

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E**  
**DERIVADOS**

**Fabiano Almeida de Castro**

**Aplicação de fosfatos e citrato de sódio para estabilização do leite**

Juiz de Fora  
2022

**Fabiano Almeida de Castro**

**Aplicação de fosfatos e citrato de sódio para estabilização do leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora/MG como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientadora: Prof<sup>ta</sup>. Dra. Denise Sobral

Juiz de Fora – MG

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida de Castro, Fabiano .

Aplicação de fosfatos e citrato de sódio para estabilização do leite / Fabiano Almeida de Castro. -- 2022.  
60 f. : il.

Orientador: Denise Sobral

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2022.

1. Coagulação. 2. Estabilidade. 3. Fosfatos de sódio. 4. Teste do álcool . 5. ProScope. I. Sobral, Denise , orient. II. Título.

**Fabiano Almeida de Castro**

**Aplicação de fosfatos e citrato de sódio para estabilização do leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 14 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Denise Sobral** - Orientadora  
EPAMIG/ILCT

**Profa. Dra. Renata Golin Bueno Costa**  
EPAMIG/ILCT

**Profa. Dra. Elisângela Michele Miguel**  
EPAMIG/ILCT

**Profa. Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira**

## EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 03/03/2022.



Documento assinado eletronicamente por **ELISANGELA MICHELE MIGUEL, Usuário Externo**, em 18/11/2022, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GISELA DE MAGALHAES MACHADO MOREIRA, Usuário Externo**, em 19/11/2022, às 21:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Sobral, Usuário Externo**, em 21/11/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Golin Bueno Costa, Usuário Externo**, em 25/11/2022, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0696575** e o código CRC **A5660593**.

## RESUMO

A estabilidade térmica do leite é definida como o tempo necessário para que o leite apresente coagulação proteica visível, em uma dada temperatura e pH. Por este motivo, o leite destinado ao processamento UHT precisa estar estável em todas as etapas do processo, para que não cause danos aos equipamentos utilizados e para que não apresente instabilidade durante toda a vida de prateleira do produto final. O uso de fosfatos e citrato de sódio no processamento UHT melhora a estabilidade do leite, sendo que cada tipo de fosfato ou citrato pode ocasionar um aumento maior ou menor da estabilidade. Neste trabalho, avaliou-se a influência da adição de fosfatos de sódio (com diferentes tamanhos de cadeias e radicais de fósforo, isolados ou em combinação) e/ou citrato de sódio, ao leite pasteurizado com o objetivo de melhorar sua estabilidade ao álcool. Os leites adicionados de fosfatos e/ou citrato de sódio também foram testados quanto à sua estabilidade quando frescos e também estocados refrigerados por sete dias. Em cada tratamento foram realizadas análises da prova do álcool, em que o grau alcoólico variou de 72°GL até 98°GL e os resultados destas análises foram visualizados em leitura microscópica digital, pelo equipamento *ProScope*, e também por visualização pela ótica humana. Os leites adicionados de mistura de difosfato de sódio e trifosfato de sódio (DSP + TSP) e tetra pirofosfato de sódio (TSPP) apresentaram maior estabilidade ao etanol, sendo os mais indicados para uso como estabilizante no processo UHT. Todos os fosfatos de sódio e/ou citrato testados neste trabalho melhoraram a estabilidade do leite no teste do álcool quando comparados ao tratamento controle (sem adição de fosfatos e/ou citrato), evidenciando a relação direta entre a adição de fosfato e/ou citrato de sódio e a estabilidade coloidal do leite. Não houve diferença estatística ( $p = 0,54713$ ) quanto ao índice de estabilidade dos leites adicionados de fosfatos com relação ao fato de estarem frescos ou estocados refrigerados por sete dias. Com relação à visualização das análises, houve diferença significativa entre os dois métodos de visualização (ótica humana e microscopia eletrônica). A visualização direta tende a superestimar a estabilidade e o ponto de coagulação do leite, o que pode acarretar problemas tecnológicos, se comparados à leitura feita em microscópio *ProScope*.

Palavras-chave: Estabilidade. Coagulação. Fosfatos de Sódio. Teste do Álcool. *ProScope*.

## ABSTRACT

The thermal stability of milk is defined as the time required for the milk to show visible protein coagulation at a given temperature and pH. For this reason, the milk destined for UHT processing needs to be stable at all stages of the process, so that it does not cause damage to the equipment used and so that it does not present instability during the entire shelf life of the final product. The use of sodium phosphates in UHT processing improves the stability of milk, and each phosphate can cause a greater or lesser increase in stability. In this work, the influence of the addition of different sodium phosphates (such as different sizes of chains and phosphorus radicals, alone or in combination, to pasteurized milk) was evaluated in order to improve its stability when subjected to thermal processing. Sodium phosphates were also tested for their stability when fresh and also stored refrigerated for seven days. In each treatment, analyzes of the alcohol test were performed, in which the alcoholic degree varied from 72°GL to 98°GL and the results of these analyzes were visualized in digital microscopic reading, by the *ProScope* equipment, and also by visualization through the human optic. The milks added with DSP + TSP – mixture of sodium diphosphate and sodium triphosphate, TSPP- sodium tetra pyrophosphate showed greater stability to ethanol, being the most suitable for use as a stabilizer in the UHT process. All the sodium phosphates tested in this work improved the stability of milk in the alcohol test when compared to the control treatment (without the addition of phosphates), evidencing the direct relationship between the addition of sodium phosphate and the colloidal stability of milk. There was no statistical difference ( $p = 0.54713$ ) regarding the stability index of milks added with phosphates in relation to whether they were fresh or stored refrigerated for seven days. Regarding the visualization of the analyses, there was a significant difference between the two visualization methods (human optics and electron microscopy). Direct visualization tends to overestimate the stability and turning point of milk, which can lead to technological problems compared to reading using a *ProScope* microscope.

Key-words: Stability. Coagulation. Sodium phosphate. Alcohol Test. *ProScope*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1. Leite .....	14
3.2. Proteínas do leite.....	14
3.2.1. Caseína.....	15
3.2.2. Estabilidade das micelas de caseína .....	17
3.2.3. Soroproteínas .....	18
3.3. Minerais do leite .....	19
3.3.1. Fração solúvel .....	20
3.3.2. Fração coloidal.....	20
3.4. Estabilidade térmica do leite .....	21
3.4.1. O pH na estabilidade térmica do leite.....	23
3.4.2. Os sais minerais na estabilidade do leite .....	23
3.5. Leite instável não ácido (LINA) .....	25
3.6. Tipos de tratamentos térmicos .....	25
3.7. Efeitos do tratamento térmico UHT no leite .....	26
3.8. Prova do álcool.....	27
3.9. Efeitos dos minerais no processamento UHT .....	28
3.9.1. Fosfatos utilizados em leite UHT.....	29
3.9.2. Tipos de fosfatos .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1. Ensaio preliminares .....	33
4.2. Tipos de fosfatos utilizados .....	33
4.3. Tipos de leite analisados.....	34
4.4. Prova do álcool.....	35
4.5. Preparação das amostras .....	35
4.6. Microscopia ótica digital.....	36
4.7. Análises estatísticas .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>

<b>5.1. Análises do leite.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2. Índice de estabilidade (IE) e ponto de coagulação das amostras .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3. Leite fresco e leite estocado refrigerado .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4. Métodos de visualização – direta e em microscopia <i>proscope</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Há no Brasil diferentes formas de processamento de leite fluido para consumo, sendo a de maior predominância o processo UHT (Ultra High Temperature) ou UAT (Ultra Alta Temperatura). Este tipo de processo é definido por leite homogeneizado submetido a uma elevada temperatura (130°C a 150°C) durante cerca de 2 a 4 segundos, num processo térmico de fluxo contínuo, sendo imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado em embalagens hermeticamente fechadas e esterilizadas.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade – RTIQ (BRASIL, 1997) de leite UHT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece para o leite integral o mínimo de 3% de gordura, acidez titulável entre 0,14% e 0,18% de ácido láctico, estabilidade ao etanol de 68% e, no mínimo, 8,2% de extrato seco desengordurado (ESD). O leite UHT chegou ao Brasil na década de 1970 e teve sua maior expansão durante os anos 1990. De acordo com a Associação Brasileira de Leite Longa Vida (2021), a produção de leite longa vida do ano de 2020 foi de 6.880 milhões de litros e a participação no mercado foi de 86% do total de leite consumido no Brasil.

Como em qualquer cadeia produtiva, seja ela industrial ou artesanal, a matéria-prima é essencial para a qualidade do produto. Não há como produzir um bom produto sem que todos os pontos de análise e seleção sejam exaustivamente avaliados. Além da qualidade da matéria-prima, a refrigeração e os coadjuvantes de produção também têm papel relevante no resultado, no quesito qualidade. Para o processamento de leite UHT, o tempo em que o leite cru permanece refriado antes do processamento térmico é de crucial importância, pois o crescimento de microrganismos psicrófilos pode levar à formação de proteases termoresistentes, que poderão levar o leite UHT à gelificar durante sua vida de prateleira. Neste contexto, o uso de fosfatos e citrato é necessário para minimizar a probabilidade de coagulação do produto durante seu tempo de validade.

Os fosfatos de sódio são de suma importância na fabricação de produtos na linha UHT. Isso porque minimizam os efeitos da alta temperatura na desestabilização das proteínas, estabiliza e corrige o pH do produto e retardam o aparecimento da sedimentação e gelificação durante a vida de prateleira. A Portaria nº 146 (BRASIL, 1996) e a Portaria nº 370 (BRASIL, 1997) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permitem o uso de três tipos de fosfatos de sódio na produção de leite UHT: os monofosfatos, os difosfatos e os trifosfatos de sódio. Cada qual tem uma funcionalidade no processo de estabilização da proteína.

Uma técnica de análise muito simples, econômica e eficiente de seleção do leite *in natura* e para a avaliação dos efeitos dos fosfatos de sódio na estabilização do leite é a prova do álcool ou teste do alizarol. Esta análise é realizada nos laticínios desde a década de 1930, primeiramente para a indicação da acidez do leite, para a presença de colostro e para leite de animais com mastite. Atualmente, sua funcionalidade é ampliada, pois é a primeira indicação de como está o processo de higienização e armazenamento do leite, já no campo.

No entanto, esta análise tem suas vulnerabilidades, principalmente na interpretação dos resultados, haja vista ser subjetiva de cada analista. Uma dessas fragilidades é o fator humano no momento da interpretação do resultado. Uma alternativa é a comparação da visualização ótica direta em placa de Petri feita pelo analista, com resultados apresentados em microscópio ótico digital *ProScope*.

Com a utilização da prova do álcool, é possível avaliar o grau de estabilidade da proteína por meio da coagulação, eventualmente similar ao que ocorre nos processamentos de leite exposto ao calor. O teste de estabilidade do leite ao álcool não é de fato um teste de estabilidade térmica, no entanto é usado rotineiramente com essa finalidade, embora não esteja comprovada a correlação entre estabilidade do leite ao calor e ao álcool. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, em sua Instrução Normativa nº76 (BRASIL, 2018), descreve que a concentração mínima do álcool aceitável para avaliação de qualidade do leite cru refrigerado é de 72%(v/v).

