °C a -0,531 °C), densidade relativa a 15 °C (1,028 g/mL a 1,034 g/mL), teor de gordura (mínimo de 3%), pesquisa de peroxidase e fosfatase alcalina (quando o leite for oriundo de usina ou fábrica, as duas devem estar presentes), percentual de sólidos desengordurados (mínimo de 8,4%), proteínas (mínimo de 2,9 g/100 g), pesquisa de neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade e pesquisa de inibidores microbianos. Quanto

aos requisitos microbiológicos e de CCS, são para CBT máximo de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL e  $5,0 \times 10^5$  céls./mL (BRASIL, 2011).

O fluxograma de produção do leite pasteurizado pode ser visualizado na figura 1 abaixo.

**Figura 1.** Fluxograma básico de produção de leite pasteurizado utilizando pasteurização rápida.



Para a expedição do leite pasteurizado integral ser autorizada, ele deverá apresentar valor mínimo de 3% de gordura (para o leite desnatado no máximo 0,5% e para o semidesnatado de 2,9% a 0,6%), 14 g a 18 g de ácido láctico/mL, estabilidade na prova do alizarol 72%, mínimo de 8,4% de sólidos não gordurosos, índice crioscópico entre  $-0,512$  °C a  $-0,531$  °C. Em relação aos aspectos microbiológicos, deve ser analisada a presença de *Salmonella* spp., coliformes totais e termotolerantes e a contagem padrão em placas (BRASIL, 2011).

Admite-se ainda a utilização da pasteurização lenta, utilizando o binômio tempo/temperatura de 65 °C por 30 minutos, somente para fins filantrópicos e para a produção de derivados (BRASIL, 2011).

O processo de pasteurização do leite tem por finalidade reduzir quase toda a microbiota banal e a totalidade da microbiota patogênica do leite, procurando alterar o mínimo possível as propriedades organolépticas normais, a estrutura física, o equilíbrio químico, bem como as enzimas e as vitaminas. No entanto, esse processo tem algumas desvantagens, como a insolubilização parcial dos sais de cálcio, a inativação parcial de algumas vitaminas e algumas enzimas e a parcial caramelização da lactose, bem como a formação de compostos sulfidrílicos, originados dos aminoácidos sulfurados das proteínas, alterando o sabor do leite (sabor de cozido).

As falhas mais comuns durante o processamento do leite pasteurizado tipo A ou do pasteurizado consistem em não atingir o binômio temperatura/tempo da pasteurização, na queima do leite pelo uso da temperatura muito elevada e na coagulação do leite nas tubulações em decorrência da utilização de matéria-prima de baixa qualidade, como o uso do leite instável não ácido (LINA). Se o binômio tempo/temperatura não for atendido, o leite não pode mais ser destinado ao consumo direto, pois é proibido repasteurizar o leite, devendo ser destinado à fabricação de derivados.

### **3. LEITE TRATADO POR ULTRA ALTA TEMPERATURA (UAT)**

Entende-se por leite UAT (ultra alta temperatura), ou UHT (*ultra high temperature*), ou longa vida, o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura de 130 °C a 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1996).

Uma das vantagens desse produto é que ele dispensa refrigeração após o processamento. A indústria se beneficia comercialmente em razão do menor custo de estocagem e transporte, visto que o produto pode ser transportado por longas distâncias sem ocasionar perda de qualidade. Geralmente, esse aquecimento é realizado com a injeção de vapor direta ou indiretamente.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (BRASIL, 1996), esse leite pode ser considerado: a) leite integral; b) leite semi ou parcialmente destanadado; e c) leite desnatado. O produto será considerado integral quando tiver em sua composição no mínimo 3% de gordura; semidesnatado, entre 0,6% e 2,9%; e desnatado, no máximo 0,5% de gordura. Também pode ser denominado padronizado quando for utilizado o processo de padronização que visa regular o teor de gordura em 3%.

Em sua composição são admitidos o uso de aditivos e coadjuvantes de elaboração, como monofosfato, difosfato ou trifosfato de sódio, desde que não exceda 0,1 g/100 mL. A Anvisa permite a adição de citrato de sódio ou citrato trissódico no leite cru como estabilizante, para evitar a formação de precipitados proteicos.

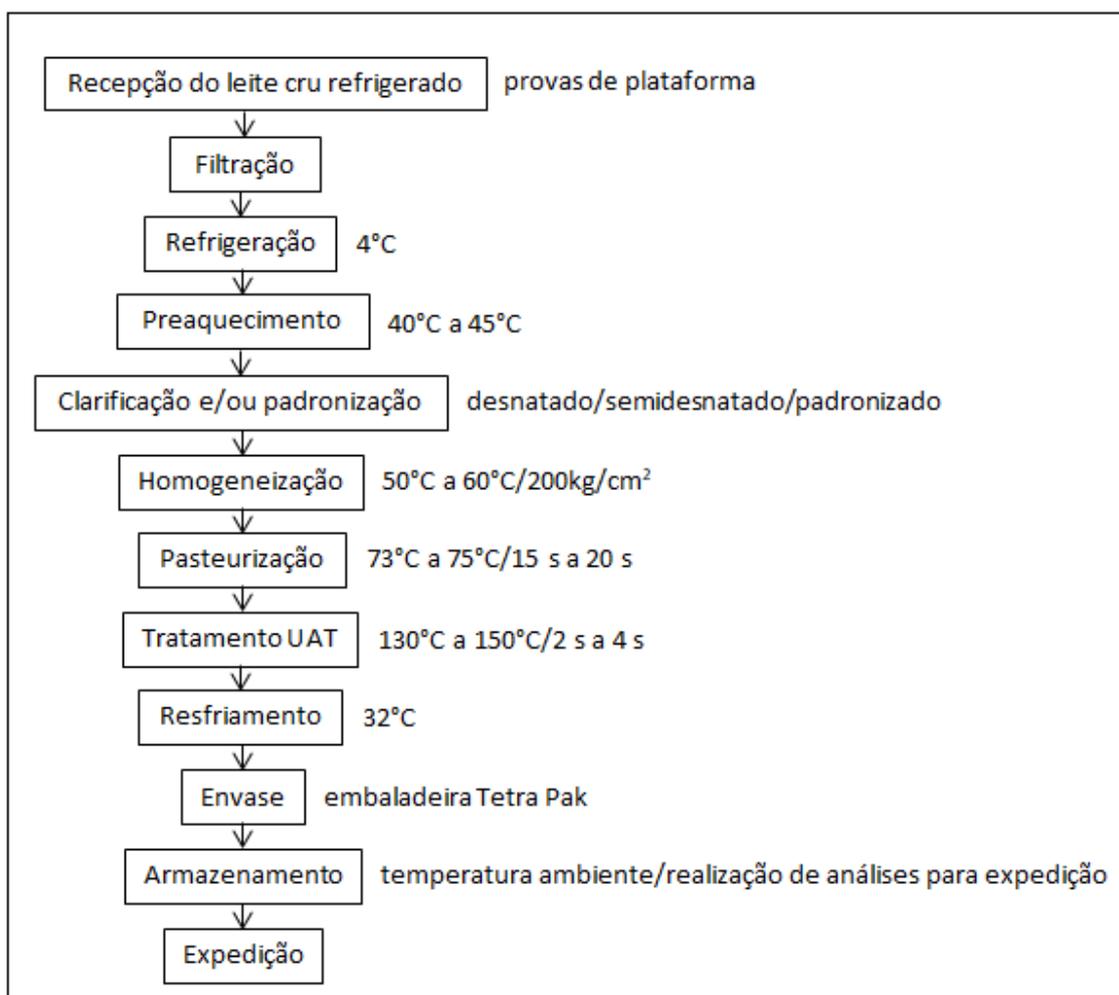
No processamento do leite tratado por UAT, o leite cru refrigerado será utilizado como matéria-prima, devendo ser submetido às análises de plataforma já descritas anteriormente (leite cru refrigerado) e estar a 4 °C, para então ser submetido a um preaquecimento a 40 °C a 45°C para melhorar o processo posterior de clarificação (remoção de sujidades) e padronização. Depois, será tratado termicamente pela pasteurização rápida e sofrerá aquecimento de 73 °C a 75°C por 15 a 20 segundos e também será homogeneizado (200 kg/cm<sup>2</sup>). Posteriormente será tratado termicamente por ultra alta temperatura (130 °C a 150 °C/2 a 4 segundos) e rapidamente resfriado a 32 °C para diminuir ao máximo as alterações térmicas e eliminar a água incorporada (por volta de 10%) quando o tratamento for por injeção de vapor.

O leite será submetido ao envase asséptico, em temperatura ambiente, em embalagens de material resistente, capaz de suportar as condições de transporte, comercialização e armazenamento e manter o produto longe de fatores externos de deterioração (luz, oxigênio e microrganismos). Comumente são utilizadas embalagens Tetra Pak<sup>®</sup> ou longa vida (formada por duas camadas de polietileno de baixa densidade, uma de alumínio, outra de polietileno, papel e polietileno), que são esterilizadas por peróxido de hidrogênio (30% a 35%) e ar quente (100 °C a 270 °C), na própria embaladeira, e o leite deve preencher a totalidade da embalagem. Após o envase, é realizada a aferição de pH de algumas amostras de leite para verificação da

esterilização comercial e testes de integridade de embalagem; posteriormente as embalagens são estocadas em temperaturas entre 15 °C e 25 °C, e a expedição do lote se dá após 7 dias.

O fluxograma de processamento do leite UAT pode ser visualizado na figura 2 abaixo.

**Figura 2.** Fluxograma básico de produção de leite tratado termicamente por ultra alta temperatura (UAT).



O leite integral UAT deverá possuir no mínimo 3% de gordura, acidez entre 14 g a 18 g de ácido láctico/mL (14 °D a 18 °D), ser estável ao etanol 68% e possuir no mínimo 8,2% de extrato seco desengordurado (BRASIL, 1996). Ainda, não deve ter microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição e, após uma incubação da embalagem fechada a 35 °C 37 °C, durante 7 dias, deve-se obedecer ao

seguinte critério microbiológico: contagem de microrganismos mesófilos inferior a 100 UFC/mL em todas as cinco unidades amostrais do lote.

A ocorrência de proteólise da caseína presente no leite UAT durante a estocagem do produto é um dos fatores mais importantes na limitação da vida de prateleira em razão das mudanças no sabor e na textura que ocorrem no produto, visto que menos de 50% das enzimas proteolíticas são inativadas e estas são capazes de quebrar as frações da micela de caseína ( $\kappa$ ,  $\alpha$  e  $\beta$ ) disponível no leite em peptídeos, resultando no aparecimento de sabor amargo graças à presença de peptídeos que possuem essa característica sensorial (MITECHEL & EWINGS; DATTA & DEETH, 2003, VIDAL et al., 2015).

Entre as alterações mais comuns decorrentes do tratamento por UAT, destacam-se: inativação de enzimas, desnaturação e formação de complexos ( $\beta$ -lactoglobulina e  $\kappa$ -caseína), reação de Maillard (escurecimento não enzimático), perda de vitaminas (10% do complexo B e quase a totalidade da vitamina C) e perda de aminoácidos.

As falhas mais comuns durante o processamento do leite UAT consistem em não atingir a temperatura/tempo de pasteurização utilizada, a queima do leite pelo excesso de temperatura e a presença de água acima do permitido por causa da não retirada do vapor injetado na serpentina no final do processo.

Recomenda-se que o leite utilizado como matéria-prima não possua pH inferior a 6,65 °C a 20 °C, a fim de não gerar instabilidade durante o processamento e, conseqüentemente, graves falhas.

#### **4. LEITE EM PÓ**

Entende-se por leite em pó o produto obtido por desidratação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1996).

Pode ser classificado de acordo com o tratamento térmico utilizado em seu processamento em baixo, médio e alto tratamento térmico, com conteúdo de nitrogênio da proteína do soro não desnaturada igual ou maior a 6 mg/g, entre 1,51 mg/g e 5,99 mg/g, e menor do que 1,50 mg/g, respectivamente. Ainda, pode ser classificado em instantâneo ou não; integral (igual ou superior

a 26% de gordura), semidesnatado (1,5% a 26,9%) ou desnatado (inferior a 1,5%) (BRASIL, 1996).

A água é eliminada através de um processo que envolve operações unitárias, evaporação e secagem por pulverização (atomização, nebulização), restando o extrato seco do leite e uma pequena quantidade de água.

A matéria-prima a ser utilizada é o leite cru refrigerado, que será clarificado, padronizado e pasteurizado, como descrito anteriormente para o leite UAT, e após a pasteurização será homogeneizado para melhorar a solubilidade do pó, além de influenciar na digestibilidade e sabor. Na sequência, ocorrerá a concentração por evaporação para eliminação parcial da água e redução de custos da posterior desidratação total. O leite concentrado será evaporado e depois será borrifado ou atomização com pequenas gotículas em câmaras secas ou torres de secagem com elevadas temperaturas para sua desidratação. O pó resultante será retirado por gravidade, resfriado e envasado assepticamente em embalagens estéreis, dispensando refrigeração.

No processamento do leite, adota-se a evaporação para a retirada de água em menor temperatura (50 °C) até atingir concentração de 30% a 40% de extrato seco, que impede o desenvolvimento de microrganismos e ocasiona menores alterações pela ação do calor, nos constituintes e nas propriedades do leite, reduzindo, assim, os custos da desidratação total. Se esse processo não fosse utilizado, geraria partículas com grande quantidade de ar e menor solubilidade em água.