As indústrias de leite, mais especificamente as dedicadas à produção de leite UHT, têm encontrado grandes dificuldades quanto à baixa uniformidade dos leites recebidos, no que se refere à resistência ao tratamento térmico a ser aplicado. O binômio tempo/temperatura utilizado no tratamento UHT pode modificar os componentes naturais do leite e provocar alterações sensoriais indesejáveis no produto final, além de não conseguir eliminar completamente as proteases formadas por psicotróficos presentes no leite cru, em maior quantidade quanto maior for o tempo em que permencer refrigerado. Por isso é necessário um controle da qualidade da matéria prima e redução do tempo de resfriamento para que o leite UHT produzido seja estável. A não observância destes parâmetros pode causar desestabilização por aquecimento, gerando demasiada sujidade e comprometimento nas tubulações e consequente perda de eficiência no processo, além de alterações físicas durante o tempo de validade do leite UHT.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi, por meio da análise da estabilidade do leite frente ao álcool, indicar os melhores tipos de fosfatos e citrato isolados ou em combinação a serem utilizados para estabilização de leite que será submetido ao processo UHT. Também foi

avaliada a técnica de visualização por *ProScope*, com visualização das estruturas geradas por coagulação na prova do álcool, comparando a intangibilidade das avaliações pelo olho humano, aumentando a acurácia e contribuindo para a tomada de decisão mais assertiva.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes fosfatos e citrato de sódio isolados ou em combinação na estabilidade do leite, destinados ao processamento térmico tipo UHT, por meio da prova do álcool, com avaliação visual de coagulação pela ótica humana e também por avaliação utilizando o microscópio *ProScope*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar 15 tipos de fosfato de sódio isolados ou em combinação, além do citrato de sódio, para estabilização de leite destinado ao tratamento térmico, além da amostra controle.
- Avaliar dois tipos de leite: fresco (com data de fabricação no dia anterior da análise) e com sete dias de estocagem refrigerada a 5°C.
- Analisar os leites utilizados no estudo quanto a sua composição físico-química e contagem total de microrganismos.
- Avaliar o comportamento das amostras testadas neste estudo quanto a prova do álcool (variando os teores alcoólicos de 70%v/v a 96% v/v), com o auxílio da microscopia digital *ProScope* e pelo método tradicional de visualização ótica humana.
- Definir qual a melhor ou as melhores opções de fosfato ou citrato de sódio que proporcionam maior estabilidade ao leite submetido ao processamento térmico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Leite

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), no seu Art. 475, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

O leite pode ser definido como um líquido biológico complexo secretado pela glândula mamária de fêmeas de mamíferos. Este líquido atende à demanda nutricional de seus descendentes recém-nacidos. Sua composição em macro e micronutrientes varia de acordo com a característica da espécie, raça, saúde, estado nutricional, estágio de lactação, idade, entre outros (FOX *et al.*, 2015).

A composição do leite varia de acordo com os fatores ambientais e com a espécie do animal, sendo que o leite de vaca apresenta a seguinte composição e características mínimas exigidas pela legislação (BRASIL, 2018): 3% m/m de teor de gordura; 2,9% m/m de proteína; 4,3% m/m de lactose anidra; 8,4% m/m de sólidos não gordurosos; 11,4% m/m de sólidos totais; acidez entre 0,14 e 0,18% m/v expressa em ácido láctico; densidade a 15°C entre 1,028 e 1,034 g/mL; índice crioscópico entre -0,512°C e a -0,536°C.

#### 3.2. Proteínas do leite

A composição físico-química do leite pode ser dividida em três fases (FOX *et al.*, 2015):

- 1ª Fase: Aquosa, que contém lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas hidrossolúveis;
- 2ª Fase: Emulsificada, composta por glóbulos de gordura e lipídeos; e
- 3ª Fase: Estruturas dispersas que consistem nas proteínas do leite, algumas em agregados coloidais (caseínas) e outras em estruturas de nível molecular que são conhecidas como soro proteínas.

O leite bovino, como de outras espécies de mamíferos, contém vários tipos de proteínas em sua composição, sendo a caseína a de maior relevância, compreendendo cerca de 80% do total e 20% de soro proteínas (FOX *et al.*, 2015).

As caseínas são fosfoproteínas e possuem baixa solubilidade no ambiente aquoso do leite em pH 4,6 (GOULDING; FOX; O'MAHONY, 2020). Este tipo de proteína se encontra

como agregados, formando grânulos insolúveis, que recebem a denominação de micelas. Esses grânulos se mantêm em suspensão coloidal na estrutura do leite e se a estrutura micelar se perde, as micelas se dissociam e a caseína fica insolúvel (GONZALEZ, 2001).

### 3.2.1. Caseína

A caseína oriunda do leite de vaca se agrupa na forma de micelas e possui quatro principais grupos nas seguintes proporções:  $\alpha_1$  - 37%;  $\alpha_2$  - 10%;  $\beta$  - 35%; e  $\kappa$  - 12%. As micelas de caseínas (MC) são um complexo formado por agregados de caseínas. As MC são partículas porosas, altamente hidratadas (~4,0 mL/g), com diâmetro médio de 200 nm (DALGLEISH, 2011), conforme Figuras 1 e 2. São fosfoproteínas, devido ao grupamento fosfoserina, que compõe sua estrutura. A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto a  $\kappa$ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela (DALGLEISH, 2011). A composição e estrutura das micelas de caseína têm sido estudadas por mais de 40 anos, e as descrições disponíveis são bastante precisas, embora ainda controversas (HORNE, 2006; QI, 2007).

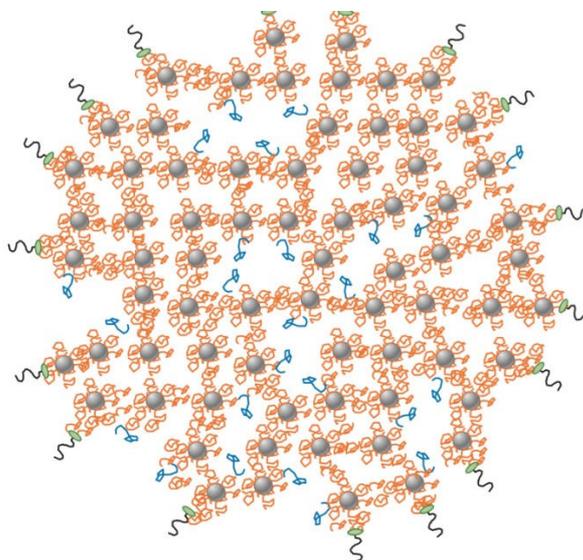


Figura 1. Modelo de micela de caseína do leite

Fonte: DALGLEISH; CORREDIG, (2012)

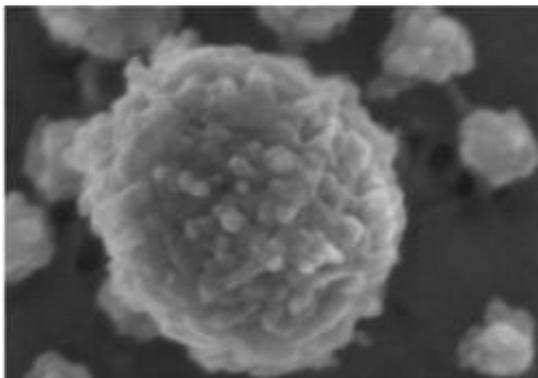


Figura 2. Micrografia eletrônica de uma micela de caseína individual.

Fonte: Imagem reproduzida de Dalgleish *et al.* (2004), com permissão de Elsevier.

As frações internas da micela de caseína têm característica hidrofóbica, o que faz com ela tenha a capacidade de aumentar a viscosidade de diversos produtos alimentícios (FOX *et al.*, 2015). A segregação de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos confere às caseínas uma natureza anfipática definida, o que contribui para sua capacidade de estabilizar emulsões do tipo óleo em água. O consenso é que a estrutura interna das micelas de caseína é principalmente estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (HOLT *et al.*, 2013). As caseínas  $\alpha$ s e  $\beta$ 1 são altamente fosforiladas e portanto sensíveis à concentração de sais de cálcio. Diferentemente das outras caseínas, a  $\kappa$ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina, sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína (HOLT *et al.*, 2013).

Há algumas propostas de modelo da organização interna da caseína, destacando-se o modelo de dupla ligação de Horne, que relata que a interação entre as caseínas por duas vias: a primeira via é a reticulação das regiões hidrofóbicas da estrutura da caseína e a segunda via é por meio de uma ponte formada por estruturas nanoaglomeradas de fosfato de cálcio (HORNE, 2020).

Apesar das diferentes teorias sobre o modelo teórico de integração entre as caseínas, pode se observar, através de microscopias eletrônicas, como as proteínas existentes no leite bovino se apresentam dispersas em forma de micelas coloidal, em formato esférico, de tamanhos variados. A  $\kappa$ -caseína, que se localiza na parte externa da micela, é a maior responsável pela estabilidade das micelas de caseína em meio aquoso (SILVA *et al.*, 2019).

Durante o processamento do leite, há variações de temperatura, pH, minerais (cálcio), adição de fosfatos de sódio entre outros componentes, que fazem com que ocorra uma modificação na estrutura molecular da caseína. A variação do pH tem papel importante na

aglomeração destas estruturas, podendo haver formação de gel de caseínas (MCMAHON; OOMMEN, 2013). Nos leites bovinos, 70% do cálcio está ligado às micelas de caseína, enquanto os 30% restantes estão ligados aos citratos e fosfatos. A concentração de cálcio iônico é cerca de 10% do cálcio total, sendo de suma importância para a estabilidade do leite (LIN *et al.*, 2003).

Lin e colaboradores (2003) realizaram um estudo no qual foi demonstrado o efeito do pH na movimentação do cálcio entre as fases iônica e coloidal das micelas. Na faixa de pH entre 6,5 e 7,05, as amostras com maiores valores de pH mostraram menor concentração de cálcio iônico. Quando baixamos a faixa de valor de pH para 5,01, percebemos um aumento na concentração do cálcio iônico. Desta maneira, podemos relacionar diretamente a diminuição do pH com um aumento da concentração de cálcio iônico, resultando na movimentação para a fase solúvel. No entanto, quando se retornou às faixas iniciais de pH não houve um retorno do valor de cálcio iônico a seus patamares originais (LIN *et al.*, 2003).

### 3.2.2. Estabilidade das micelas de caseína

Segundo um estudo proposto por Holt e Dalgleish (1986), as micelas de caseína estariam estabilizadas por uma camada externa difusa, constituída por uma extremidade N-terminal das  $\kappa$ -caseínas, com comprimento calculado de 12 nm. Essa camada seria responsável pela carga negativa das micelas, com valores em torno de -20 mV na fase contínua do leite (DALGLEISH, 2011; DARLING; DICKSON, 1979). Esta carga negativa se deve à presença de resíduos aspartil e glutamyl, além de moléculas de ácido neuramínico que estão ligadas à  $\kappa$ -caseína, na forma ionizada no pH do leite (KRUIF; HOLT, 2003; SWAISGOOD, 2003).