Na desidratação ou secagem, que consiste na eliminação de água mediante a aplicação de calor a temperatura elevada (150 °C a 300 °C) com secador *spray dryer*. Essa técnica possibilita a transformação do leite até então concentrado em leite em pó. Posteriormente, o leite em pó pode passar pelo processo de aglomeração (instantaneização), que consiste em aglomerar as partículas em tamanhos superiores a 100 µm para evitar que ocorra o umedecimento superficial das partículas e que as proteínas e hidrocolóides formem um gel que impede a penetração da água, formando “bolsas de pó seco e ar” que somente se dispersam por ação mecânica. Quando ocorre a utilização desse processo, os produtos deverão ser denominados instantâneos.

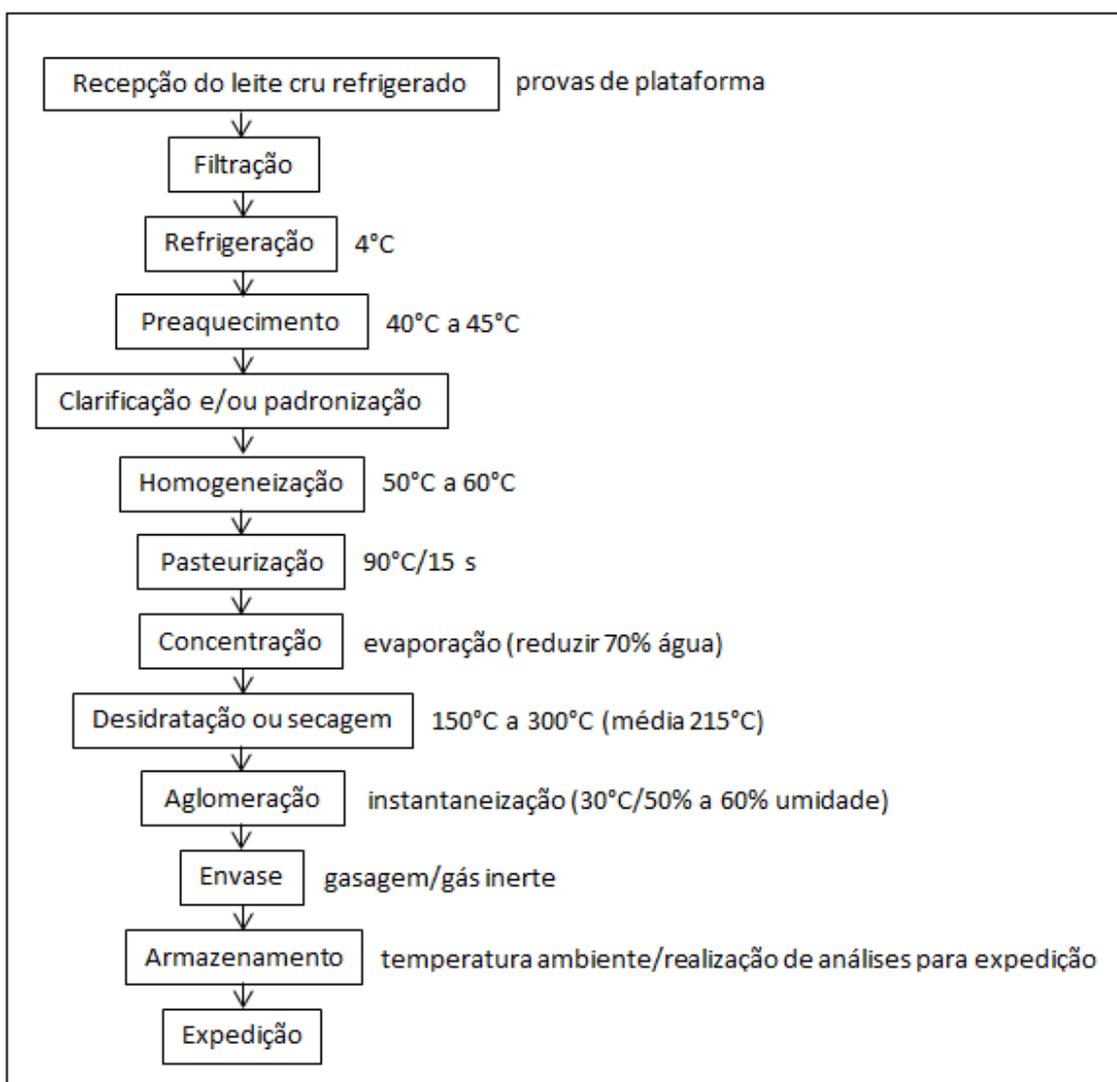
É aceita a adição de lecitina como emulsionante, na proporção de 5g/kg, para a elaboração de leites instantâneos e antiulectantes com utilização

restrita ao leite em pó a ser utilizado em máquina automática de venda (BRASIL, 1996).

Após a secagem, o leite em pó é envasado em embalagens próprias, sendo sugado para o interior das latas; depois do enchimento, é realizada a gasagem (infusão de gás inerte) e recravação da lata. Caso sejam utilizadas embalagens plásticas, é feita a substituição da atmosfera interna das embalagens, que devem ser armazenadas em temperatura ambiente até o momento da expedição.

O fluxograma básico de produção do leite em pó pode ser visualizado abaixo (figura 3).

**Figura 3.** Fluxograma básico de produção de leite em pó.



O leite em pó integral deverá ter matéria gorda igual ou superior a 26%, umidade máxima de 4,0%, acidez titulável máxima de 18 °D, índice de solubilidade máximo de 1 e máximo de 15 mg de partículas queimadas. Ainda, deverá ser avaliado para a presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes e microrganismos aeróbios mesófilos (BRASIL, 1996).

O leite em pó desnatado possui validade de aproximadamente 3 anos enquanto o leite integral possui, no máximo, 6 meses de validade, pelo fato de a gordura do pó oxidar durante o armazenamento, com conseqüente deterioração e alteração do sabor (TETRA PAK, 2016).

Os principais fatores que influenciarão na qualidade do produto final são a viscosidade (influencia no tamanho das gotículas), habilidade espumante, acidez, umidade, solubilidade (diminui sob secagem severa ou quando o leite é mantido em temperatura elevada por longos períodos) e a taxa de rancidez hidrolítica e oxidação (NICOLINI, 2008).

Podem ser observadas algumas falhas tecnológicas do processamento, como a presença de sedimentos pela queima do leite durante a evaporação, presença de umidade excessiva nas embalagens, falhas durante a reidratação do produto instantaneizado e despadronização dos teores de sólidos totais.

Também podem ser observadas falhas tecnológicas durante o processamento, que acarretarão defeitos no produto final: temperatura de secagem elevada, ocasionando presença de sedimentos; valores de pH baixo, indicando uso de matéria-prima de baixa qualidade e ocasionando acidez; condições inadequadas de secagem, podendo causar elevação na umidade e perda do sabor e da solubilidade; problemas com homogeneização e temperatura; presença de oxigênio na embalagem, ocasionando oxidação; e problemas com a solubilidade geralmente ocasionados por acidez elevada, tempo de aquecimento, teor de sólidos e pressão de pulverização.

## **5. LEITES FERMENTADOS**

Entende-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do

leite, ou reconstituídos, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de microrganismos específicos. Esses microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante a vida de prateleira (BRASIL, 2007).

Em sua composição é obrigatória a utilização de leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura, cultivos de bactérias lácticas e/ou cultivos de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 2007).

Os ingredientes adicionais consistem em leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos. Também são ingredientes adicionais frutas em forma de pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas, mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café, amidos e açúcares (BRASIL, 2007). Os ingredientes opcionais não lácteos, sozinhos ou combinados, deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final.

No caso em que os ingredientes opcionais sejam exclusivamente açúcares, acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos e poliálcoois) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou se adicionam substâncias aromatizantes/saborizantes, classificam-se como leites fermentados com açúcar, açucarados ou adoçados e/ou aromatizados/saborizados (BRASIL, 2007). Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, antes, durante ou depois da fermentação, até um máximo de 30% (m/m), classificam-se como leites fermentados com adições (BRASIL, 2007).

No caso em que se mencione o uso de bifidobactérias, a contagem será de no mínimo  $10^6$  UFC de bifidobactérias/mL (BRASIL, 2007).

## 5.1 Iogurte

Iogurte pode ser definido como o produto lácteo cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por

sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Para processamento de iogurte é necessária a obtenção de matéria-prima de boa qualidade, isenta de inibidores, avaliada quanto a parâmetros de acidez, estabilidade térmica, densidade e carga microbiana. Após essa avaliação ocorrerá a padronização do leite por meio da adição de leite em pó ou concentrado com o objetivo de aumentar o teor de sólidos totais, aumentando assim consistência e incorporação de soro (aumento do ESD de 8,5% para 11%).

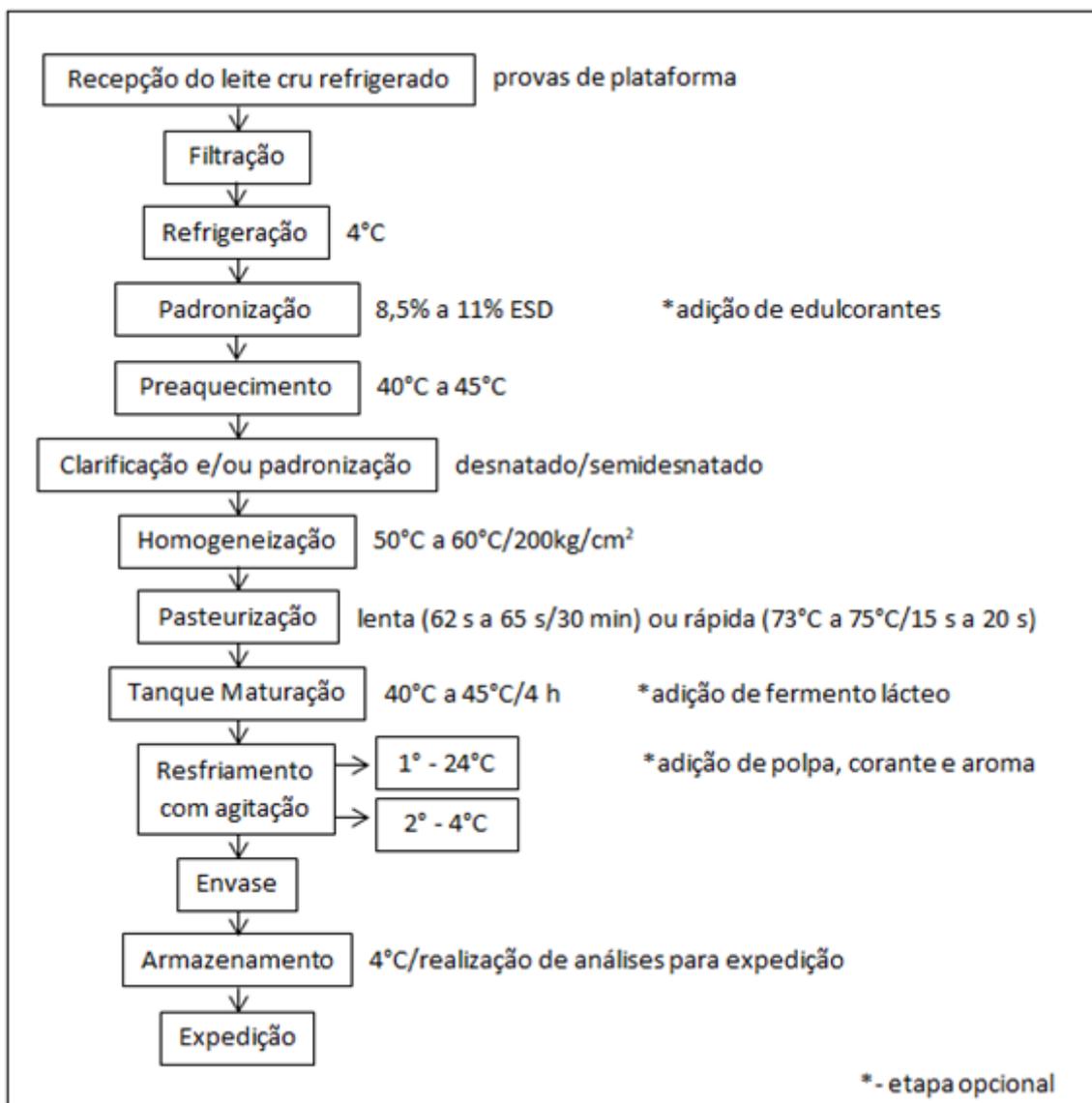
Posteriormente, será homogeneizado a fim de reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura, para prevenir a separação da gordura, melhorando a consistência e a viscosidade, além da estabilidade do coagulo, dando origem a um produto mais liso e cremoso. Essa fase deve ser realizada a uma temperatura entre 50 °C e 60 °C. A pasteurização deverá ser mais drástica que a utilizada para o leite fluido, pois com maior temperatura ocorre maior desnaturação da caseína e das proteínas do soro, levando a uma maior hidratação do coagulo, o que melhora a incorporação do soro, a consistência e a viscosidade do produto final. Para tal, pode ser utilizada tanto a pasteurização rápida como a lenta, levando em consideração a possibilidade de alterar o binômio tempo/temperatura.

Então, será transferido para um tanque maturador e resfriado a uma temperatura entre 40 °C e 45 °C, serão adicionados agentes edulcorantes (melhorar sabor), bem como corantes e aromas (estes podem ser adicionados antes ou após a fermentação), e inoculado o fermento. Após essa inoculação, recomenda-se uma homogeneização por dois minutos e posterior incubação por aproximadamente quatro horas para que ocorra a fermentação da lactose em ácido láctico e se estabeleça a coagulação ácida e o desenvolvimento das características sensoriais do produto, por meio da formação de um gel de aspecto liso, brilhoso, sem presença de gases ou liberação de soro. A acidez deve estar em torno de 70 °D a 72 °D, e o pH, em torno de 4,4 a 4,7.

O produto, então, é resfriado, para paralisar a multiplicação da cultura láctea. A redução da temperatura pode ser feita em duas etapas: inicialmente a 24 °C e depois a 4 °C,; no intervalo entre as duas etapas, adiciona-se a polpa.

A polpa de frutas é adicionada na proporção de 0,5% a 5% em relação ao volume total do leite, destacando-se a necessidade de serem monitoradas quanto à qualidade microbiológica, uma vez que o produto já foi pasteurizado. É indicado que o pH e a viscosidade da polpa sejam próximos aos do iogurte, para que não ocorra a separação de fases. Seu envase é feito em seguida, em embalagens de polietileno próprias (proteção do oxigênio, umidade e luz) e conservação em câmaras frias (4 °C) até o momento da expedição. O fluxograma de produção de iogurte pode ser visualizado na figura 4.

**Figura 4.** Fluxograma básico de produção de iogurte.



O iogurte integral deverá apresentar 3% a 5,9% de matéria gorda láctea, 2,9% de proteínas, 0,6 g a 1,5 g de ácido láctico/100g e conter no mínimo  $10^7$  UFC/g de bactérias lácticas totais. Ainda, deverá ser avaliado pela contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes e contagem de bolores e leveduras.

Seus principais defeitos de fabricação ocorrem por conservação excessivamente longa (sabor amargo), sabor similar ao do álcool (contaminação), ausência de aroma (má atividade do fermento – desequilíbrio da microbiota ou incubação utilizando baixa temperatura e/ou pequenos períodos), falta de acidez (incubação breve ou temperaturas baixas, pouco fermento ou presença de inibidores – resíduos químicos, antibióticos) e excesso de acidez (incubação longa, excesso de fermento, conservação longa ou resfriamento lento).

## **5.2 Coalhada**

Entende-se por coalhada o produto cuja fermentação se realiza por cultivos individuais ou mistos de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico (BRASIL, 2007).

Basicamente, o processo de produção consiste em selecionar um leite de boa qualidade e realizar a padronização e pasteurização rápida (73 °C a 75 °C/15 s a 20 s). Após, adiciona-se o fermento láctico, que utilizará a lactose e a transformará em ácido láctico e outros compostos característicos após a incubação entre 35 °C e 40 °C, formando um gel liso e brilhante, sem desprendimento de soro. Posteriormente, quebra-se a coalhada por agitação para realizar a homogeneização do produto (não deve incorporar ar, pois pode gerar instabilidade ao produto final) e realiza-se o resfriamento a aproximadamente 20 °C para realizar o envase e, após, a manutenção em temperaturas entre 2 °C e 5 °C.

Para que a coalhada tenha uma boa consistência, o leite deve ter um extrato seco desengordurado de 15%. Pode-se ainda adicionar leite em pó ou leite concentrado para aumentar o teor de sólidos.

O produto deverá ser avaliado microbiologicamente pela contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes e contagem

de bolores e leveduras. Em relação aos parâmetros físico-químicos, exige-se que a coalhada apresente de 0,6 g a 2,0 g de ácido láctico/100g.

Os principais defeitos que podem ocorrer nesse tipo de produto são o desenvolvimento insuficiente de acidez (resíduos de antibióticos que não permitem a fermentação adequada ou presença de microrganismos competidores pelo substrato), produção de gás (leveduras), baixa viscosidade (baixos teores de sólidos totais) e sabor excessivamente ácido (fermentação demasiada, baixa velocidade de resfriamento após incubação).

## **6. QUEIJOS**

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação e queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (BRASIL, 1996).

Em sua composição, é obrigatória a utilização de leite pasteurizado e/ou reconstituído integral, semidesnatado ou desnatado e/ou soro de leite, além de coagulante apropriado. Como ingredientes adicionais, é permitida a adição de cultivos de bactérias lácteas ou outros microrganismos específicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, caseína, caseinatos, sólidos de origem láctea, condimentos ou outros ingredientes opcionais permitidos somente conforme o previsto, explicitamente, nos padrões individuais definidos para a variedade de queijo (BRASIL, 1996).

De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em porcentagem, os queijos classificam-se em: a) extra gordo ou duplo creme (mínimo de 60%); b) gordo (entre 45% e 59,9%); c) semigordo (entre 25% e 44,9%); d) magro (entre 10% e 24,9%); e e) desnatado (menos de 10%) (BRASIL, 1996).

De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classificam-se em: a) queijo de baixa umidade (geralmente conhecido como queijo de massa dura): umidade de até 35,9%; b) queijo de média umidade (geralmente conhecido como queijo de massa semidura): umidade entre 36% e 45,9%; c) queijo de alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou "macio"): umidade entre 46% e 54,9%; e d) queijo de muita alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou "mole"): umidade não inferior a 55% (BRASIL, 1996).

Os queijos ainda podem ser divididos em queijo de massa crua, de massa semicozida e de massa cozida. Os queijos de massa crua poderão ser comercializados sem cura (queijo minas frescal) ou curado por bactérias (meia-cura) ou por fungos (gorgonzola). Já os queijos de massa semicozida poderão ser considerados como de cura rápida (Gouda – 1 a 2 meses) ou longa (Cheddar – 3 meses ou mais). Já entre os queijos de massa cozidas, podemos destacar a muçarela.

Nas etapas iniciais da produção dos queijos, o coágulo do leite poderá ser obtido tanto pela coagulação ácida como pela coagulação enzimática. A coagulação enzimática se dará pela utilização de enzimas coagulantes, como a quimosina e renina, as quais irão hidrolisar micelas de caseína do leite e permitir a aglomeração delas com formação do gel (coágulo).

Na primeira fase da coagulação, ocorre a ação da enzima coagulante à fração k-caseína (quebra da ligação peptídica Phe<sub>105</sub> – Met<sub>106</sub>), com consequente liberação de uma fração proteica denominada glicomacropéptido. Essa fração liberada é solúvel e, por isso, se perde no soro afetando diretamente o rendimento na fabricação dos queijos. Na sequência, observa-se a segunda fase, que corresponde à formação do gel de coalhada, em que todos os componentes (proteínas, gordura, lactose e sais minerais) são aprisionados em uma estrutura de gel, que, após o processo de corte e demais tratamentos, dá origem aos queijos (paracaseinato de cálcio). Já a terceira e última fase corresponde à participação da enzima na maturação do queijo, evidenciando que sua ação pode conduzir à formação de sabor amargo quando excessivamente proteolítico.

O gel de coalhada formado é bastante estável, mas apresenta sinérese (saída do soro) quando o coágulo é cortado ou quebrado. Pelo controle da sinérese, deve-se controlar o conteúdo de umidade da massa do queijo e

também o grau e a extensão da maturação e a estabilidade do queijo. A sinérese é promovida pela menor espessura do corte, pH baixo, presença de íons cálcio, aumento da temperatura e mexedura da coalhada.

O corte do coágulo deve ser efetuado no ponto de corte adequado para um bom rendimento industrial. Para verificar se o coágulo está no ponto de corte, é necessário observar sua resistência, por exemplo, pelo fácil desprendimento do coágulo das paredes do tanque, quando nele se exerce uma leve pressão com as mãos ou com uma espátula. O objetivo dessa etapa é aumentar a área superficial das partículas de massa, o que, por sua vez, permite a expulsão do soro e um aquecimento mais uniforme de todas as partículas de massa no tanque. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a sinérese e, conseqüentemente, menos a umidade do queijo. É por essa razão que, ao se produzir queijos moles e mais úmidos, o coágulo é cortado em partículas (grãos) maiores (1 cm<sup>3</sup> a 2 cm<sup>3</sup>); já quando se produzem queijos semiduros ou duros, as partículas apresentam o tamanho de grãos de milho (semiduros) e de arroz (duros).

A coagulação ácida é obtida por via biológica através da produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento ou pela adição direta de ácidos orgânicos ao leite. Esse tipo de coagulação é usado em número limitado de tipos de queijo, como o *cream cheese*. O pH cai para próximo de 5,0 (entre 5 e 20 horas), dependendo do tipo de queijo que será produzido. A acidificação é proporcionada pela fermentação da lactose para ácido láctico pelas bactérias lácticas adicionadas ao leite ou pela acidificação direta com adição de ácido láctico em alguns casos. Normalmente são utilizados os seguintes microrganismos: 1) os mesofílicos homofermentativos *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris*; 2) Os mesofílicos heterofermentativos *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*; e 3) os fermentos termofílicos *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

A produção de ácido desempenha vários papéis na fabricação de queijos: controla e previne a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas; afeta a retenção e a atividade do coagulante durante a coagulação; solubiliza fosfato de cálcio afetando, portanto, a textura do queijo;

promove sinérese e, conseqüentemente, influencia a composição do queijo e também a atividade de enzimas durante a maturação.

Quando o ponto final da fabricação no tanque é obtido, isto é, atinge-se o pH e o conteúdo de umidade desejado, a massa é separada do soro e colocada em formas de tamanho e formatos específicos para que ocorra a drenagem do soro entre os grãos e se forme uma massa contínua e homogênea. Os queijos de alta umidade formam uma massa contínua sem a necessidade de sofrer prensagem, mas os queijos de baixa umidade necessitam da etapa de prensagem. Posteriormente, é realizada a salga, por meio de salmoura ou a seco. A salga a seco é recomendada para queijos mais úmidos, sendo o sal espalhado na superfície externa do produto. Já a salga em salmoura a cerca de 20% de NaCl é recomendada para a maioria dos queijos, com a determinação do período de imersão variando de acordo com o tipo de queijo que será produzido.

Os queijos, ainda, poderão passar pelo processo de maturação. Esse processo altera a composição química dos queijos, sendo o período de maturação variável para cada tipo. É neste processo que se desenvolvem as características organolépticas e de textura de cada um deles, graças às ações proteolíticas e lipolíticas, sendo realizada em câmaras com controle de temperatura e de umidade.

As etapas posteriores utilizadas na produção dos queijos são muito variáveis, visto que são produtos com características sensoriais e físico-químicas distintas, as quais são descritas nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade específicos para os diferentes tipos de queijo.

Ressalta-se aqui, entretanto, que as análises microbiológicas exigidas para os queijos possam ser expedidas nas indústrias deverão atender aos requisitos estabelecidos pelo Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões Microbiológicos para Queijos, publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nesse regulamento estão descritos os pré-requisitos em relação aos indicadores microbiológicos para a análise dos seguintes tipos de queijo: a) queijos de baixa umidade (< 36%); b) queijos de média umidade (36% < umidade < 46%); c) queijos de alta umidade (46% < umidade < 55%) –excetuando-se os queijos quartirola, cremoso, crioulo e minas frescal; d) queijos quartirola, cremoso, crioulo e minas frescal; e) queijos de muito alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundantes

(umidade > 55%); f) queijos de mais alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundantes (umidade > 55%); g) queijos ralados; h) queijos fundidos ou reelaborados e queijos processados por UHT ou UAT. Os microrganismos indicadores utilizados para esses produtos são o grupo dos coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e os bolores e leveduras, os quais poderão estar contemplados especificamente para cada tipo de produto.

Em relação aos parâmetros físico-químicos, os queijos serão avaliados em relação a seu teor de umidade e à quantificação de sólidos gordurosos.

Alguns tipos de queijo serão abordados individualmente a seguir, em relação a suas características de produção, e de acordo com as definições presentes no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017).

### **6.1 Minas frescal**

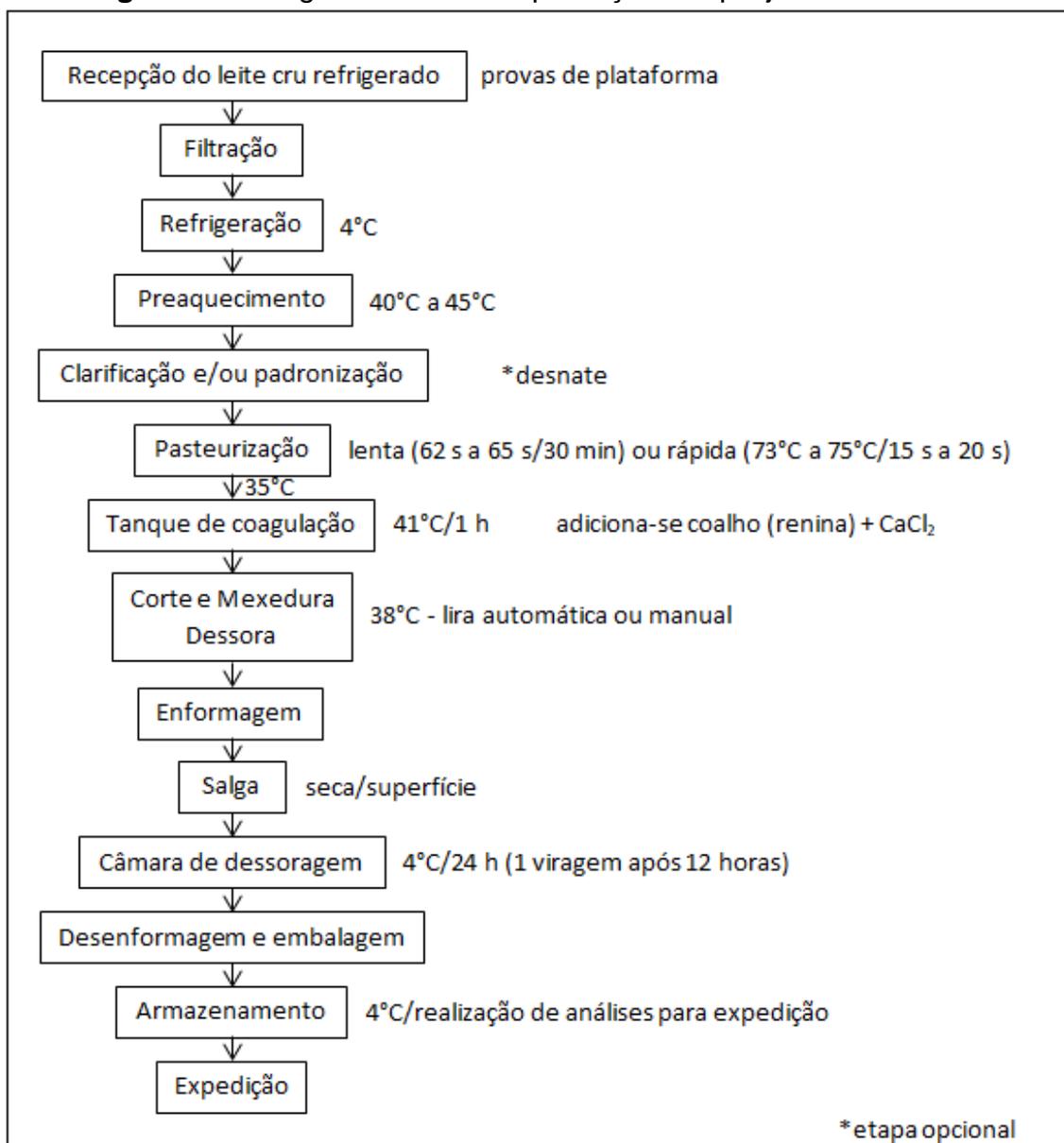
Entende-se por queijo minas frescal o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É considerado um queijo fresco de massa crua, não maturada ou cozida, e de elevada umidade. Deve obrigatoriamente ser elaborado com leite pasteurizado e possuir sabor fresco, lácteo e suave.