As cargas negativas das micelas colaboram para sua estabilidade, no entanto, elas não são suficientes para evitar a agregação entre micelas (WALSTRA, 2002). A agregação ocorre devido ao potencial de interação entre duas partículas, distantes por um valor  $d$ , que deve ser estimado pela somatória das repulsões eletrostáticas e forças atrativas de Vander Waals (MEZZENGA; FISCHER, 2013).

Existe um modelo para estimar a estabilidade das micelas de caseína, desenvolvido por Tuinier e Kruif (2002), que considera a contribuição estérica da camada externa das  $\kappa$ -caseínas. De tal modo, o potencial de interação entre duas micelas deve englobar o impedimento estérico (*brush repulsion*), a repulsão eletrostática e a atração de Vander Waals (Figura 3A).

A estabilidade das micelas de caseína é atribuída em grande parte à participação estérica da camada externa de  $\kappa$ -caseína, que foi descrita como extremidades eletricamente carregadas (*salted brush*) (Figura 3B).

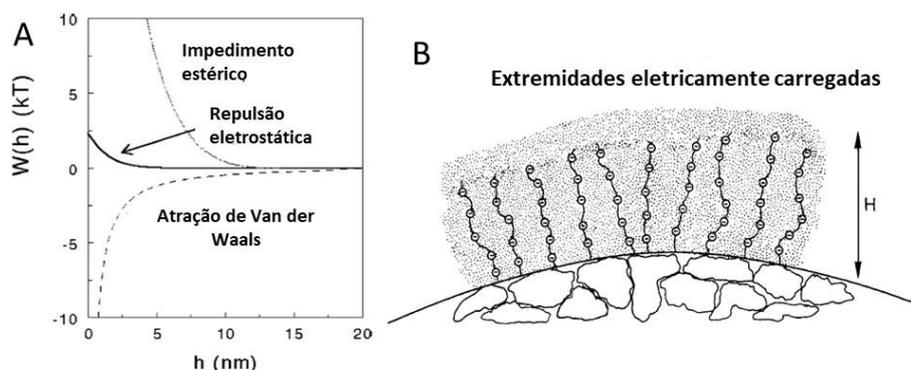


Figura 3. Representação da variação de cargas na estrutura das micelas. (A) Potencial de interação entre duas micelas de caseína. (B) Camada externa da micela de caseína eletricamente carregada.

Fonte: Kruif (1999), autorizada por Elsevier.

### 3.2.3. Soroproteínas

As soroproteínas apresentam-se em um percentual menor na composição do leite bovino. São responsáveis por cerca de 20% no total de proteínas, apresentando como característica solubilidade em pH 4,6 e em solução de cloreto de sódio saturada (FOX, *et al.*, 2015). Existem outras diferenças que podemos verificar quando comparadas a caseína, como demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Características físico-químicas das caseínas e soroproteínas durante o processamento

Caseínas	Soroproteínas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentam poucas estruturas secundárias estáveis (estrutura aberta e flexível).</li> <li>• Suscetíveis à proteólise.</li> <li>• Mais hidrofóbicas.</li> <li>• Estáveis quando aquecida a 100°C por 24h.</li> <li>• Tendência de se associarem.</li> <li>• Insolúveis em pH 4,6.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estruturas que compõem essas proteínas são organizadas.</li> <li>• Resistentes à proteólise.</li> <li>• Mais hidrofóbicas.</li> <li>• Desnaturam-se completamente em aquecimento a 90°C por 10 min.</li> <li>• Dispersas molecularmente.</li> <li>• Solúvel em pH 4,6.</li> </ul>

Fonte: Fox, 2015.

Segundo CHELINI e COSTA (2002), no leite humano, o percentual das soro proteínas é modificado ao longo da lactação, sendo que no colostro tem uma representatividade de cerca de 80% e, com o passar do tempo, tem um decréscimo percentual que pode chegar a 50%.

Outras características importantes das soroproteínas são solubilidade, estrutura terciária, propriedade de serem termolábeis acima de 65°C de temperatura e que não são fosforiladas. Estas características explicam, em grande parte, a sua baixa estabilidade proteica. Em temperaturas entre 80°C e até 90°C, ocorre a desestabilização da  $\beta$ -lactoglobulina, ocorrendo a formação do complexo com a subfração  $\kappa$ -caseína (CHELINI; COSTA, 2002).

Negri *et al.* (2001) encontraram correlações entre a Estabilidade Térmica do Leite (ETL) e a fração nitrogenada e mineral do leite. As concentrações de cálcio iônico, de cálcio total e de potássio foram inversamente correlacionadas com o tempo de coagulação. Já as concentrações de ureia, de proteínas do soro e pH do leite foram diretamente correlacionadas com a ETL (COSTA, 2016).

### 3.3. Minerais do leite

A composição de minerais do leite depende de variados fatores tais como: genéticos, estágio de lactação, alimentação e saúde dos animais, etc (GAUCHERON, 2004). O citrato é uma molécula orgânica e está presente na composição mineral do leite por contribuir em seu equilíbrio iônico.

Os minerais do leite podem ser divididos em duas frações: fração solúvel, devido aos sais e íons presentes na fase contínua do leite e fração coloidal, constituída pelos minerais que estão ligados às micelas de caseína.

### 3.3.1. Fração solúvel

Com a composição da fase contínua do leite e as constantes de associação intrínseca entre os íons presentes, pode ser calculado a concentração de sais e íons livres que compõem a fração solúvel do leite, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações calculadas de íons e sais presentes na fração solúvel de leite

Ânions(mM)	Íons Livres	Cátions(mM)			
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
Hcit <sup>2-</sup>	0,04	0,01	+	+	+
Cit <sup>3-</sup>	0,26	6,96	2,02	,03	0,04
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	7,50	0,07	0,04	0,10	0,18
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,65	0,59	0,34	0,39	0,52
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	+	0,01	+	+	+
Cl <sup>-</sup>	30,9	0,26	0,07	0,39	0,68
Íons Livres	-	2,00	0,81	20,92	36,29

(+) Concentração menor que 0,005 mM.

Fonte: Modificado de Holt *et al.* (1981).

### 3.3.2. Fração coloidal

A fração coloidal é formada basicamente por dois tipos de sais: cátions e ânions ligados diretamente aos resíduos de aminoácidos das caseínas e os fosfatos de cálcio coloidal (FCC). Quanto aos aminoácidos, podemos verificar que as caseínas possuem grande afinidade por cátions bivalentes, especialmente pelo cálcio. Normalmente, quanto mais fosforilada for uma molécula de caseína, maior será sua capacidade de se ligar ao cálcio (DALGLEISH; PARKER, 1980; HOLT *et al.*, 1981; WHITE; DAVIES, 1958).

Os FCC são considerados de baixa solubilidade (CaHPO<sub>4</sub>), sendo de 0,59 mM no pH do leite (pH 6,7) (GAUCHERON, 2004). É importante salientar que durante a síntese do leite

na glândula mamária, a fase contínua fica supersaturada em  $\text{CaHPO}_4$  (HOLT *et al.*, 1981). Consequentemente, o estado termodinâmico com maior estabilidade é alcançado pela nucleação e precipitação dos sais de  $\text{CaHPO}_4$  supersaturados (WALSTRA, 2002). Kruif e Holt (2003) presumem que a nucleação ocorre sobre as sequências dos resíduos fosfoseril das caseínas, isso em grande parte devido à sua afinidade química pelos sais precipitados.

Estes precipitados são chamados de fosfato de cálcio coloidal (KRUIF; HOLT, 2003; HOLT *et al.*, 1998). Para que o FCC seja formado, é preciso de no mínimo três resíduos de fosfoseril por cada molécula de caseína (AOKI *et al.*, 1992).

Os minerais da fase coloidal do leite permanecem em equilíbrio dinâmico com os minerais da fase contínua (Figura 3). Este equilíbrio, no entanto, depende de condições físico-químicas do meio, tais como temperatura, pH e força iônica.

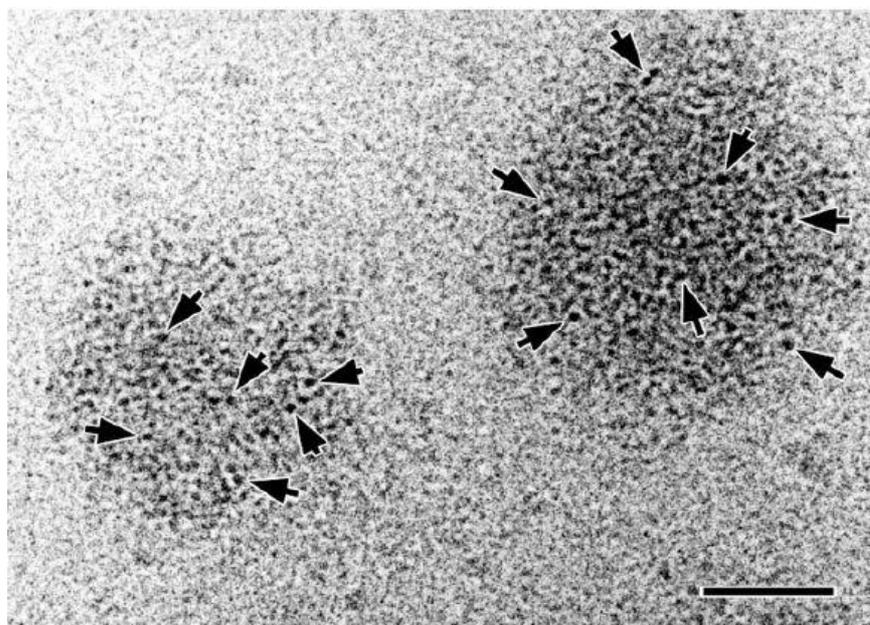


Figura 3. Criomicroscopia eletrônica de micelas de caseína. A escala da barra: 50 nm. As setas apontam para núcleos de fosfato de cálcio coloidal.

Fonte: Marchin *et al.* (2007), autorizado por AIP Publishing.

### 3.4. Estabilidade térmica do leite

A estabilidade térmica do leite (ETL) pode ser definida como o tempo necessário para ocorrer coagulação visível em determinado pH e temperatura. Esta estabilidade está diretamente relacionada com a capacidade de o leite resistir à coagulação pelo calor e, portanto, conservar suas características durante processamento (SILVA, 2003).

A estabilidade térmica do leite é importante no processo de beneficiamento de seus derivados por meio de tratamentos térmicos, sejam eles utilizando temperaturas mais elevadas ou não. Este é um problema recorrente em todas as regiões do país, sendo um fator limitante na utilização desta matéria-prima no processamento de subprodutos (ZANELA; FISCHER, 2011).

Existem vários fatores que interferem de forma decisiva na ETL, sendo os principais a serem relacionados: tempo x temperatura, pH, equilíbrio salino, concentração de ureia, período de lactação, estabilidade das micelas de caseína, alimentação deficiente e ocorrência de mastite.

Vários fatores podem promover a instabilidade da caseína, trazendo grandes problemas à indústria láctea brasileira. O principal fator para a ETL é a acidificação causada pela fermentação da lactose por microrganismos incorporados ao leite, quando ocorrem falhas de higiene no momento de retirada do leite (ordenha). No entanto, a acidificação do leite não é o único fator que promove instabilidade da caseína (OLIVEIRA; TIMM, 2006). Outras questões interferem diretamente, como a hidrólise enzimática da caseína, tratamento térmico, excesso de íons cálcio, altas contagens de células somáticas e adição de etanol também provocam a instabilidade da caseína, mesmo na ausência de acidez (O'CONNELL *et al.*, 2006).

A estabilidade térmica do leite pode diminuir sobremaneira em razão da alta da atividade do cálcio, baixa atividade de fosfatos e citratos, e sucessivas exposições a severos tratamentos térmicos. Pode ocorrer positividade na prova do álcool sem o leite estar de fato ácido, como consequência do desequilíbrio salino (SILVA, 2003).

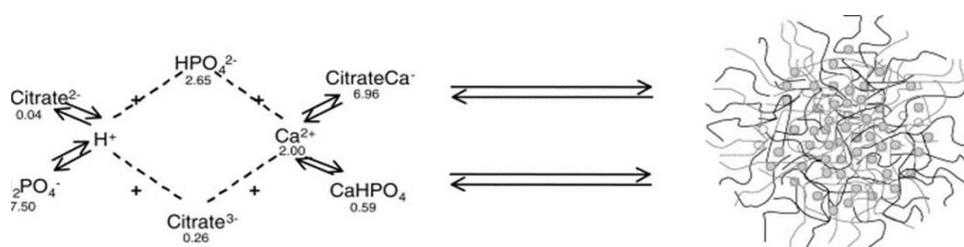


Figura 4. Equilíbrio dinâmico dos minerais de leite entre as fases contínua e coloidal. As concentrações são mostradas em mM, logo abaixo das espécies iônicas.

Fonte: Philippe *et al.* (2005), com permissão de Elsevier.

Segundo Fox e Hoynes (1975), o papel do fosfato de cálcio é o que determina a união das micelas, e qualquer tipo de alterações neste equilíbrio entre o cálcio solúvel (iônico) –

ligado ao citrato e fosfato – e coloidal –ligado a proteínas tem influência na estabilidade na prova do álcool (SILVA, 2003).

Com a geração de uma quantidade maior de fosfato de cálcio coloidal, eleva-se a concentração de hidrogênio ( $H_3O^+$ ) na fase aquosa, conseqüentemente diminuindo o pH e resultando na positividade da prova do álcool. Com o aquecimento do leite, conforme mostrado na Tabela 2, ocorre o deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal, com precipitação do fosfato tricálcico, pela pouca solubilidade a altas temperaturas (SILVA, 2003).

Tabela 2. Distribuição dos fosfatos no leite à temperatura ambiente

Forma de ocorrência dos fosfatos	Distribuição %
Fosfato coloidal inorgânico	38
Sais inorgânicos solúveis	33
Fosfato coloidal orgânico	20
Esteres orgânicos	7
Lípides	2

Fonte: Fox (1991).

#### 3.4.1. O pH na estabilidade térmica do leite

Não há como discutirmos a interferência do pH na ETL sem levarmos em consideração a qualidade microbiológica do leite. Este parâmetro traz consigo a variação do pH, que é decisiva para a melhor estabilidade do leite. Os valores ideais de pH para que se tenha uma estabilidade estão entre 6,6 e 6,8. Valores em uma faixa mais ácida, abaixo de 6,5, reduzem a força iônica, responsável pela manutenção da estrutura micelar;propiciando o deslocamento do cálcio; e aumentando a concentração de cálcio iônico da fase coloidal para a solúvel;criando assim condições perfeitas para que ocorra a precipitação do leite (ZANELA; FISCHER, 2011).

#### 3.4.2. Os sais na estabilidade do leite

Os principais minerais encontrados no leite, apresentados na Tabela 4, são cálcio e fósforo, que estão basicamente associados com a estrutura das micelas de caseína. Assim, o soro do leite tem relativamente pouco cálcio e fósforo se comparado com leite integral. O leite

também contém pequenas quantidades dos demais minerais encontrados no organismo animal. O cálcio e o magnésio insolúveis encontram-se física ou quimicamente combinados com caseinato, citrato ou fosfato. Assim, o leite tem um mecanismo que lhe permite acumular uma concentração alta de cálcio, ao mesmo tempo em que mantém o equilíbrio osmótico com o sangue (GONZÁLEZ, 2001).

A quantidade de cálcio no leite bovino é de aproximadamente 30 mM. Deste total, grande parte (cerca de 70%) está presente na fase coloidal, o que se refere ao fosfato de cálcio, ligado as micelas de caseína. O restante do cálcio (cerca de 30%) encontra-se ligado ao citrato, que também se apresenta na forma solúvel e coloidal, e fosfatos em forma de íons livres. O cálcio iônico representa de 6 a 10% de todo o cálcio, cerca de 2 mM, sendo essencial para a estabilidade do leite e o equilíbrio do cálcio nas suas três fases (LIN *et al.*, 2003).

Tabela 3. Composição dos sais no leite

<b>Cátions</b>	<b>Concentração* (nM)</b>	<b>Coloidal</b>	<b>Solúvel</b>
Cálcio	26-32	69	31
Magnésio	4-6	47	53
Potássio	31-43	6	94
Sódio	17-28	5	95
<b>Ânions</b>	<b>Concentração* (nM)</b>	<b>Coloidal</b>	<b>Solúvel</b>
Cloreto	22-34	5	95
Citrato	7-11	14	86
Fósforo	29-32	65	35

Fonte: Lucey e Home, (2009).

\*Composição aproximada de sais no leite, incluindo a distribuição entre frações coloidal e solúvel

Ainda segundo Lin, Lewis e Grandinson (2003), o deslocamento das fases do cálcio, pertencentes ao leite, está ligado diretamente ao deslocamento do valor do pH. Em valores de pH mais baixo, o deslocamento acontece da fase coloidal em direção a solúvel, resultando desta forma em um aumento do cálcio iônico.

O citrato tem a função de auxiliar na estabilidade do leite por meio do sequestro de cálcio livre, agindo de forma menos intensa sobre a micela de caseína (VARNAM; SUTHERLAND, 1995). Sua maior concentração (cerca de 94%) está na fase solúvel, e dentro desta fase, mais de 80% está ligado ao magnésio e cálcio. O restante (cerca de 6%), se encontra na fase coloidal ligado às micelas de caseína (FOX, 1981).

A função dos fosfatos na estabilidade do leite e na manutenção da estrutura micelar é estreitamente influenciada pela oscilação do pH no meio, devido ao seu posicionamento nas fases do leite. Quando se encontra em meios mais ácidos, o fosfato coloidal se solubiliza, o que tem como consequência a desestabilização do leite (ROSE, 1962).

Segundo McMahon (2010) os fosfatos se dividem em dois grupos dentro da micela de caseína: os fosfatos orgânicos, com ligações covalentes à caseína como parte das cadeias laterais dos resíduos de fosfoserina; e os fosfatos inorgânicos, presentes como cristais de fosfato de cálcio que são deslocados da micela por acidificação e cuja interação tem caráter mais iônico que covalente.

### **3.5. Leite instável não ácido (LINA)**

O leite instável não ácido (LINA) é uma alteração físico-química em que o leite precipita em solução alcoólica sem, entretanto, haver acidez elevada, ou seja, acidez acima de 0,18% de acidez expressa em ácido láctico (MARQUES *et al.*, 2007; ZANELA, 2004). Esse fenômeno está principalmente ligado à perda de estabilidade da micela de caseína, como também ao desequilíbrio salino e à proporção de cátions divalentes (ZANELA *et al.*, 2015).

Este é um problema que acomete rebanhos leiteiros e/ou indústrias lácteas. Quando processado um leite com baixa ETL, pode ocorrer coagulação durante o processo de tratamento térmico, fazendo com que haja a aderência das proteínas aos equipamentos de processamento, o que resulta em elevação dos custos de limpeza, diminuindo a produtividade e aumento no descarte de leite (BRASIL; NICOLAU; SILVA, 2015).

### **3.6. Tipos de tratamentos térmicos**

Na indústria de alimentos, o tratamento térmico é de suma importância para a conservação e comercialização dos mais variados tipos de produtos (COSTA, 2016). Os principais tratamentos térmicos aplicados ao leite são a pasteurização e o processo Ultra Alta Temperatura - UAT (BRASIL, 1997; BRASIL, 2018). No entanto, a composição química e nutricional pode ser afetada por esses processos (BECKER-ALGERI *et al.*, 2016).

A pasteurização rápida é realizada em equipamento próprio para este fim e o leite é aquecido na faixa de 72 a 75°C por 15 a 20 segundos, também conhecida como pasteurização HTST (*High Temperature, Short Time* – alta temperatura, tempo curto) (SANVIDO, 2007).

Já o processo UHT (*ultra high temperature*) ou UAT é um tratamento térmico em que o leite primeiramente é homogeneizado e em seguida é submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo. Após o tratamento térmico o leite é imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado, sob condições assépticas, em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

Segundo Walstra e Jenness (1984), as principais modificações causadas pela aplicação do calor ao leite são: eliminação de gases; aumento na quantidade de fosfato coloidal e diminuição da concentração de cálcio iônico; isomerização da lactose, que sofre uma degradação parcial, formando lactulose e ácidos orgânicos; hidrólise dos ésteres fosfóricos, particularmente os da caseína; diminuição do pH do leite e aumento do valor de sua acidez; insolubilização de grande parte das soroproteínas devido à desestabilização; inativação de enzimas; reação entre as proteínas e a lactose, especialmente a reação de Maillard, tendo como consequência à diminuição da lisina disponível; formação de grupos sulfidrila livres e agregação das micelas de caseína.

Para um melhor resultado, no processo produtivo do leite UHT deve ter como premissa uma composição balanceada, no que diz respeito a minerais e proteínas, uma boa conservação higiênico-sanitária, além de apresentar, uma resistência ao calor adequada (COSTA, 2016).

### **3.7. Efeitos do tratamento térmico UHT no leite**

Os efeitos oriundos dos tratamentos térmicos geram várias alterações no comportamento do leite durante a sua vida de prateleira, cujas mais usualmente detectadas são a sedimentação e a gelificação (ou coagulação doce) (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A sedimentação é causada pelo desequilíbrio salino e a desestabilização das proteínas existentes no leite, tanto a caseína quanto as soroproteínas. Esta desestabilização proteica e a precipitação dos sais minerais estão diretamente ligados ao efeito da elevação da temperatura durante todo o processo produtivo, tendo seus efeitos iniciados na etapa de pasteurização e sendo mais agravados no processo de ultrapasteurização (SILVA, 2004).

A gelificação pode ser causada, principalmente, pela ação de microrganismospsicrotróficos, sendo o grupo de bactérias que mais favorece a deterioração do leite e produtos lácteos (EMBRAPA, 2020), causando alterações no sabor, odor e aparência. Elas se multiplicam no leite cru ainda antes da pasteurização, na temperatura de 7°C, ou seja,

temperatura de refrigeração, e produzem uma grande quantidade de enzimas termoresistentes que degradam gorduras (lipases) e proteínas (proteases), que continuam atuando nos derivados lácteos mesmo após o a pasteurização rápida ou processamento UHT (PAULO; MONTANHINI; RIBEIRO, 2021).