O processo de produção do queijo minas frescal se inicia com a obtenção do leite cru refrigerado que será utilizado como matéria-prima. Esse leite será submetido às análises de plataforma e posteriormente pasteurizado (para reduzir a carga microbiana e desnaturar enzimas responsáveis pelo aparecimento de sabor e aromas estranhos), como já descrito anteriormente (pasteurização rápida ou lenta). Em seguida, o leite será resfriado a 35 °C, quando, então, será adicionado o coalho na proporção de 1% (que promoverá a coagulação da caseína) e o cloreto de cálcio (para recuperar o cálcio que foi insolubilizado durante a pasteurização e melhorar a consistência do coágulo), e será incubado a aproximadamente 41 °C durante cerca de uma hora (essa temperatura e esse tempo são variáveis) até a formação do coágulo desejado.

Após a coagulação, é realizado o corte (utilizando a lira) e a mexedura do coágulo (38 °C), a fim de gerar fragmentos menores para ocorrer a separação do soro. Depois do corte, a massa será colocada em formas e

levemente prensada (tal etapa não é obrigatória para todos os tipos de queijo), para posteriormente ser realizada a salga, normalmente seca, com adição de sal na superfície do produto ou na massa – para as indústrias, é uma desvantagem adicionar sal na massa, pois o soro ficará salgado e não poderá ser aproveitado para fazer bebida láctea. Após 24 horas de armazenamento em câmaras a 4 °C, o queijo será desenformado e embalado (embalagens plásticas transparentes) e armazenado a 4 °C a expedição. O fluxograma de produção do queijo minas frescal pode ser visualizado abaixo (figura 6).

**Figura 6.** Fluxograma básico de produção de queijo minas frescal.



Na análise da condição microbiológica do queijo minas frescal, serão avaliados os microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Os principais defeitos observados são os queijos moles (com alta umidade por causa da mexedura ou da dessoragem deficiente), queijos duros (excesso de coalho ou cálcio ou corte da massa e dessoragem excessiva), presença de sabor amargo (adição excessiva de coalho ou coalho de baixa qualidade) ou ácido (utilização de leite de má qualidade higiênico-sanitária) e a ocorrência de estufamento precoce de embalagens pela presença de *E. coli*.

## **6.2 Gorgonzola**

Segundo o Regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade de queijo azul (BRASIL, 1997), entende-se por queijo azul o produto obtido da coagulação do leite através de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, e mediante um processo de fabricação que utiliza fungos específicos (*Penicillium roqueforti*), complementados ou não pela ação de fungos e/ou leveduras subsidiárias, encarregadas de conferir ao produto características típicas durante os processos de elaboração e maturação. Será denominado Queijo Azul e opcionalmente poderá denominar-se Queijo Gorgonzola ou Queijo Roquefort.

É considerado um queijo gordo, de massa crua, feito com leite pasteurizado integral. Entre 5 e 11 dias de maturação, é perfurado com agulhas de aço para que ocorra a entrada de oxigênio e eliminação de gás carbônico e o desenvolvimento do *Penicillium roqueforti*. Assim, a cultura vai se multiplicando em toda a massa do queijo e criando o aspecto de mofo azul.

Deverá apresentar formato cilíndrico, faces planas e bordas retas, formando ângulo vivo; peso entre 2 kg e 2,2 kg; crosta fina, úmida, pegajosa, de cor amarelada; consistência mole, esfarelante, com untura manteigosa; textura fechada ou com poucos e pequenos buracos mecânicos; e cor branco-

creme, apresentando as formações características verde-azuladas bem distribuídas, geradas pelo *P. roqueforti*.

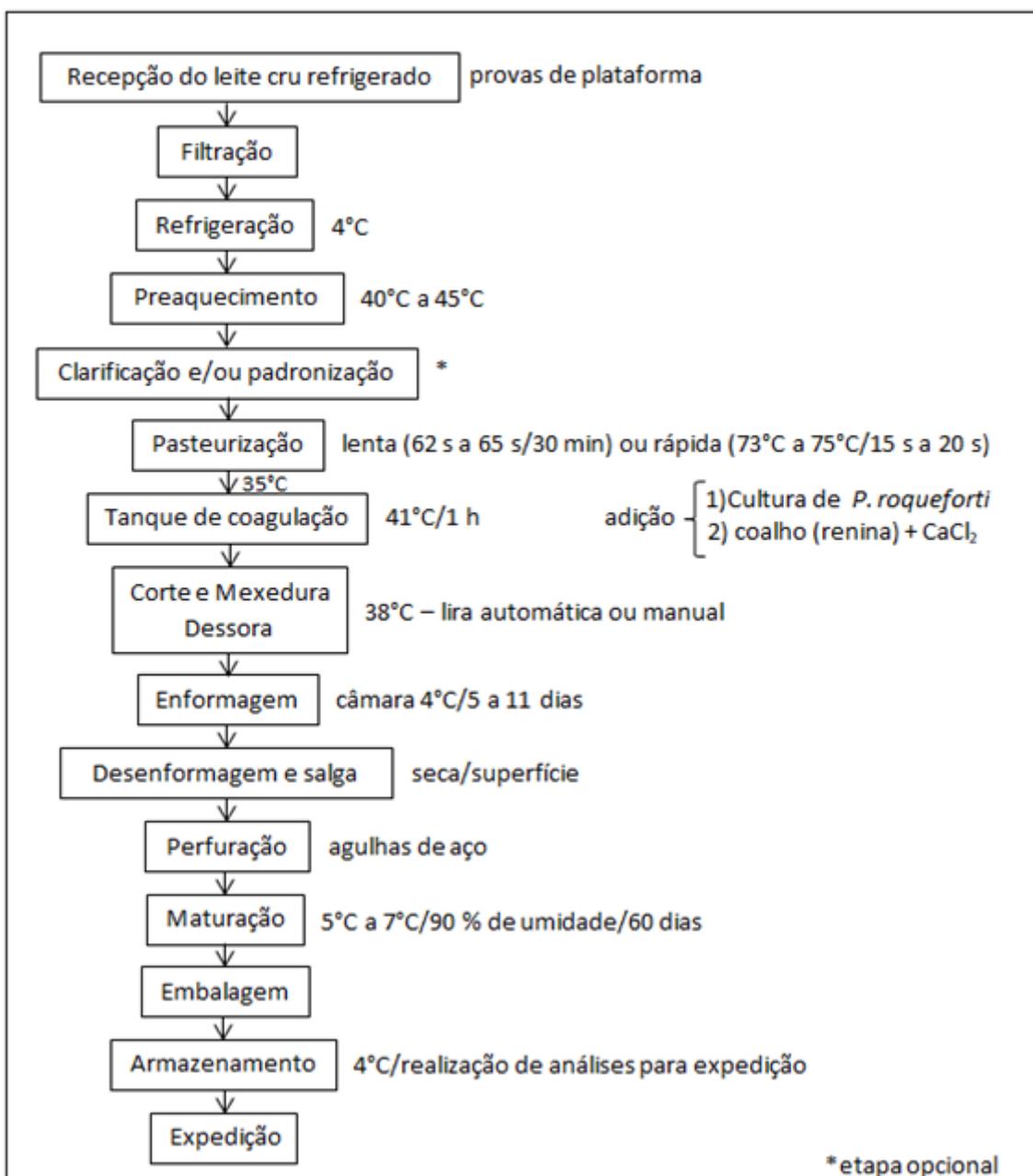
No fluxograma da produção do queijo tipo gorgonzola, pode-se observar que as etapas de pasteurização, resfriamento, adição do coalho e do cloreto de cálcio, coagulação, corte, mexedura, dessoragem e enformagem são realizadas igualmente às já descritas para o queijo minas frescal. A diferença observada no início do processo é a adição do microrganismo (*P. roqueforti*) anteriormente à adição do coalho, visto que este será o responsável pelo desenvolvimento dos aspectos sensoriais característicos do produto.

Após o processo de salga, o queijo será ainda submetido ao processo de perfuração e maturação (câmara mantida entre 5 °C e 7 °C e a umidade a 90%) por mais 60 dias, quando ocorrerá a multiplicação do microrganismo e o desenvolvimento de alterações que irão conferir as características do produto. A maturação termina quando a massa do queijo se torna macia, apresenta coloração amarelada, intensa e extensa ramificação pelo desenvolvimento do microrganismo, sabor ligeiramente picante e crosta rosada tendendo a rachar. Assim, o queijo será embalado (embalagens laminadas, para evitar a entrada de luz e oxigênio) e acondicionado em câmaras a 4 °C para posteriormente ser expedido.

Os principais defeitos observados são em relação a consistência (dessoragem ou corte ou cálcio), massa heterogênea, desenvolvimento da cultura (relacionado com tempo/temperatura/umidade durante a maturação) e sabores e odores indesejáveis, normalmente decorrentes do desenvolvimento de outros microrganismos.

O fluxograma de produção de queijo gorgonzola pode ser visualizado na figura 7.

**Figura 7.** Fluxograma básico de produção de queijo gorgonzola.



### 6.3 Muçarela

Muçarela é o queijo que se obtém por filagem de uma massa acidificada, (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas.

É produzida utilizando a filagem da massa, ou seja, o processo de esticamento e rejunção da massa acidificada e fermentada. Após a filagem, é

enformada em formas retangulares. É um produto consumido após maturação de aproximadamente 11 dias, devendo durar no mínimo 24 horas.

Para a produção da muçarela, o leite cru refrigerado, após ser submetido às análises de plataforma, será pasteurizado. Em um tanque maturador, a 35 °C, o leite pasteurizado é adicionado de cloreto de cálcio, fermento (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e coalho (responsável pela hidrólise da k-caseína) e, ser depois de misturado, ficará em repouso por 45 minutos. A adição de cloreto de cálcio é necessária para aumentar o teor de cálcio solúvel no leite, pois o existente naturalmente fica indisponível quando o leite é pasteurizado. Caso não seja adicionado, o processo será lento e incompleto.