A formação de sedimentos e gelificação durante o armazenamento reduz a vida útil do produto e ocasiona a sua rejeição pelo consumidor (SILVA, 2004). Estes fenômenos ocorrem principalmente pelo tempo de estocagem do leite, que produz o aumento da microbiota bacteriana psicotrófica, causando a elevação da acidez e o abaixamento do pH. Assim, as proteases atuam hidrolisando a  $\kappa$ -caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropéptido, com isso as micelas se desestabilizam, levando a coagulação do leite (BASTOS,2015).

Com isso, há a desestabilização da  $\kappa$ -caseína, que tem seu efeito ampliado com o aquecimento do leite no processo UHT. Essas alterações também são decorrentes da ação das enzimas proteolíticas e lipolíticas de origem microbiana, que em grande parte são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após a esterilização (GIGANTE, 2004; VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005), promovendo nas proteínas as maiores alterações (CUNHA, 2001).

Além da ação das proteases dos psicotróficos sobre as principais frações protéicas, deve-se ainda considerar que algumas espécies desta categoria possuem ação de conversão do plasminogênio em plasmina, acelerando o processo natural de gelificação (PAULO; MONTANHINI; RIBEIRO, 2021; FELIPUS, 2017). A plasmina é a principal protease natural do leite, responsável pela gelificação que ocorre naturalmente na produção de leite UAT com matéria-prima de qualidade. Porém, em casos de leite com baixa qualidade, esse processo é acelerado pelas proteases de psicotróficos (FELIPUS, 2017).

### **3.8. Prova do álcool**

O teste da estabilidade do leite pela prova do álcool foi introduzido no final do século XIX, na Alemanha, com o principal objetivo de avaliar a presença de acidez, principalmente desenvolvida pelo aumento da contagem bacteriana, quando ainda não era comum o uso do resfriamento na conservação do leite (AYERS; JOHNSON, 1915). A primeira prova do controle de qualidade do leite é a prova do álcool, que determina o aceite ou não da matéria prima pelo laticínio, acarretando a condenação ou desvalorização do leite (ZANELA *et al.*, 2015).

O álcool possui efeito desestabilizante sobre a caseína, pois promove uma redução na constante dielétrica da mistura (leite + álcool), eliminando a barreira de energia que impede a coagulação. Caso essa constante dielétrica seja reduzida até um valor de crítico, as micelas de caseína tendem a se precipitar (LUCEY; HORNE, 2009; SILVA 2004).

Esta prova consiste na mistura, em partes iguais de 2 mL de leite e 2 mL de álcool, com no mínimo a 72% v/v, em um tubo de ensaio ou placa de Petri, como demonstrado na Figura 5, para uma rápida avaliação se a matéria prima deve, ou não, ser recebida pelas empresas de beneficiamento de leite (COSTA, 2016).



Figura 5 – Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) à prova do álcool

Fonte: ZANELA *et al.*, 2015.

### 3.9. Efeitos dos minerais no processamento UHT

No momento em que o leite passa pelo processo de tratamento térmico, e posteriormente na etapa de estocagem, os componentes que mais sofrem alterações são as proteínas. Estes acontecimentos podem gerar alguns problemas técnicos no produto, ocorrendo com maior incidência, a sedimentação e o processo de gelificação (COSTA, 2016).

Durante o aquecimento, ocorre a desestabilização das proteínas do soro que existem no leite, em especial a  $\beta$ -lactoglobulina (SILVA, 2003). Esta desestabilização ocorre principalmente no emprego de temperaturas acima de 80°C, que favorece a interação entre a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\kappa$ -caseína, formando um complexo, demonstrado na Figura 6. Elevadas temperaturas desencadeiam a desestabilização das micelas, por interferirem diretamente na relação com o fosfato de cálcio. O complexo é formado pela interação das duas frações proteicas, sendo estabilizado por interações hidrofóbicas e iônicas e pontes de dissulfetos.

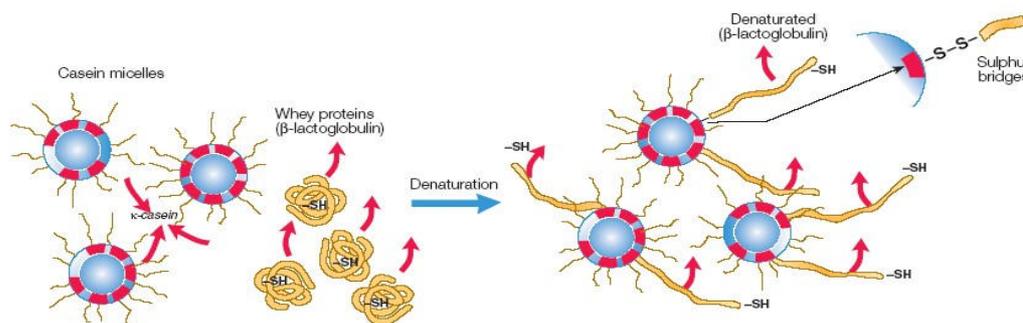


Figura 6. Desestabilização das proteínas

Fonte: Adaptado de Bylund (1995).

Porém, em casos de leite com baixa qualidade, esse processo é acelerado pelas proteases provenientes de psicotróficos (FELIPUS, 2017). Sorhaug e Stepaniak (1997) descrevem alguns defeitos em produtos lácteos e leites processados provenientes da multiplicação de psicotróficos em leite cru antes do tratamento térmico. Sendo em leite UHT, a gelificação e desenvolvimento gradual de sabor amargo, sujo e envelhecido.

Da mesma forma, a sedimentação pode ser desencadeada pela desestabilização das partículas coloidais estáveis; por alterações que afetam a interação eletrostática e espaciais envolvidas na manutenção da integridade das micelas, com o abaixamento no pH; pela decomposição de fosfatos de cálcio; pela desfosforilação das caseínas e pelas reações de polimerização (FOX, 1991). A desestabilização das soroproteínas é acompanhada pela agregação das moléculas, a qual pode ser causada por pontes dissulfetos intermoleculares ou pela aglomeração das soroproteínas desnaturadas com partículas de caseína (RENNER; SCHMIDT, 1981).

Os fosfatos ou mistura de fosfatos têm como principal objetivo minimizar estes processos que trazem problemas ao leite ao longo da sua vida de prateleira, tendo como função a diminuição do teor de cálcio disponível para a formação de pontes salinas entre os complexos proteicos (SILVA, 2004).

### 3.9.1. Fosfatos utilizados em leite UHT

Os fosfatos são compostos preparados a partir do ácido fosfórico, parcialmente ou totalmente neutralizado com íons de metais alcalinos, predominantemente sódio, potássio e cálcio (DZIEZAK, 1990).

Sais estabilizantes de cálcio, como oscitratos e fosfatos, são adicionados no leite e derivados para realizar modificações suas propriedades físicas (KALIAPPAN; LUCEY, 2011). Esses sais estabilizantes podem aumentar a estabilidade proteica do leite (TSIOULPAS *et al.*, 2010), diminuir a floculação nos trocadores de calor (PRAKASH *et al.*, 2007), minimizar a formação de sedimentos e gelificação de produtos UHT (BOUMPA *et al.*, 2008; WALSTRA *et al.*, 1999).

Sendo adicionados no leite, os sais estabilizantes reduzem a concentração de cálcio iônico e o fosfato de cálcio coloidal, ocasionam a dissociação da micela de caseína (OZCAN-YILSAY *et al.*, 2007; GAUCHERON, 2005). Quando ocorre a diminuição da  $[Ca^{2+}]$ , aumenta-se as cargas negativas das micelas e a repulsão entre elas, o que dificulta a coagulação. Inversamente, pH abaixo de 6,5 reduz a força iônica para a manutenção da estrutura micelar, o que determina deslocamento do cálcio da fase coloidal para a solúvel com aumento do cálcio iônico. Logo, as cargas negativas das micelas são reduzidas, o que diminui a barreira energética para a coagulação (SINGH, 2004).

Estudos mostram que o fosfato coloidal de cálcio pode ser removido das micelas sem causar a dissociação proteica e altos níveis de cálcio são removidos causando a desintegração micelar (LUCEY; HORNE, 2009; UDABAGE *et al.*, 2001). Níveis elevados de cálcio iônico estão associados com baixa estabilidade térmica do leite (BOUMPA *et al.*, 2008); logo, menor será a concentração de etanol necessária para promover a precipitação do fosfato de cálcio coloidal (LUCEY; HORNE, 2009). A insolubilização desse sal libera íons  $H^+$ , o que promove a redução do pH (LEWIS, 2011; SINGH, 2004).

A nomenclatura dos agentes sequestrantes do cálcio, os fosfatos e citratos são as seguintes ordens: longas cadeias de fosfatos > tripolifosfatos > pirofosfatos > citratos > ortofosfatos (LUCEY; HORNE, 2009).

Da mesma forma que o citrato, a mistura de fosfato tem suas limitações de funcionalidade e como qualquer ingrediente, tem seu uso definido pela legislação brasileira. Segundo a Portaria nº 370 de 1997 do MAPA (BRASIL, 1997), é permitida a adição de sais estabilizantes no leite UHT no máximo 0,1% expressos em  $P_2O_5$ .

Nos vários tipos de leites, bebidas ou sobremesas lácteas, principalmente com alto percentual de soro em sua formulação, as misturas de fosfatos, combinados ou não ao citrato, têm sido uma alternativa para minimizar os danos causados pelo tratamento térmico à proteína (COSTA, 2016).

### 3.9.2. Tipos de fosfatos

Os compostos de fosfato são constituintes naturais de quase todos os alimentos, tendo por função aumentar a capacidade de retenção da água e proteger contra a rancidez oxidativa, o que se traduz por melhoria na qualidade do produto, garantindo uma sensível melhora no sabor. Os fosfatos alimentícios são utilizados como emulsificantes, *buffers*, estabilizadores de gorduras/proteínas, suplementos minerais, agentes de dispersão, acidulantes (agentes de acidificação), agentes sequestrantes, entre outros. No leite as funções dos fosfatos são controle do pH; agentes complexantes de íons metálicos; agentes de dispersão/suspensão (REVISTA FI, 2012).

Os fosfatos mais utilizados na indústria são os monofosfatos, difosfatos e trifosfatos. Os produtos aprovados para uso em leite UHT no Brasil são: citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio, separados ou em combinação em uma quantidade não superior a 0.1g/100 mL expressos em  $P_2O_5$  (BRASIL, 1997).

Podemos observar no Quadro 2, os tipos, as principais características e algumas nomenclaturas dos fosfatos.

Quadro 2 - Tipos de fosfatos

<b>Tipo de fosfato</b>	<b>Característica</b>	<b>Nomenclaturas</b>
Monofosfato	- Fortíssima capacidade tamponante;	Ortofosfato hidrogenado dissódico
	- Auxílio na elevação do pH.	Ortofosfatodihidrogenadomonosódico
Difosfato	- Boa capacidade tamponante;	Di(piro)fosfato tetrassódico -
	- Boa capacidade de se ligar a cálcio e magnésio;	Di(piro)fosfato trissódico hidrogenado
Trifosfato	- Auxílio na elevação do pH.	Di(piro)fosfato dissódico
	- Boa capacidade de se ligar a cálcio;	Trifosfato Penta sódico
Polifosfato	- Capacidade tamponante médio-forte	Tripolifosfato de sódio
	- Excelente capacidade de troca iônica com cálcio;	Tetra polifosfato de sódio
	- Capacidade de quelar metais;	Hexametafosfato de sódio
	- Retardamento de oxidação lipídica;	Polifosfato de sódio
	- Interação com superfície proteica.	