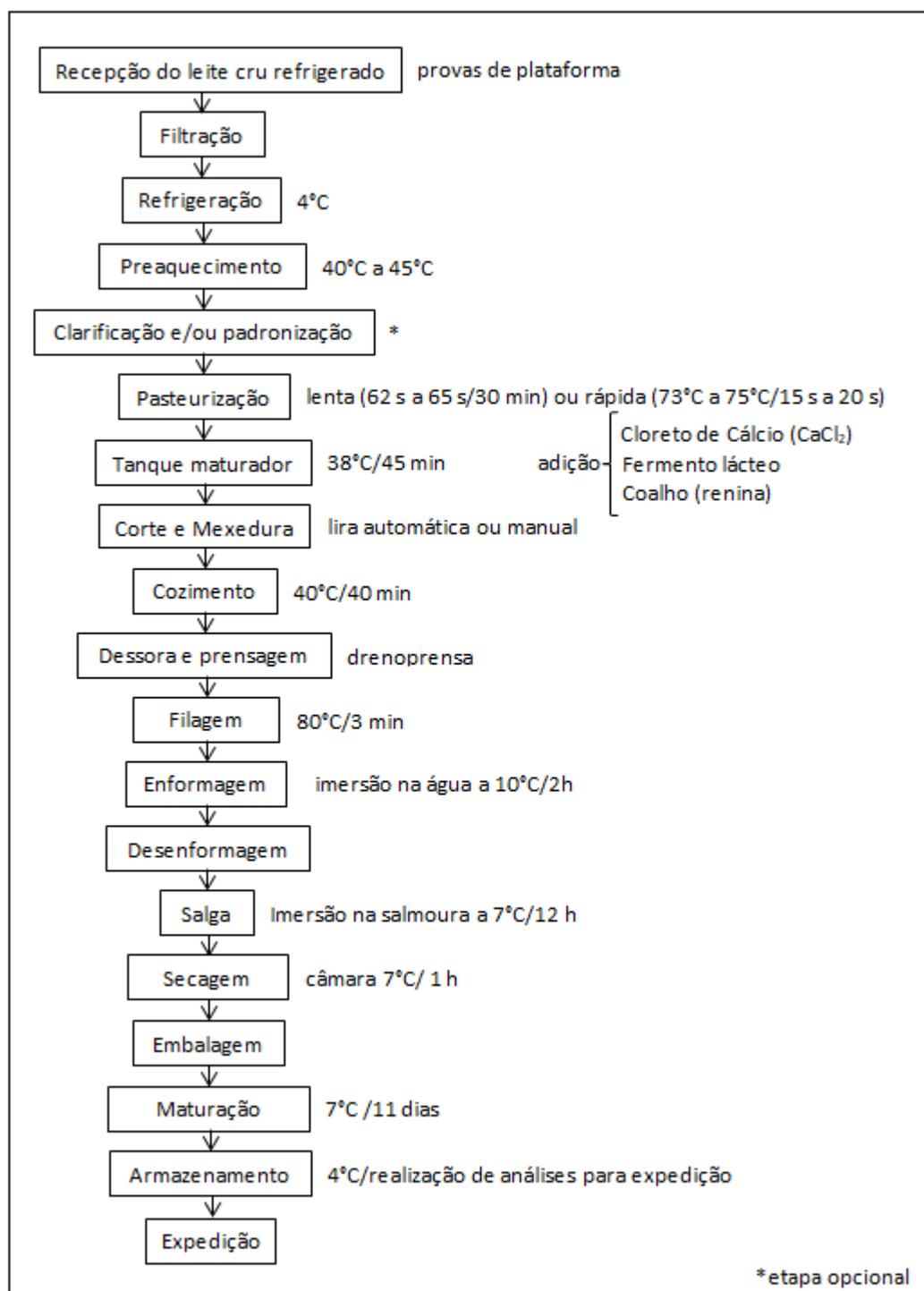
Em seguida, é realizado o corte da massa utilizando liras (verificar o ponto de corte: com as costas da mão, fazer uma leve pressão sobre a superfície da massa próximo à parede do recipiente onde está sendo feito o queijo; se a massa se desprender facilmente da parede, é sinal de que a já está no ponto de corte) em tamanhos de 1,0 cm de aresta.

Efetua-se o cozimento da massa a aproximadamente 40 °C por 40 minutos, para posteriormente ser dessorada e prensada. Então essa massa amorfa será submetida à filagem (80 °C por 2 a 3 minutos) utilizando uma massa ácida (pH entre 5,1 e 5,4), que consiste em sovar a massa do queijo a cerca de 80 °C para que ela ganhe um aspecto de textura alongada, lembrando fibras. Depois de filada, a massa será enformada e, na sequência, desenformada. Após essa etapa, ela será salgada em salmoura (aproximadamente 20%) em temperatura de 7 °C, embalada e mantida em câmaras para maturação durante 11 dias a 4 °C até o momento da expedição.

Alguns defeitos podem ser observados nesses produtos, como a presença de trincas internas (excesso de acidez ou falta de cálcio), presença de miolo interno por falhas na filagem, estufamento tardio (matéria-prima de má qualidade), massa ressecada (excessiva perda de gordura durante a filagem) e marmorização da casca (baixa temperatura na filagem ou massa de baixa acidez).

O fluxograma de produção de muçarela pode ser visualizado abaixo (figura 8).

**Figura 8** Fluxograma básico de produção de queijo muçarela.



#### 6.4 Parmesão

Por parmesão entende-se os queijos maturados que se obtêm por coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É um

queijo duro produzido com leite e ao qual se agrega lactobacilos termorresistentes (*Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, principalmente). É considerado um queijo de aroma e sabor intensos, e ao final do processo de maturação se apresentará picante e granado, graças à formação de cristais de tirosina na sua massa. À medida que envelhece, vai ficando macio e adocicado.

É considerado um queijo semigordo, com baixo teor de umidade, consistência dura, textura compacta e granulosa, com crosta espessa, de 4 mm a 8 mm, lisa e de cor amarelo-palha.

O processo de produção se inicia com a obtenção do leite cru refrigerado e, até o momento da salga, segue as mesmas etapas já descritas para o queijo minas frescal, com a diferença de que há a adição de fermento (composto de bactérias *Lactobacillus helveticus* ou *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus*) do corte da massa, que é feito em grãos muito menores (0,2 cm a 0,3 cm de aresta), a fim de promover uma maior dessoragem. Agita-se lentamente por uns 20 minutos e inicia-se o aquecimento indireto (no tanque maturador) até a temperatura final de 50 °C a 53 °C. O aquecimento deve ser realizado em duas etapas, uma primeira mais lenta (1°C a cada 2 a 3 min) até a temperatura de 43 °C a 44°C e uma segunda mais rápida (1 °C por minuto) até a temperatura final. Continua-se a mexedura até a obtenção do ponto (de 60 a 90 minutos após o corte). O tempo total de mexedura pode variar bastante, em função da evolução da acidez, da temperatura final escolhida e do teor de umidade desejado no produto acabado.

A fim de eliminar o soro, realiza-se a pré-prensagem da massa por cerca de 20 minutos com 20 lbs/po a 30 lbs/po ou com peso equivalente ao dobro do peso de massa obtida. Após a pré-prensagem, procede-se à enformagem em formas com dessoradores ou pano: os queijos serão prensados por cerca de três horas. Poderão, então, ficar nas formas até o dia seguinte ou serem conduzidos à salmoura tão logo atinjam um pH por volta de 5,5 a 5,7. Caso

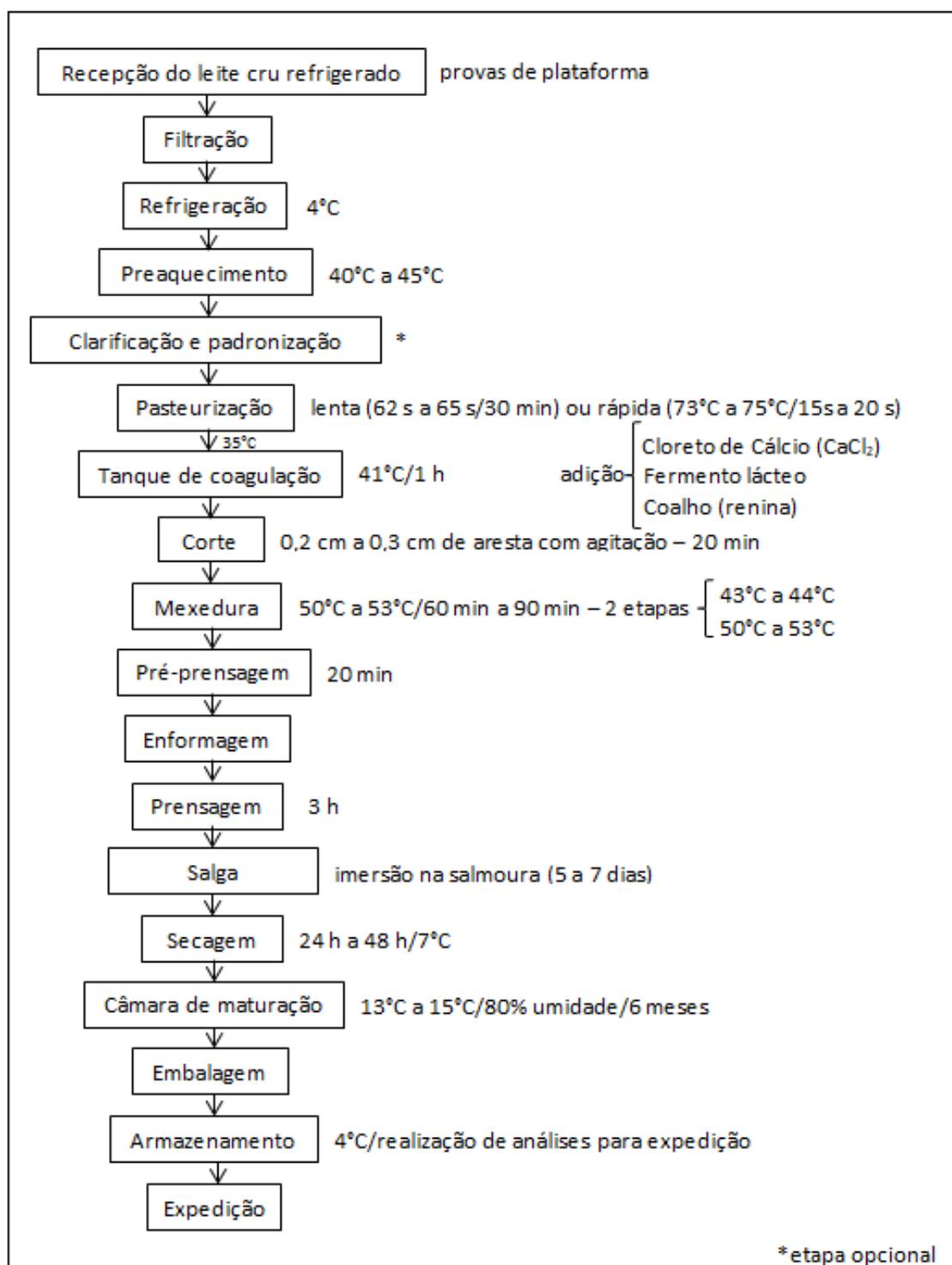
fiquem nas formas (sem prensagem), deve-se tirar os panos para formar uma casca lisa e bem-acabada.

O tempo de salga na salmoura (a 20% e a 10 °C a 12 °C) variará em função do peso do queijo. De um modo geral, uma forma de 5 kg permanecerá na salmoura por cerca de 5 a 7 dias, e uma forma de 7 a 8 kg, por até 14 dias. Após a salga, os queijos devem ser secados por 24 a 48 horas em câmara fria, sendo em seguida levados à câmara de maturação (13 °C a 15 °C) com umidade relativa do ar em torno de 80%, onde deverão ser maturados por no mínimo 6 meses, para o desenvolvimento de suas características ideais, devendo ser tratados de acordo com o seguinte esquema: viragem durante todo o período de maturação (a cada 3 dias nas primeiras semanas e a cada 7 dias durante o resto da cura); álcool absoluto: durante os primeiros 60 dias a cada 10 dias (prevenção de mofos); óleo de dendê ou linhaça: durante o restante do período de maturação a cada dois meses (formação da casca). Esses tratamentos podem ser substituídos desde o início da maturação, com aplicação de resina plástica logo após a salga (dois dias). Após a maturação, os queijos podem ser vendidos inteiros ou fatiados e embalados a vácuo.

Alguns defeitos que podem ocorrer no queijo parmesão são provenientes de qualidade da matéria-prima, tipo de fermento utilizado e balanceamento deste, pois os cocos são rápidos produtores de ácido e bacilos são os principais agentes proteolíticos na maturação, baixo teor de gordura do leite, ponto de corte da coalhada, tamanho dos grãos (o menor possível), temperatura de cozimento (52 °C a 53 °C), e período de maturação (mínimo de 6 meses, ideal de 1 a 2 anos).

O fluxograma de produção de queijo parmesão pode ser visualizado na figura 9 abaixo.

**Figura 9.** Fluxograma básico de produção de queijo parmesão.



### 6.5 Requeijão

Esse produto, originário do Brasil, possui textura cremosa e filável, sendo produzido com elevado teor de umidade. Trata-se de uma massa láctica enriquecida, que é submetida a um processo de fusão a quente.

Entende-se por requeijão o produto obtido pela fusão de massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionado de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. O produto poderá estar adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias (BRASIL, 1997).

Na produção do queijo fundido do tipo requeijão será utilizado o leite cru refrigerado, que será submetido às análises de plataforma, posteriormente padronizadas com relação ao teor de gordura, e pasteurizado. Em seguida, será aquecido a 80 °C e adicionado ácido láctico para que ocorra a coagulação ácida do leite, que, após as etapas de repouso, dessoragem e prensagem, dará origem à massa básica, na qual serão adicionados o sal, creme e água. A massa ácida pode ser obtida por diferentes maneiras: fermentação láctica (*Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*), acidificação direta (adiciona-se 0,28% de ácido láctico 85% diluído em água (1 : 10) ao leite aquecido entre 80 °C a 82 °C, seguido de 10 min de repouso) ou enzimática, pela adição de renina.

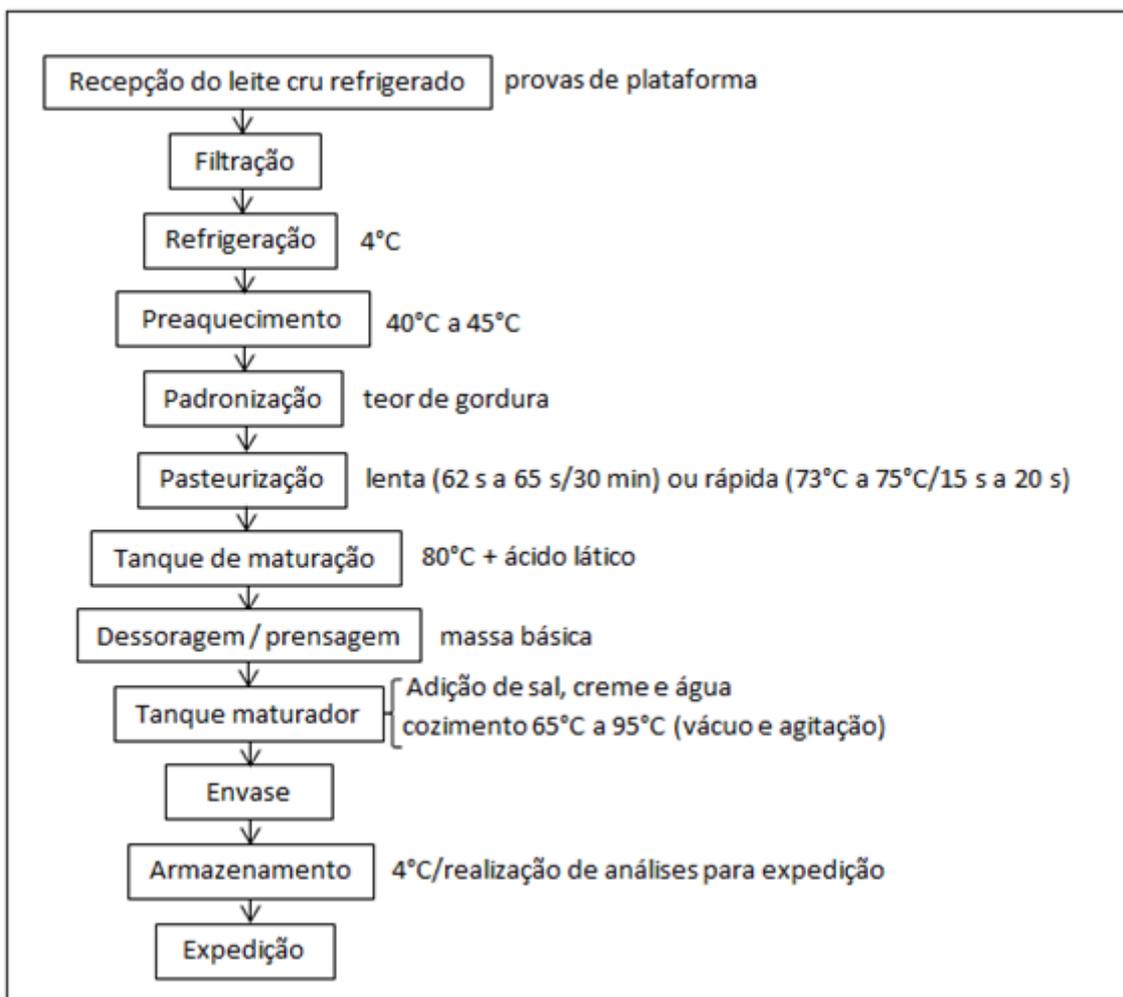
Esse produto será cozido em temperaturas que variam de 65 °C a 95 °C, normalmente utilizando duas etapas de aquecimento, sob vácuo e agitação da massa, para que ocorra a fusão da massa do produto de maneira adequada e ele se apresente no aspecto pastoso para ser embalado assepticamente em embalagens plásticas ou de vidro e mantido sob refrigeração a 4 °C e depois expedido.

De maneira geral e resumidamente, os principais defeitos dos queijos são: estufamento, putrefação, problemas de casca, baixo rendimento e aspectos sensoriais (sabor, odor) alterados. Para reduzir a ocorrência desses problemas, deve-se observar a utilização de um leite de boa qualidade, a realização de um processo de pasteurização eficaz e a adoção das boas práticas de fabricação e procedimentos de higienização utilizados nas indústrias. Ainda, deve-se verificar se o fermento produz a quantidade de ácido desejada no produto, atentar às temperaturas das câmaras de maturação, realizar a lavagem das cascas dos queijos utilizando solução salina, e verificar

presença excessiva de soro após processamento e falhas durante a padronização.

O fluxograma de produção do requeijão pode ser visualizado na figura 10.

**Figura 10.** Fluxograma básico de produção de requeijão.



## 6.6. Ricota

Ricota fresca é o queijo obtido pela precipitação ácida e quente de proteínas do soro do leite, com adição de leite de até 20% do seu volume (BRASIL, 2017).

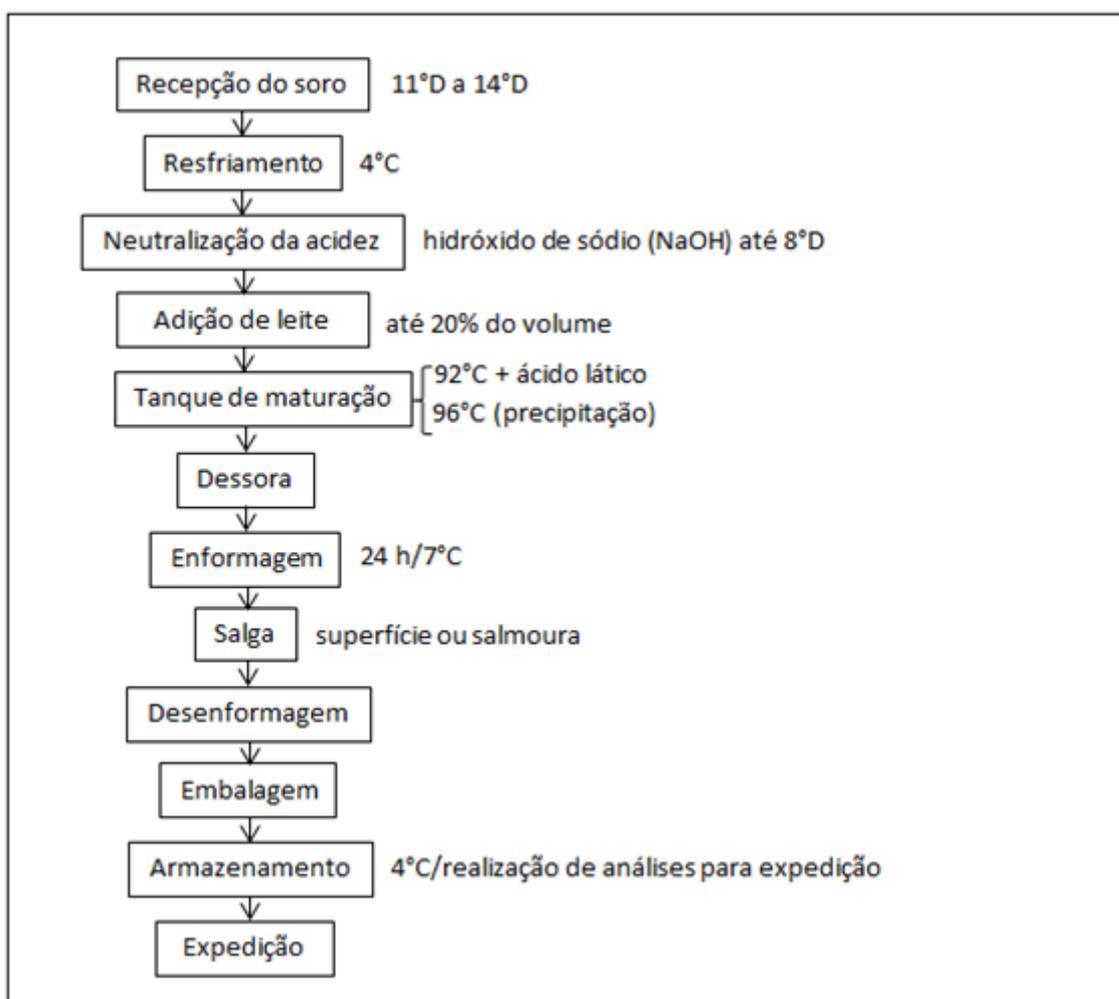
Nesse processamento, a matéria-prima utilizada será o soro (11 °D a 14 °D), que terá sua acidez reduzida através da adição de NaOH até atingir 8° D, podendo ser adicionado de leite (2% a 10%) para aumentar o rendimento. Posteriormente, o produto é aquecido até 92 °C, quando se realiza a

acidificação com ácido láctico (95%), aumenta-se a temperatura para 96 °C para que a massa apareça na superfície do soro (afloramento). Depois se procede a coleta, utilizando-se dessoradores. A massa é depositada diretamente em formas, seguido da salga (que é opcional e pode ser em superfície ou em salmoura). Após 24 horas, é realizada a desenformagem e a ricota é embalada e acondicionada em câmaras sendo mantida a 4 °C até o momento da expedição.

A ausência de padrões microbiológicos e físico-químicos permite uma grande diversidade de composição da ricota, dificultando a atuação dos profissionais dos serviços de fiscalização oficial.

O fluxograma de produção de ricota fresca pode ser visualizado a seguir (figura 13).

**Figura 11.** Fluxograma básico de produção de ricota fresca.



Alguns defeitos nesse produto podem ser observados, como o sabor amargo (matéria-prima de má qualidade), sabor ácido, estufamento precoce e tardio (microrganismos) e presença de fissuras e trincas.

## **7. BEBIDA LÁCTEA**

Entende-se por bebida láctea o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UAT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005).

Classifica-se como bebida láctea pasteurizada quando o produto foi submetido à temperatura de pasteurização lenta de 62 °C a 65 °C por 30 minutos e pasteurização rápida de 73 °C a 75 °C durante 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria, resfriada entre 2 e 5 °C e, em seguida, envasada. Também é classificada como bebida láctea UAT ou UHT quando submetida, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 2005).

Ainda, pode ser classificada como bebida láctea fermentada quando mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$  UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Em sua composição, é obrigatória a utilização de leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, concentrado, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado), soro de leite (líquido, concentrados e em pó) e culturas lácticas quando forem

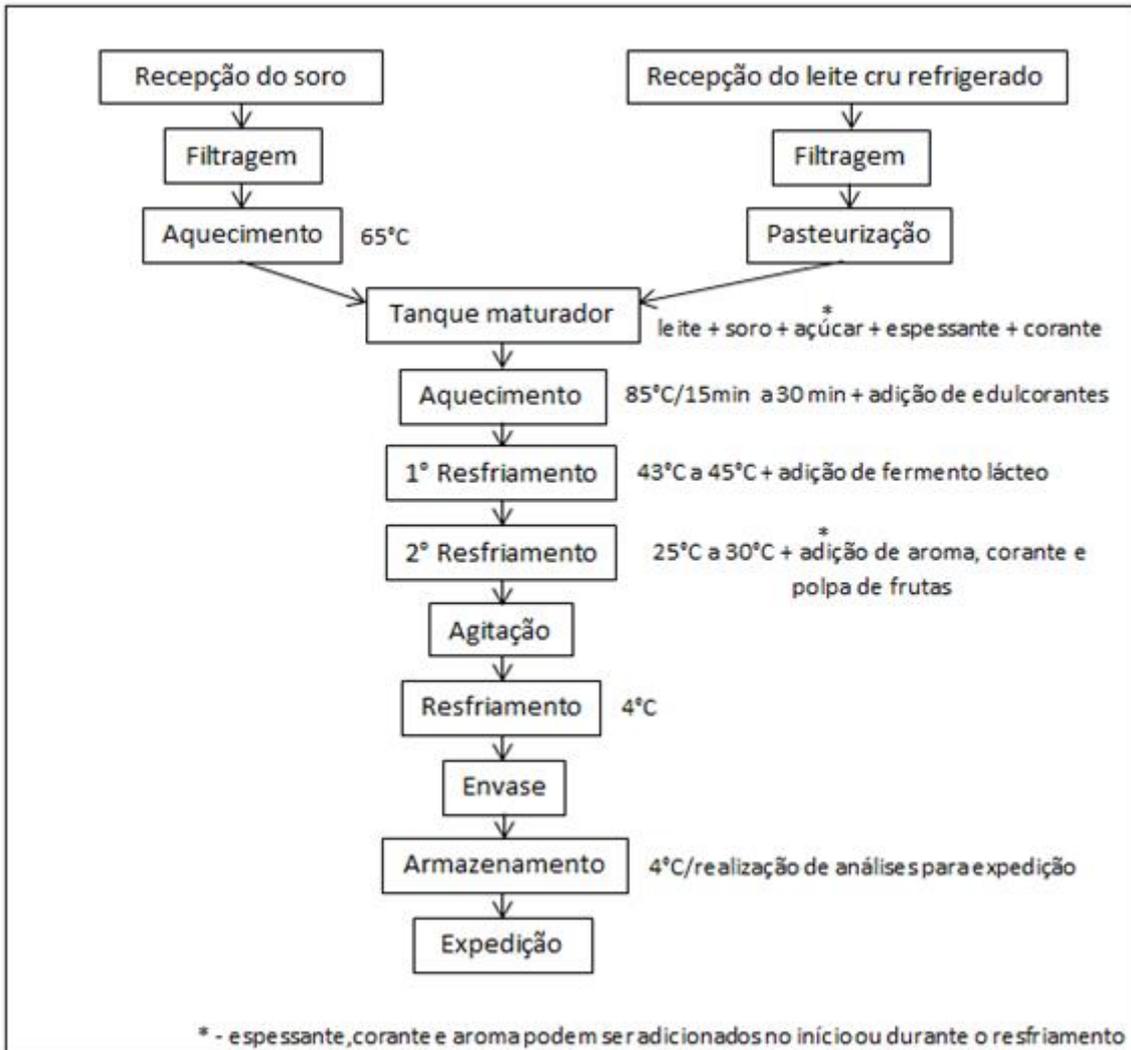
consideradas fermentadas. Deverão ser sempre avaliadas pela contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes e microrganismos aeróbios mesófilos

Os ingredientes opcionais são creme, sólidos de origem láctea, manteiga, gordura anidra do leite ou *butter oil*, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, leite e outros produtos de origem láctea, açúcares e/ou glicídios, maltodextrina, edulcorantes nutritivos e não nutritivos, frutas em pedaços/polpa/suco e outros preparados à base de frutas, mel, cereais, vegetais, gorduras vegetais, chocolate, frutas secas, café, especiarias e outros alimentos aromatizantes naturais e inócuos e/ou sabores, amidos ou amidos modificados, gelatina ou outros ingredientes, como acidulantes, aromatizantes, regulador de acidez, corantes, estabilizantes, emulsificadores, conservantes e espessantes (BRASIL, 2005).