Fonte: Adaptado de Maurer-Rothmann; Scheurer (2005).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises deste experimento foram realizadas no Laboratório de Química e Tecnologia – QUIMTEC, do Departamento de Química, instalado no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora – MG.

### 4.1. Ensaio preliminares

A pesquisa para a montagem do delineamento contou com uma fase preparatória, na qual os leites foram testados até se chegar na configuração escolhida. Definiram-se os tipos de leite mais adequados e representativos para o objetivo do trabalho (fresco e refrigerado por 7 dias).

Utilizou-se a aplicação do *ProScope* na avaliação de microestruturas do teste do álcool, equipamento já utilizado em experimentos anteriores, para avaliação da qualidade do leite. Notou-se que o teste do álcool tem um tempo curto de leitura. Ao se esperar em demasia, as amostras que seriam consideradas boas acabaram apresentando estrias de desestabilização. Por isso, montou-se um procedimento ágil e linear para que as duas metodologias avaliassem a formação de partículas de um mesmo objeto de análise e, garantindo o mesmo momento de leitura, como se faz na indústria.

Somente na fase preparatória foram realizados 1260 testes e avaliações. Neste período preparatório, elegeu-se como delineamento o estudo das partículas do teste do álcool através da correlação entre os dois métodos óticos (direto e digital).

### 4.2. Tipos de fosfatos utilizados

Como proposta deste trabalho, foram adicionados ao leite pasteurizado integral 15 tipos de fosfatos e/ou citrato de sódio, isolados ou em combinação, numa proporção de 0,05%(m/v) para cada amostra, exceto para a amostra controle, na qual não foi adicionado nenhum fosfato de sódio. A Tabela 4 mostra os tipos de fosfatos utilizados, bem como as combinações deles.

Tabela 4. Variações de fosfatos de sódio e combinações

Amostra	Tipo ou combinação de fosfato de sódio*
1	Amostra controle – sem adição de fosfato ou citrato de sódio
2	Monofosfato de sódio
3	Difosfato de sódio
4	Trifosfato de sódio
5	Polifosfato de sódio
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio
9	Mistura de fosfatos 1
10	Citrato e fosfatos de sódio
11	Citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )
12	Mistura de fosfatos 2
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio
16	Polifosfatos de sódio

Fonte: o autor.

### 4.3. Tipos de leite analisados

As amostras de leite pasteurizado foram avaliadas em dois momentos da vida-de-prateleira: leite pasteurizado fresco (análises realizadas um dia após a data de empacotamento/fabricação) e leite pasteurizado refrigerado estocado por 7 dias à temperatura de 5°C.

Para este experimento empregou-se leite pasteurizado integral padronizado a 3% m/v de gordura, adquirido em Juiz de Fora – MG.

As análises de composição do leite realizadas foram: teor de proteínas pelo método de Kjeldahl, gordura pelo método butirométrico de Gerber, umidade e cinzas pelo método gravimétrico, lactose por diferença, acidez pelo método titrimétrico e pH pelo método potenciométrico, segundo metodologias preconizadas por Brasil (2006).

Também foi realizada a contagem total de microrganismos de acordo com metodologia de Silva (2011).

#### **4.4. Prova do álcool**

As amostras foram submetidas à prova do álcool em concentrações de etanol que variaram de 72%v/v a 98%v/v, em intervalos de duas unidades percentuais. As concentrações foram preliminarmente ajustadas com alcoômetro de Gay-Lussac. Posteriormente, as graduações alcoólicas foram conferidas e reajustadas com auxílio de um densímetro digital Densito 30P (Mettler Toledo, Barueri, SP,) e, para o pH 6,8 a 7,0 com auxílio de potenciômetro Gehaka (São Paulo, SP), modelo PG 1800.

Todos os tratamentos foram realizados em placa de Petri, visando a reaplicação do teste como efetuado na indústria. Para a prova, adicionou-se 2mL de álcool sobre 2mL de leite (entre 3 e 6°C) em cada experimento de variação alcoólica, sendo examinada visualmente a reação de desestabilização ao álcool.

Foi criada uma planilha para registro do ponto de coagulação, utilizando como ponto de referência o número um (1) para indicar o ponto de coagulação, e o símbolo de adição (+), como indicativo do nível de coagulação, sendo +, pouca coagulação, e +++++, muita coagulação.

Para cada ensaio foram utilizadas micropipetas de 1mL exclusivas para evitar contaminações cruzadas. As amostras foram mantidas em geladeira de 3°C a 7°C e os ensaios de álcool foram realizados com as amostras de leite entre 3°C e 6°C. A temperatura do laboratório variou entre 19°C e 21°C durante todo o tempo necessário para a realização das análises.

As concentrações alcoólicas usadas nos ensaios foram em ordem crescente, até a visível desestabilização da solução de leite mais amostras de fosfatos. Foi considerado como resultado da prova do álcool a graduação alcoólica que primeiro gerou aglomerados visíveis a olho nu. O analista que procedeu as leituras dos resultados foi sempre o mesmo em todas as corridas dos testes do álcool.

#### **4.5. Preparação das amostras**

Foram preparados dezesseis tratamentos com a utilização de sais de fosfatos de sódio, além do tratamento controle (sem adição de sais). Foram adicionados um total de 0,05% m/v

de sais para cada amostra de leite, seja o sal puro ou em combinação. As quantidades realizadas nos testes foram de 0,05g de cada sal em cada frasco contendo 100 mL de leite.

As pesagens dos sais foram feitas em balança analítica de precisão Shimadzu AY220 (capacidade de 0,01g a 220g) do Laboratório de Química e Tecnologia –QUIMTEC do Departamento de Química, instalado no Campus da UFJF. Os sais foram adicionados em frascos de vidro de 100mL de boca larga e tampa de metal com selo. A mistura ao leite foi feita entre 3°C e 6°C. Os potes foram agitados de maneira intermitente durante uma hora e depois foram agitados a cada nova intervenção.

Após a submissão de cada amostra a uma estabelecida graduação alcoólica, imediatamente após a observação ótica direta, uma porção da solução oriunda da combinação de leite e sais de fosfato foi transferida para o *ProScope*.

#### 4.6. Microscopia ótica digital

Utilizou-se para esta finalidade o microscópio ótico digital *ProScopeHR (High Resolution HandHeld Microscope)*, um equipamento de alta resolução – além de ser leve (150g), portátil e de manuseio simplificado. Este equipamento consiste num microscópio ótico digital, portátil, com kits opcionais de até seis objetivas de aumento (10x, 30x, 50x, 100x, 200x, 400x) intercambiáveis, interligado por cabo USB ou Wi-Fi a um computador ou tablet, capaz de explorar e capturar imagens e editar pequenos filmes.

Cada corrida do teste de álcool, uma parcela de 10 $\mu$ L da mistura leite/álcool foi transferida com micropipetador KASVI *basic* (volumes de 10 $\mu$ L a 100 $\mu$ L) sobre uma lâmina de microscopia e coberta por lamínula. Uma vez montada, a lâmina foi posicionada diretamente sobre o leitor ótico do *ProScope* fixado na base com a lente objetiva virada para cima. Esta combinação de fixação e posicionamento permitiu um melhor trabalho exploratório das imagens sobre as amostras diminuindo problemas de focalização e não exigindo ajustes óticos do equipamento a cada nova amostra. Usou-se objetivas com aumento de 200x.

A leitura do *ProScope*, conforme identificado na Figura 8 foi obtida diretamente na tela de um computador, mediante uso de software de transferência de imagem *ProScopeHR software*. Cada uma das análises gerou um conjunto de 10 a 12 imagens e 1 a 2 filmes de 15 segundos totalizando 608 imagens e 60 filmes.

Para a captura das imagens e filmes foram adotadas as seguintes especificações do programa de imagens do *ProScope*: resolução 640 x 480, frame rate 15, iluminação na

posição *Daylight*, Brilho 0, contraste 0, matiz 0, saturação 40, nitidez 1, proporção de branco 4.



Figura 9 - *ProScope* uso manual e uso fixado na base

Fonte: Manuais do *ProScope HR*(2016).

#### 4.7. Análises estatísticas

Este experimento foi realizado em 3 repetições. Após submetidas as fontes de variação, as amostras foram avaliadas quanto à prova do álcool. Para a avaliação das micropartículas resultantes da prova do álcool, foram usados dois diferentes métodos de observação: visualização ótica direta em placa de Petri e visualização por microscopia ótica digital ampliada em 200x (*ProScope*).

Foi definido o índice de estabilidade ( $ie$ ), uma variável quantitativa contínua, resultado da seguinte transformação da variável categórica de coagulação:

$$ie_i = 1 - \frac{x_i}{cm}$$

Em que o  $i$ -ésimo índice de estabilidade ( $ie_i$ ) é função da  $i$ -ésima soma de graus de coagulação em escala ordinal ( $x_i$ ) e da soma máxima de graus de coagulação ( $cm$ ).

Dessa forma o índice de coagulação varia de 0 a 1, sendo zero nenhuma coagulação e 1 a coagulação máxima em todos os teores alcoólicos.

Foram aplicadas ambas as abordagens, paramétrica e não paramétrica, ao índice de estabilidade e ponto de coagulação. A abordagem paramétrica (análise de variância seguida por teste de Tukey) não apresentou pressupostos violados na maioria dos casos e coincidiu com os resultados não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas não paramétricas). Em todos os testes foi adotado o nível nominal de significância de 5%.

Todas as análises e gráficos foram feitas no software R versão 4.2.1 (R Core Team, 2022), por meio do programa RStudio versão 2022.02.3+492 (R Studio Team, 2022). Para as análises de variância e testes de Tukey foi utilizado o pacote ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2014).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises do leite

Os resultados das análises físico-químicas de composição centesimal do leite pasteurizado utilizado neste experimento estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise da composição centesimal do leite pasteurizado utilizado no presente estudo

Composição físico-química	Leite pasteurizado
Gordura (% m/v)	3,14 ± 0,03
Proteína (% m/m)	3,17 ± 0,08
Lactose (% m/m)	4,50 ± 0,01
Extrato seco total – EST (% m/m)	11,66 ± 0,12
Extrato seco desengordurado – ESD (% m/m)	8,52 ± 0,08

Fonte: o autor.

Conforme observado na tabela 5, o leite utilizado neste estudo encontra-se dentro dos limites exigidos pela Instrução Normativa nº 76 do MAPA (BRASIL, 2018) para composição físico-química.

Além das análises físico-químicas, também foi realizada contagem total de microrganismos no leite fresco e refrigerado. Os microrganismos mesófilos destacam-se como principais indicadores de qualidade do produto (DA ROSA, 2020). Foi encontrado um total de  $3,63 \times 10^5$  UFC/mL para o leite fresco e  $3,06 \times 10^6$  UFC/mL para o leite refrigerado, demonstrando um possível aumento da contagem com a refrigeração por 7 dias, possivelmente devido à multiplicação de microrganismos psicotróficos.