Inicialmente, o soro utilizado deve ser de boa qualidade, obtido em boas condições de higiene e filtrado com utensílio apropriado para eliminar pequenos resíduos de massa de queijo que possam estar presentes, e estar a aproximadamente 65 °C. Ele então será misturado com o leite pasteurizado padronizado e essa mistura aquecida até a temperatura de 85 °C, por 15 a 30 minutos ou 90 °C por 5 minutos, para eliminar as bactérias contaminantes, promover modificações físico-químicas e melhorar as propriedades da coalhada que será formada durante a fabricação da bebida láctea, e também adicionado de edulcorante. Em seguida, o leite, em tanque de maturação, mantido em temperaturas em torno de 43 °C a 45°C, será adicionado de fermento, destacando-se que tal temperatura é importante para que ocorra a fermentação do produto até atingir pH em torno de 4,6 e para que ocorra o desenvolvimento das características sensoriais. Assim, o produto é resfriado entre 25 °C e 30 °C, a fim de cessar a fermentação, adicionado de aroma, corante e polpa de fruta, misturado e então resfriado a 4 °C, quando a bebida poderá ser envasada em garrafas ou potes apropriados, mantidos a esta temperatura em câmaras até o momento da expedição.

O fluxograma de produção da bebida láctea pode ser visualizado na figura 12 seguir.

**Figura 12.** Fluxograma básico de produção de bebida láctea pasteurizada.



A bebida láctea sem adição deverá apresentar no mínimo 1,7 g de proteínas de origem láctea/100 g do produto. Em relação aos parâmetros microbiológicos, será avaliada pela contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes, além da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis (bebida láctea pasteurizada e fermentada).

Os defeitos mais comuns encontrados em bebidas lácteas são a separação do soro (excesso de fermentação ou altas temperaturas), formação de grumos (excesso de fermentação ou altas temperaturas), textura não homogênea (bateção irregular), sabor ácido (excesso de fermentação) e textura excessivamente viscosa (desbalanceamento do fermento).

## 8. MANTEIGA

Com o nome manteiga, entende-se o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica de creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea. Opcionalmente, pode ser acrescentado cloreto de sódio (2 g/100 g) e fermentos lácteos selecionados, no caso de manteiga maturada (BRASIL, 1996).

Deverá apresentar consistência sólida, pastosa à temperatura de 20 °C, de textura lisa uniforme, untuosa, com distribuição uniforme de água (umidade), cor branco-amarelada sem manchas ou pontos de outra coloração, sabor suave, característico, aroma delicado, sem odor e sem sabor estranho. Deve apresentar no mínimo 80% de massa gorda (manteigas salgadas) ou 82% (manteigas sem sal) (BRASIL, 1996).

Pode ser classificada em manteiga extra ou de primeira qualidade. A principal diferença entre os produtos está no fato de que para o tipo extra se exige um creme classificado como extra, enquanto para a de primeira qualidade o creme poderá ser classificado como extra ou de primeira qualidade. Ainda, no caso da manteiga extra, a água de lavagem deverá ser potável, filtrada, clorada, refrigerada e armazenada em tanque de aço inoxidável.

Também pode ser classificada em manteiga comuns ou de segunda qualidade. Nesses casos, poderá ser produzida utilizando creme classificado como extra ou de primeira qualidade ou de segunda qualidade e permite-se a redução da acidez do creme quando seguida de pasteurização.

Permite-se a adição dos corantes naturais ou sintéticos (baixa orellana, beta caroteno e cúrcuma ou curcumina), idênticos aos naturais, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. Também se permite o uso de clorofilina ou clorofilina cúprica como descorante. Ainda, admite-se a adição de sais neutralizantes, em uma quantidade máxima de 2.000 mg/kg, isolados ou combinados: ortofosfato de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio (BRASIL, 1996).

Para obtenção do creme a ser utilizado como matéria-prima, o leite deverá sofrer desnatado artificial (submetido à centrifugação com cerca de 6.000 rpm) ou natural (leite em repouso por aproximadamente 12 horas). Para que o desnatado seja bem feito, é importante que o leite fique a uma temperatura baixa e que, antes, seja previamente filtrado, o que garantirá a qualidade da manteiga produzida. Posteriormente, é realizada a padronização a aproximadamente 35% de gordura e feita a neutralização utilizando carbonato ou bicarbonato de sódio ou hidróxido de cálcio. Não é recomendada a utilização de creme com acidez superior a 20 °D para não ocorrer coagulação da caseína e perda de gordura, por isso é realizada a etapa de neutralização do creme.

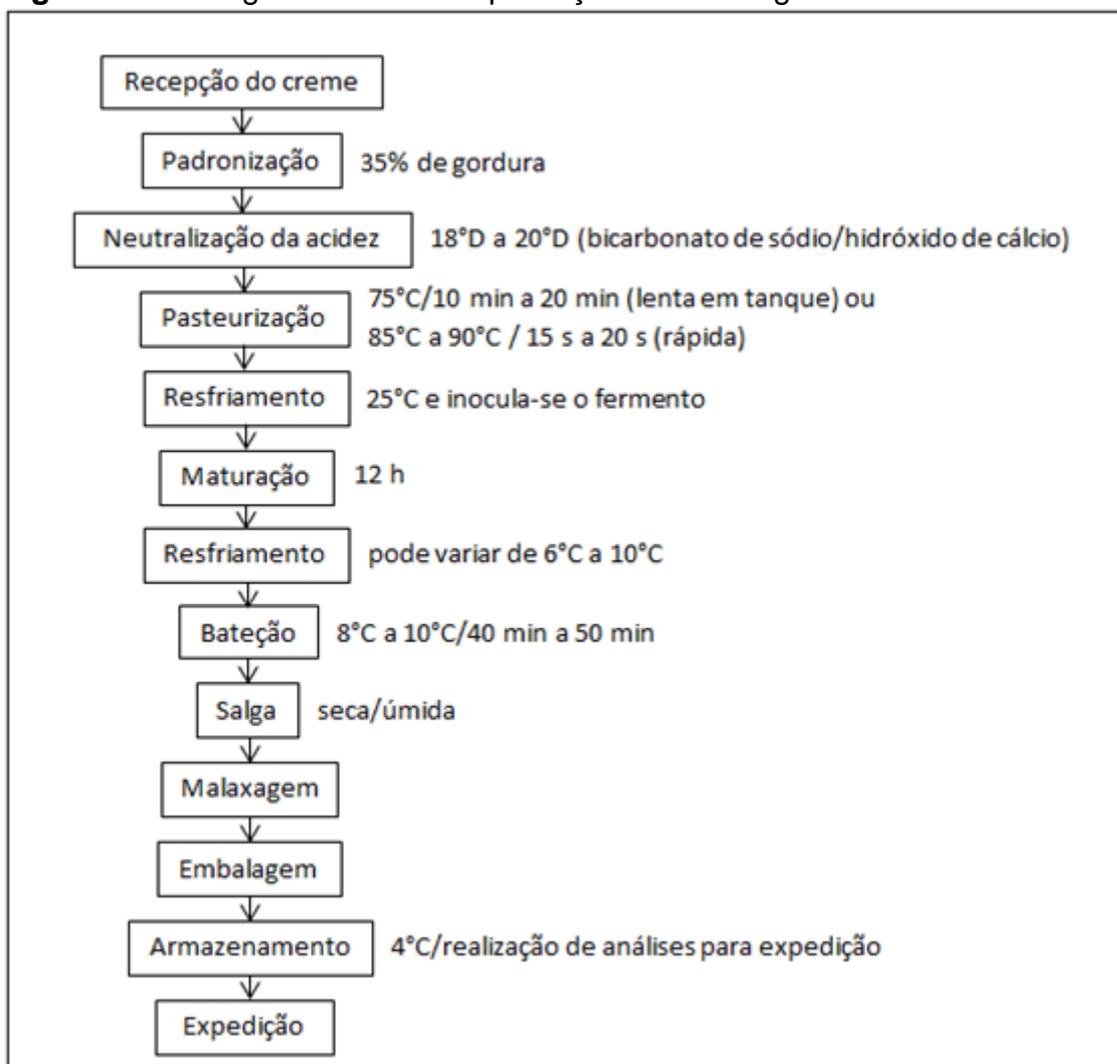
Já a pasteurização do creme deverá ser realizada a 75 °C entre 10 a 20 minutos, ou 85 °C a 90 °C por 15 a 20 segundos, utilizando tanque isotérmico de camisa dupla, para evitar que o creme queime. Após esse processo, deverá ser resfriado até cerca de 25 °C, quando será inoculado o fermento específico (*Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*) para maturação, que irá agir por aproximadamente 12 horas até se obter um creme ácido, que será refrigerado até 6 °C a 10 °C, dependendo do tipo de maturação.

Após esse processo, será realizada a bateção do creme, com o intuito de formar a manteiga propriamente dita, de modo que os glóbulos de gordura se rompam e agrupem; estes deverão ser separados do leiteiro (fase líquida ou soro da manteiga, que também pode ter uso industrial como ingrediente de bebidas lácteas ou queijos). Quanto menor o tamanho dos glóbulos, maior será a firmeza do produto.

Depois, lava-se a manteiga com água a 12 °C para remoção do restante do leiteiro e realiza-se a salga com aproximadamente 2% de sal, que pode ser a seco ou úmida (salmoura para lavagem da manteiga). A seguir, é realizada a malaxagem ou amassamento da manteiga, normalmente na própria bateadeira, para remoção da água de lavagem presente na manteiga. Posteriormente, será embalada em latas com recravação hermética ou em papel laminado impermeável, devendo ser mantida em câmaras com temperaturas inferiores a 4 °C até o momento da expedição.

O fluxograma de produção de manteiga pode ser visualizado abaixo (figura 13).

**Figura 13.** Fluxograma básico de produção de manteiga.



Ainda, deverá ser avaliada para a presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes. A manteiga deverá apresentar ainda no mínimo 82% de matéria gorda, 16% (máximo) de umidade, 2% (máximo) de extrato seco desengordurado, acidez máxima de 3 milimoles/100 g de gordura e índice de peróxido igual a 1 (mEq de peróxido/kg de matéria gorda). No caso de manteiga salgada, admite-se o mínimo de 80% de matéria gorda.

Alguns defeitos de fabricação da manteiga são: casca com coloração amarela intensa (embalagem permeável a vapor d'água), pontos coloridos

(bactérias, bolores e leveduras), marmorização – zonas brancas e amarelas (mal malaxagem ou mistura), má distribuição de água (malaxagem insuficiente ou embalagem tardia), manteiga arenosa (cristalização, moléculas instáveis, cremes muito gordos, pasteurizados demasiadamente e temperaturas maiores do que 20 °C durante a pré-armazenagem) e manteigas duras (composição rica em glicerídeos de elevado ponto de fusão e solidificação da matéria gorda devido a tratamentos inadequados e nas condições pós-endurecimento da manteiga).

## **9. CREME DE LEITE**

Entende-se por creme de leite o produto lácteo relativamente rico em gordura retirada do leite por procedimento tecnologicamente adequado, que apresenta a forma de uma emulsão de gordura em água. Pode ser classificado em pasteurizado, esterilizado e UAT de acordo com seu tratamento térmico durante a produção (BRASIL, 1996).

Pode ser classificado, ainda, conforme seu teor gordura, dividido em creme de baixo teor de gordura ou creme leve ou semicreme (10 g a 19,9 g de gordura/100 g de creme); creme (20 g a 49,9 g de gordura/100 g de creme); e creme de alto teor de gordura (acima de 50 g de gordura/100 g de creme). O creme de leite a granel para uso industrial não apresenta classificação (BRASIL, 1996).

Em sua composição, além da obrigatoriedade da utilização do creme obtido do leite da vaca como ingrediente, admite-se a utilização de sólidos lácteos não gordurosos em no máximo 2% (m/m), ou caseinatos em no máximo 0,1% (m/m), ou soro lácteo em pó em no máximo 1,0% (m/m) (BRASIL, 1996).

Também o creme esterilizado e o creme UAT poderão conter agentes espessantes e/ou estabilizantes permitidos pela legislação (carragenina, goma arábica, pectina), isoladamente ou em mistura, em quantidade total não superior a 0,5% (m/m) no produto final. Poderão conter, ainda, os sais estabilizantes permitidos isoladamente ou em mistura, em quantidade total não superior a 0,2% (m/m) no produto final, como citrato de sódio, fosfato (mono, di

ou tri) de sódio, potássio ou cálcio, cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio (BRASIL, 1996).

Observa-se que a matéria-prima utilizada no início do processamento é o leite cru refrigerado, que passará por um preaquecimento em temperaturas aproximadas de 40 °C a 45 °C para maior solubilidade da gordura, e depois, pela etapa de desnatado por centrifugação a aproximadamente 6.000 rpm e padronização, a fim de retirar a nata do leite para obtenção de um creme com 25% de gordura.

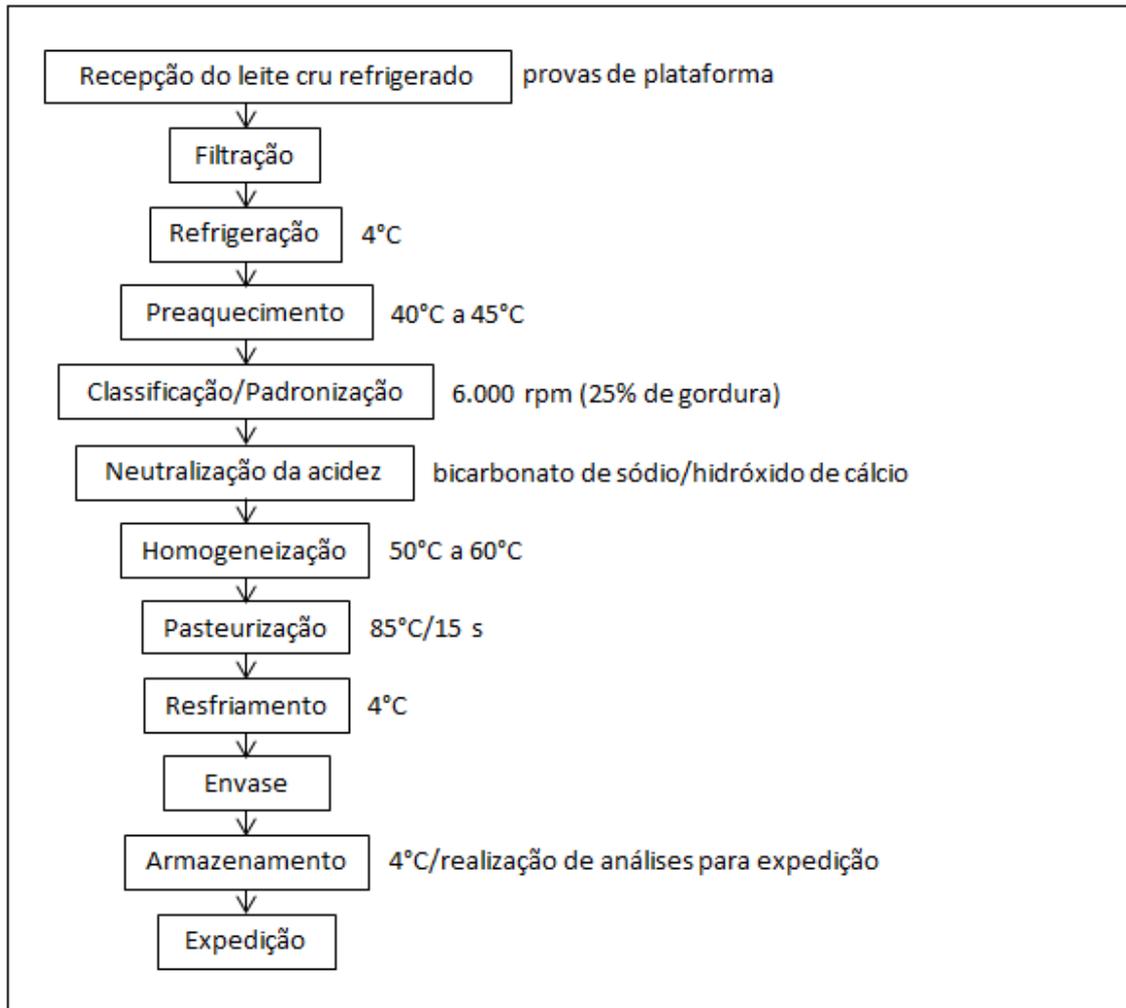
Então, é realizada a redução da acidez utilizando solução alcalina de carbonato ou bicarbonato de sódio ou hidróxido de cálcio, visto que o creme muito ácido é espesso e pode coagular durante a pasteurização, proporcionando o aparecimento de sabor queimado e rendimento dos processos de tratamento térmico. Posteriormente, é feita a homogeneização para que o glóbulo de gordura seja transformado em partículas menores com o objetivo de retardar a separação de gordura do produto final. Depois, o produto será pasteurizado (85 °C/15 s ou 142 °C/30 s) e resfriado até a temperatura adequada, dependendo do tipo de embalagem (o que evita a formação de sabor de cozido), para posteriormente ser envasado e armazenado em temperatura ambiente.

O creme de leite deverá ser sempre avaliado pela contagem de microrganismos do grupo dos coliformes totais e termotolerantes, microrganismos aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os produtos do tipo tratado por UAT são avaliados apenas pela contagem de microrganismos aeróbios mesófilos. Em relação aos parâmetros físico-químicos, deverá possuir o percentual mínimo de gordura de acordo com a classificação e acidez de 0,20 g de ácido lácteo/100 g de creme.

Alguns possíveis defeitos encontrados consistem na presença de gordura abaixo do descrito no regulamento técnico do produto, excesso de acidez ou sabor de ranço (ação de lipases, oxidação), presença de sedimentos, consistência indesejável e defeitos ocorridos durante a embalagem.

O fluxograma de produção de creme de leite pasteurizado pode ser visualizado abaixo (figura 14).

**Figura 14.** Fluxograma básico de produção de creme de leite pasteurizado.



## 10. DOCE DE LEITE

Entende-se por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos).

Em sua composição, os ingredientes obrigatórios são o leite de vaca e/ou reconstituído e no máximo 30 kg de sacarose a cada 100 litros de leite. Normalmente, para os cremosos é utilizada uma proporção de aproximadamente 18% de açúcar, enquanto para os doces de leite em tabletes utiliza-se até 30%.

Como opcionais, poderão ser utilizados creme; sólidos de origem láctea; mono e dissacarídeos que substitua a sacarose em no máximo 40% m/m; amidos ou amidos modificados em uma proporção não superior a 0,5 g/100 mL no leite; cacau, chocolate, coco, amêndoas, amendoim, frutas secas, cereais e/ou outros produtos alimentícios isolados ou misturados em uma proporção entre 5% e 30% m/m do produto final, os quais alterarão sua denominação de venda. Ainda, permite-se a utilização de conservantes, corantes, umectantes, estabilizantes e espessantes. O uso de estabilizantes/espessantes quando em mistura não poderá ser superior a 20.000 mg/kg do produto final.

O seu preparo é realizado a partir do leite cru refrigerado. Na etapa seguinte, é feita a neutralização da acidez do leite com a adição de bicarbonato de sódio até aproximadamente 12 °D (na proporção de 45 gramas de bicarbonato para cada 100 litros de leite) e de açúcar (a sacarose deve ser de boa qualidade e sem acidez). A neutralização é importante para evitar o talhamento do doce causado pela precipitação de proteínas. Após a neutralização, o leite deve ser concentrado sob pressão. Ainda sob agitação e aquecimento é feita a adição lenta de açúcar na proporção de 20% a 35% em relação à quantidade de leite, sendo o tempo variável. Quando o doce estiver no ponto, desliga-se o aquecimento e continua-se a agitação até a mistura atingir 70 °C— sua acidez deve ser avaliada, para seguir para o resfriamento (que deve ser lento e sem agitação para evitar a cristalização) e envase em temperatura ambiente.

A qualidade microbiológica deve ser avaliada pela contagem padrão em placas (UFC/g), bolores e leveduras (UFC/g), coliformes a 30 °C (NMP/g), coliformes a 45 °C (NMP/g), *Staphylococcus* spp. (UFC/g) e *Staphylococcus* coagulase positiva. O doce de leite deve apresentar umidade máxima de 30%, matéria gorda mínima de 6%, 2% de cinzas e proteína mínima de 5%.

Esse produto pode apresentar defeitos de fabricação, como coloração muito escura (formação de um composto denominado melanoidina, com relação estreita com a quantidade de redutor utilizado, em que ocorre elevação do pH acima de 7), aspecto talhado (leite ácido ou excesso de açúcar), textura açucarada (adição excessiva de glicose), doce decantado (excesso de glicose), multiplicação de bolores na superfície e cristalização (falha de maior ocorrência, tornando-se aparente a partir de 45 dias de estocagem do produto;

recomenda-se utilizar um menor percentual de açúcar e de glicose) (SILVA et al., 2012).

## **11. LEITE CONDENSADO**

Entende-se por leite condensado ou leite condensado com açúcar o produto resultante da desidratação em condições próprias do leite adicionado de açúcar. A principal vantagem desse produto é o fato de poder ser conservado durante muito tempo sem refrigeração, pois, além do aquecimento, a concentração de açúcar que aumenta a pressão osmótica inviabiliza a maior parte dos microrganismos.

O leite condensado deverá apresentar características organolépticas próprias; acidez em ácido láctico, entre 0,08 g% e 0,16 g%, quando na diluição de uma parte do produto para 2,5 partes de água; reconstituição, em volume, de uma parte do leite para 2,25 partes de água; teor de gordura que atinja o limite do padrão de leite de consumo correspondente, tendo 28%, no mínimo, de extrato seco total do leite e, no máximo, 45% de açúcar, excluída a lactose (BRASIL, 1952).

São fases de fabricação de leite condensado: seleção do leite, padronização dos teores de gordura e de sólidos totais, preaquecimento, adição de xarope (solução de sacarose ou glicose), condensação, refrigeração, cristalização e enlatamento (BRASIL, 2017).

O leite é resfriado a uma temperatura entre 4 °C e 6 °C e padroniza-se seu teor de gordura após um preaquecimento, para que o produto final apresente a composição ideal e constante. Posteriormente, será aquecido a aproximadamente 85 °C em aquecedores tubulares para ser realizada a adição (170 g/L a 180 g/L) e a dissolução do açúcar, antes de receber o processo de concentração à vácuo (evaporação), até atingir aproximadamente 27% de umidade e receber resfriamento entre 25 °C a 35 °C anteriormente ao envase em latas ou embalagens do tipo cartonada. Ainda, o produto pode receber adição de lactase, para microcristalizar o açúcar em pequenos cristais imperceptíveis à língua humana, evitando a cristalização do produto no mercado.

Deverá apresentar acidez em ácido láctico, entre 0,08 g% e 0,16 g% quando na diluição de uma parte do produto para 2,5 partes de água, e também apresentar na reconstituição, em volume, uma parte do leite para 2,25 partes de água, teor de gordura que atinja o limite do padrão de leite de consumo correspondente, tendo 28%, no mínimo, de extrato seco total do leite e, no máximo, 45% de açúcar, excluída a lactose. Sua qualidade microbiológica deve ser avaliada pela contagem padrão em placas (UFC/g), bolores e leveduras (UFC/g), coliformes a 30 °C (NMP/g), coliformes a 45 °C (NMP/g), *Staphylococcus* spp. (UFC/g) e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Os principais defeitos observados nesse tipo de produto são a textura com arenosidade (resfriamento muito lento), alterações microbiológicas (produção de gás nas latas pela presença de fungos) e despadronização do produto.

## 12. REFERÊNCIAS

BARROS, J. J. C. et al. Queijo parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 1, p. 285-294, 2011.

BRASIL. Decreto n. 9.013/2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publicado no *Diário Oficial da União* de 29/3/2017.

BRASIL. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Queijo Azul, MERCOSUL, GMC, Resolução n. 48, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 146, Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, *Diário Oficial da União*, de 7 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 16, *Diário Oficial da União*, de 23 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46, *Diário Oficial da União*, de 23 de dezembro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, *Diário Oficial da União*, de 29 de dezembro de 2011.

COELHO, K. O. et al. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. *Arquivos de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, n. 4, p. 1.260-1.268, 2014.

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

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

FRACASSO, R.; PFULLER, E. E. Processamento do leite para a fabricação do queijo na indústria de laticínios Camozzato LTDA., Sananduva – RS. RAMVI, Getúlio Vargas, v. 1, n. 2, jul./ dez. 2014. Disponível em: <[http://www.ideau.com.br/getulio/restrito/upload/revistasartigos/217\\_1.pdf](http://www.ideau.com.br/getulio/restrito/upload/revistasartigos/217_1.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2016.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, M. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *Journal of Dairy Research*, 44(01), p.145-148, 1977.

LIMA, R. C. C. Relação entre a contagem de células somáticas a composição do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) e o rendimento de queijo coalho produzido em Autazes, Amazonas. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

MACHADO, E. C. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MILKPOINT. As grandes oportunidades no mercado de queijo no Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

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

NICOLINI, C. Leite em pó. Trabalho acadêmico apresentado ao curso de Bacharelado em Química de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. 50f. Pelotas/RS. Disponível em: <<https://quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/leite-em-po.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO; A. F., FURTADO, M. M. Princípios básicos da fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, mar./jun. v. 367/368, 64: 19-25, 2009

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. D. S. F. Minas frescal cheese with soy product: physical, chemistry and sensorial characteristics. *Food Science and Technology*, Campinas, v. 30, p. 77-85, 2010.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. D. F.; ABREU, L. R. D.; PICCOLI, R. H. Microbiological assessment of creamy ricota during shelf-life. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 113-117, 2005.

SBAMPATO, C. G.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M. Queijo gorgonzola fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor e HSTS: parâmetros físico-químico e sensoriais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 1, p. 191-200, 2000.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. B. Processamento de leite. Recife: Ed. Da UFRPE, 2012. 167 p. (Curso Técnico em Alimentos). SILVA, L. C. C. MilkPoint. Defeitos no leite UHT e suas causas. 2014. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/leite-fluido/defeitos-no-leite-uht-e-suas-causas-91757n.aspx>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

STOECKEL, M. et al. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, v. 59, p. 20-28, 2016.

TETRA PAK. Diry. Milk Powder. Disponível em: <<http://www.tetrapak.com/br/findbyfood/dairy/milk-powder>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

VIDAL, A. M. C. et al. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Ciência Rural*, v. 46, n. 2, p. 286-292, 2015.

ZANELA, M. B. et al. Unstable nonacid milk and milk composition of Jersey cows on feed restriction. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 5, p. 835-840, 2006.

The background features a dark green to black gradient with a complex, repeating geometric pattern of triangles and squares. White liquid splashes are positioned at the top and bottom edges, creating a sense of motion and depth.

ISBN 978-85-66404-17-3 (e-book)