A maioria das bactérias psicotróficas não sobrevive à pasteurização, porém, muitas de suas enzimas hidrolíticas são termoresistentes, podendo resistir mesmo ao tratamento UHT e permanecerem ativas (ARCURI *et al.*, 2008). Em suma, a presença destes microrganismos são indícios de que há contaminação no leite, fator importante na qualidade e consequentemente na estabilidade do leite.

### 5.2. Índice de estabilidade (IE) e ponto de coagulação das amostras

Estão apresentados na Tabela 6 os resultados médios obtidos do índice de estabilidade do leite (IE), após adição dos fosfatos de sódio, com as sucessivas leituras em diferentes

soluções alcoólicas, tendo sua concentração mínima em 72% (v/v) e a máxima em 98% (v/v) e visualização da coagulação por ótica humana.

Tabela 6. Comparação entre os fosfatos e citrato de sódio utilizados neste experimento em ordem decrescente de índice de estabilidade

<b>Amostra</b>	<b>Fosfato ou citrato de sódio adicionado</b>	<b>IE médio</b>
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	0,9607 <sup>a</sup>
9	Mistura de fosfatos 1	0,9024 <sup>ab</sup>
2	Monofosfato de sódio	0,9000 <sup>ab</sup>
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	0,8869 <sup>ab</sup>
12	Mistura de fosfatos 2	0,8786 <sup>bc</sup>
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	0,8762 <sup>bc</sup>
4	Trifosfato de sódio	0,8679 <sup>bc</sup>
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	0,8560 <sup>bc</sup>
3	Difosfato de sódio	0,8536 <sup>bc</sup>
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	0,8500 <sup>bc</sup>
10	Citrato de sódio e fosfatos de sódio	0,8417 <sup>bc</sup>
11	Citrato de sódio	0,8000 <sup>cd</sup>
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	0,8000 <sup>cd</sup>
16	Polifosfatos de Sódio	0,7583 <sup>de</sup>
5	Polifosfato de Sódio	0,7036 <sup>e</sup>
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	0,4833 <sup>f</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna são iguais estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Conforme estabelecido pela análise estatística realizada, o índice de estabilidade varia de 0 a 1, sendo que: valores de IE mais próximos de zero indicam menor estabilidade do leite, e valores mais perto de 1 indicam maior estabilidade do leite, considerando o teste do álcool realizado.

De acordo com a Tabela 6, a mistura dos sais difosfato de sódio + trifosfato de sódio (amostra 13) foi a amostra que proporcionou maior índice de estabilidade ao leite pasteurizado, quanto ao teste do álcool. Também foi observado que todos os fosfatos e citratos utilizados neste experimento proporcionaram algum grau de estabilidade ao leite se comparados à amostra controle, na qual não havia nenhum fosfato adicionado.

O uso de citratos separados ou em combinação é permitido pela legislação na fabricação do leite UHT (BRASIL, 1997), pois atua como um estabilizante da proteína, desde

que a quantidade usada não seja superior a 0,1 g/100 mL ou até 0.1%. De acordo com Belotie colaboradores (2011) as análises previstas na referida legislação não são suficientes para o controle de qualidade do leite UHT.

A explicação para o aumento da estabilidade do leite com a adição de fosfatos e citratos está baseada na sua influência na prevenção da agregação das micelas de caseínas. Níveis elevados de cálcio iônico estão associados com baixa estabilidade proteica do leite. Os fosfatos de sódio, além de modificar o pH do leite quando adicionados, função prioritariamente exercida de trifosfato de sódio (TSP), também atuam na redução da ligação do cálcio iônico com as micelas de caseína. A diminuição do cálcio iônico disponível promove um aumento da carga negativa líquida das micelas de caseína e da camada de estabilização estérica, aumentando a estabilidade (CUNHA, 2001; RIBEIRO, 2012).

Quando fosfatos e citratos estão em uma formulação, como da formulação 13 (Tabela 6), há um substancial melhora nas ligações iônicas, restabelecendo o equilíbrio das cargas e proporcionando a estabilização das micelas de caseína. Vale salientar que as misturas de fosfatos que obtiveram melhores desempenhos têm em sua formulação difosfato de sódio e trifosfato de sódio (Tabela 6).

Também cabe destacar a baixa performance do citrato de sódio frente a maioria dos fosfatos testados. Tanto no que se refere ao índice de estabilidade (IE), quanto pelo ponto de coagulação, os resultados demonstram a superioridade da maioria dos fosfatos, puros ou misturados, na estabilização das proteínas em relação ao citrato de sódio (Tabela 6).

Costa (2016) elaborou um experimento similar ao apresentado neste trabalho, com a principal diferença de ter se limitado a 3 tipos de sais, utilizando somente leite pasteurizado fresco e avaliando o resultado do teste do álcool através da correlação entre os dois métodos óticos (direto e digital). Neste experimento (COSTA, 2016), a diversidade de combinações e tipos de fosfato, possibilitou uma visão ampla dos resultados da aplicação para cada tipo ou combinação de fosfatos frente ao teste do álcool. Tivemos resultados similares de estabilidade, em relação ao controle, observada nos quinze tratamentos aplicados, formando pelos ambientes salinos, no qual podemos avaliar a real atuação dos sais de fosfatos.

Conforme o experimento de Costa (2016) e também no presente estudo, foi utilizado a proporção de 0,05% (V/V), de cada sal de fosfato, para que pudéssemos ter uma uniformidade no trabalho e proporcionar condições ideais para comparar a funcionalidade das combinações e fosfatos isolados.

A Tabela 7 apresenta os resultados médios obtidos do ponto de coagulação das amostras testadas, após adição dos fosfatos de sódio ao leite, com as sucessivas leituras em

diferentes soluções alcoólicas, tendo sua concentração mínima em 72% v/v e a máxima em 98%v/v e visualização da coagulação por visualização humana.

Tabela 7. Ponto de coagulação médio de todas as amostras (visualização humana)\*

<b>Amostra</b>	<b>Fosfato ou citrato de sódio adicionado</b>	<b>Ponto de coagulação médio em %v/v</b>
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	94,8 <sup>a</sup>
2	Monofosfato de sódio	93,7 <sup>ab</sup>
9	Mistura de fosfatos 1	92,8 <sup>abc</sup>
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	92,3 <sup>abcd</sup>
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	91,3 <sup>abcd</sup>
4	Trifosfato de sódio	91,2 <sup>abcd</sup>
12	Mistura de fosfatos 2	90,5 <sup>bcde</sup>
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	90,5 <sup>bcde</sup>
3	Difosfato de sódio	90,2 <sup>bcde</sup>
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	90,2 <sup>bcde</sup>
11	Citrato de sódio	89,8 <sup>cde</sup>
10	Citrato de sódio e fosfatos de sódio	89,3 <sup>cdef</sup>
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + mofosfato de sódio	89,0 <sup>def</sup>
16	Polifosfatos de Sódio	87,2 <sup>ef</sup>
5	Polifosfato de Sódio	86,0 <sup>f</sup>
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	77,0 <sup>g</sup>

\* médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna são iguais estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: o autor.

Pode-se notar ordenação semelhante dos fosfatos com relação ao índice de estabilidade e ponto de coagulação. O controle apresenta o menor índice de estabilidade (média de 0,48 de acordo com a Tabela 6) e menor ponto de coagulação médio (77% de concentração alcoólica) (Tabela 7). Por outro lado, a amostra 13 apresenta 0,96, o maior índice de estabilidade (Tabela 6) e ponto de coagulação em 94,8% de concentração alcoólica (Tabela 7), demonstrando boa correlação entre as duas análises. Podemos avaliar que a amostra 13 tem maior resistência ao ser exposta a prova do álcool, superando um teor alcoólico acima de 94°GL, nos dois métodos de visualização.

Como também observado no experimento realizado por Costa (2016), ocorreu uma sensível melhoria na estabilidade do leite em todas as concentrações alcoólicas das amostras quando acrescidas de sais de fosfato e/ou citratos frente a amostra de controle. O ponto de

coagulação dos dois experimentos (este e o elaborado por Costa (2016)) foi similar, quando adicionado o difosfato de sódio + trifosfato de sódio no leite (amostra 13), demonstrando a funcionalidade destes tipos de fosfato quanto a melhoria da estabilidade do leite.

A relação proposta neste trabalho é entre a maior resistência do leite adicionado com fosfatos, aos efeitos da prova do álcool, com a manutenção da estabilidade das proteínas. Como a estabilidade ao etanol foi elevada, é muito possível que o leite adicionado de fosfatos também apresente estabilidade ao tratamento térmico em alta temperatura. Tendo o leite capacidade de suportar os tratamentos de alta temperatura sem perda da estabilidade, torna possível a produção de muitos produtos lácteos esterilizados e com vida-de-prateleira longa (SINGH, 2004).

### 5.3. Leite fresco e leite estocado refrigerado

As análises do índice de estabilidade (IE) médio e ponto de coagulação médio do leite fresco e estocado refrigerado estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Ponto de coagulação médio dos tipos de leite\*

<b>Leite pasteurizado</b>	<b>IE médio (p = 0,54713)</b>	<b>Ponto de coagulação médio (p = 0,40775)</b>
Fresco	0,821 <sup>a</sup>	89,5 <sup>a</sup>
Estocado refrigerado por 7 dias	0,831 <sup>a</sup>	90,0 <sup>a</sup>

\*médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna são iguais estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: o autor.

Não houve diferença significativa entre o índice de estabilidade (IE) médio e ponto de coagulação médio do leite fresco e estocado refrigerado (Tabela 8). Mesmo tendo ocorrido uma contagem maior de microrganismos mesófilos de 1 ciclo logarítmico para o leite estocado refrigerado (dado apresentado no item 5.1), esta diferença não foi suficiente para alterar a estabilidade do leite.

### 5.4. Métodos de visualização – direta e em microscopia *ProScope*

As análises da visualização pelo olho humano (direta) e pelo equipamento de microscopia *ProScope* estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Ponto de coagulação médio por tipo de visualização (direta ou *ProScope*)\*

<b>Visualização</b>	<b>IE médio (p = 0,006717)</b>	<b>Ponto de coagulação médio (p = 0,0003307)</b>
Direta	0,840 <sup>a</sup>	90,7 <sup>a</sup>
<i>ProScope</i>	0,813 <sup>b</sup>	88,8 <sup>b</sup>

\*médias seguidas da mesma letra numa mesma coluna são iguais estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: o autor.

Nota-se que existe diferença significativa entre os dois métodos de visualização, conforme Tabela 9. A visualização direta tende a superestimar a estabilidade e o ponto de coagulação do leite, o que pode acarretar problemas tecnológicos.

O microscópio *ProScope* tem uma colaboração determinante no processo indicativo de qualidade, na seleção dos leites, mantendo a sua simplicidade, para que a tomada de decisão dos responsáveis pelo setor de qualidade das unidades fabris tenha maior segurança e possa ser registrada. Sendo assim, podemos considerar o microscópio ótico digital *ProScope* um equipamento útil para a indústria láctea, sendo primordial para uma maior assertividade na leitura das micropartículas do leite. Os experimentos mostram informações que permitem fazer uma correlação direta entre os dois métodos óticos avaliados. Esta aferição traz maior segurança na previsibilidade dos efeitos da utilização das misturas e fosfatos puros nos leites, e vislumbra a melhoria no aumento da estabilidade das proteínas.

A utilização do método de visualização microscópica reduz, consideravelmente, a subjetividade na interpretação das leituras, mas pode gerar informações por imagem. Isso nos municia de dados, que auxiliam na idealização de um banco de imagens específico para cada tipo de produto.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo foi possível chegar às seguintes conclusões:

- Todos os fosfatos e citratos de sódio utilizados nas condições deste estudo, isolados ou em combinação, aumentaram a estabilidade do leite, se comparados ao tratamento controle, no teste do álcool;
- Os leites adicionados de difosfato de sódio + trifosfato de sódio (mistura de difosfato de sódio e trifosfato de sódio) e de misturas de fosfatos 1 apresentaram maior estabilidade ao etanol, sendo os mais indicados para uso como estabilizantes no processo UHT;
- Não houve diferença significativa ( $p = 0,54713$ ) quanto ao índice de estabilidade dos leites adicionados de fosfatos com relação ao fato de estarem frescos ou estocados refrigerados ( $5^{\circ}\text{C}$ ) por sete dias;
- Houve diferença significativa entre os dois métodos de visualização (ótica humana e microscopia eletrônica *ProScope*) utilizados, sendo que a visualização direta tende a superestimar a estabilidade e o ponto de coagulação do leite;
- A aplicação da microscopia *ProScope* demonstrou a sua aplicabilidade, se mostrando eficaz e adequada para a seleção e avaliação da qualidade das matérias-primas, a ser utilizada na indústria.
- A observação da prova do álcool, em conjunto com a visualização microscópica, é uma ferramenta importante na seleção do leite para uso na indústria de laticínios;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOKI, T.; UMEDA, T.; KAKO, Y. The least number of phosphate groups for crosslinking of casein by colloidal calcium phosphate. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 4, p. 971-975, 1992.

AYERS, S. H., JOHNSON, W. T. The alcohol test in relation to milk. **Bulletin of the US Department of Agriculture**, n. 202, p.1-34, 1915.

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

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; TAMANINI, R. *et al.*, Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.16, p. 2, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. **Relatório Anual**. 2020. 36 p. Disponível em: < <https://ablv.org.br/wp-content/uploads/2021/05/ABLV-Relatorio-Anual-2020.pdf>>. Acesso em: 20 de set. 2022.

BASTOS, R. A. **Influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotróficas do leite nas características do queijo prato durante a maturação**. 2015. 210 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

BECKER-ALGERI, T. *et al.* Efeito do tratamento térmico nos níveis nutricionais do leite. *In: 6º COSIMP. UNIOESTE*, nov. 2016, Cascavel. **Anais [...]**. Cascavel, 2016.

BOUMPA, T. *et al.* Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goat's milk. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 160–166, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 370, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 172, p. 19.700, 8 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprovam os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, na forma desta Instrução Normativa e do Anexo Único. **Diário Oficial da União**, 30 nov. 2018. Seção 1, p. 9, 2018.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Altera o Decreto nº 1812, de 08 de fevereiro de 1996. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da 51 Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterado pelo Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 29 mar. 2017. Seção 1, p. 03, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico- Químicos, para

Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 07 de outubro de 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, Brasília, 13 out. 1981, 2002, p. 19381.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 370, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.172, 8 set. 1997. Seção I. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UAT (UHT). **Diário Oficial da União**, 07 mar. 1996.

BRASIL, R.B.; NICOLAU, E.S.; SILVA, M.A.P. Leite instável não ácido e fatores que afetam a estabilidade do leite. **Ciência Animal**, v. 25, n. 4, p.15-26, 2015.

BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. TETRA PAK Processing Systems, A.B. 1. ed. Lund, Suécia, 1995.

COSTA, C. H. F da. **Avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool visando processamento UHT**. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Faculdade de Farmácia, UFJF, Juiz de Fora, 2016.

CUNHA, M. F. REVISÃO: leite UHT e o fenômeno de gelatinização. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 341-352, jul./dez, 2001.

DA ROSA, D. R.; DE SOUZA, E. S.; GALVÃO, J. A. Microrganismos mesofílicos em leite UHT. **Revistado Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 4, p. 281-289, out/dez, 2020.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles: Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.

DALGLEISH, D. G., CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, n. 3, p. 449-467, 2012.

DALGLEISH, D. G.; PARKER, T. G. Binding of calcium ions to bovine  $\alpha$ s1-casein and precipitability of the protein-calcium ion complexes. **The Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 1, p. 113-122, 1980.

DARLING, D. F.; DICKSON, J. The determination of the zeta potential of casein micelles. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n. 2, p. 329-332, 1979.

DZIEZAK, J. D. Phosphates improve many foods. **Food Technology**, v. 44, p. 80-92, 1990.

FELIPUS, N. C. **Impacto do Transporte a Granel na Qualidade Microbiológica e Físico-Química e na Composição do Leite Cru Refrigerado em Indústria De Laticínios**. 2017. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages – Santa Catarina, 2017.

FOX, P. F. et al. Production and Utilization of Milk In: FOX, P.F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY P.L.H.; O'MAHONY, J. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2nd Switzerland: Springer International Publishing, 2015, cap. 1, p 1-19.

FOX, P.F. Heat induced changes in milk preceding coagulation. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 11, p. 2127- 2137, 1981.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition**, v. 45, p. 473– 483, 2005.

GAUCHERON, F. Interactions caséines-cations. **Minéraux et produits laitiers**, p. 81-112, Paris: Lavoisier, 2004.

GIGANTE, M. L. **Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo, RS: UPF, 2004. 331p.

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. (Ed.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001, p. 44-47.

GOULDING, D. A; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. Chapter 2 – Milk proteins: An overview. In: BOLAND, M.; SINGH, H. (ed.). **Milk Proteins**. 3rd ed. [S.I] Editora: Academic Press, 2020. p. 21-98.

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. 6127-6146, 2013.

HOLT, C., TIMMINS, P., ERRINGTON, N., LEAVER, J. A core shell model of calcium phosphate nanoclusters stabilized by  $\beta$ -casein phosphopeptides, derived from sedimentation equilibrium and small angle X-ray and neutron scattering measurements. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 1, p. 73-78, 1998.

HOLT, C.; DALGLEISH, D. G. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 114, n. 2, p. 513-524, 1986.

HOLT, C.; DALGLEISH, D. G.; JENNESS, R. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. **Analytical Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 154-163, 1981.

HORNE, D. S. Casein micelle structure: models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.11, p.148-153, 2006.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability, In: BOLAND, M.; SINGH, H. (ed.). **Milk Proteins: expression to food**, 2009. p. 133-162.

HORNE, D.S. Chapter 6 – Casein Micelle Structure and Stability. In: BOLAND, M.; SINGH, H. (ed). **Milk Proteins**. 3rd ed [S.I], Academic Press, 2020. p.213250.

KALIAPPAN, S.; LUCEY, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4255–4263, 2010.

KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. *In*: P. L. H. McSweeney; P. F. Fox (Eds.), **Advanced dairy chemistry**, v. 1, 3rd ed., p. 233-276, Boston: Springer US, 2003.

KRUIF, C. G. Casein micelle interactions. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3, p. 183-188, 1999.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 1-13, 2011.

LIN, M. J.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. G. Effect of pH on the calcium movement in milk between colloidal and ionic phases. In: **CONFERENCE IN ANIMAL PRODUCTION**, 9, 2003, Porto Alegre. Anais [...], Porto Alegre: World Association on Animal Production, 2003.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Milk salts: technological significance, *In*: P. F. Fox and P. L. H. McSweeney. **Advanced Dairy Chemistry – 3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC, 2009. p 351-389.

MARCHIN, S., PUTAUX, J., PIGNON, F., LEONIL, J. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultrasmallangle x-ray scattering. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 4, 45101, 2007.

MARQUES, L.T. et al., Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físicos químicos do leite. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, n. 5, p. 91-97, 2007.

MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER G. **Stabilization of milk protein systems**. A JohaGuide. BK Giulini GmbH, Ludwigshafen, Germany, 2005. 50p.

MEHTA, N. G. ABO (H) blood group antigens of the human erythrocytes membrane: contribution of glycoprotein and glycolipid. **Journal Membrane Biology**, n.52, p. 17-24, 1980.

MEZZENGA, R., FISCHER, P. The self-assembly, aggregation and phase transitions of food protein systems in one, two and three dimensions. **Reports on Progress in Physics**, v. 76, n. 4, 46601, 2013.

MCMAHON, D.J.; OOMMEN, B.S. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. *In*: MCSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. (ed.). **Advanced Dairy Chemistry** Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 4th. New York: Springer, 2013. p. 185-209.

NEGRI, L. *et al.* Factores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol en leche cruda de calidad/higiéfica adecuada. **Informe técnico final Del proyecto**. INTA EEA / Rafaela – INTI CITIL Rafaela, AR. 2001.

O'CONNELL, J. E. *et al.* Mechanism for the ethanol dependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4424-4428, 2001.

OLIVEIRA, L. N. *et al.* Avaliação do índice de soroproteínas não desnaturada como um indicador de tratamento térmico para leite UHT e leite em pó. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 2, p. 7884, mar/abr, 2015.

OLIVEIRA D. S.; TIMM C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 259-263. 2006.

OZCAN-YILSAY, T.; LEE, W.-J.; HORNE, D.; LUCEY, J. A. Effect of trisodium citrate on rheological and physical properties and microstructure of yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.4, p.1644–1652, 2007.

PAULO, I. A.; MONTANHINI, M. T. M.; RIBEIRO, L. F. Consequência da presença de bactérias psicrófilas em leite e derivados. **GETEC**, v.10, n.25, p.1-8, 2021.

PHILIPPE, M. *et al.* The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles. **Food Chemistry**, n. 90, v. 4, p. 673-683, 2005.

PRAKASH, S.; DATTA, N.; LEWIS, M.; DEETH, H.; Reducing fouling during UHT treatment of goat's milk. **Milchwissenschaft**, v. 62, p. 16-19, 2007.

QI, P. X. Casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait*, **Dairy Science and Technology**, v.87, p.363–383, 2007.

RENNER, E.; SCHMIDT, R. H. **Chemical and physico-chemical aspects**. In: International Dairy Federation. New monograph on UHT milk. Brussels, p. 49-64. 1981.

REVISTA FI - FOOD INGREDIENTES BRASIL. Dossiê dos fosfatos – os fosfatos em alimentos, n. 21, p.37-53, 2012. Disponível em: <<https://revistafi.com/artigos/ingredientes-funcionais/fosfatos-alimenticios-makeni>>. Acesso: 25 abr. 2022.

RIBEIRO, E. K. F. **Alterações nas propriedades físico-químicas do leite esterilizado adicionado de estabilizantes durante a estocagem**. 2012. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.

ROSE, D. Factors affecting the heat stability of Milk. **Journal of Dairy Science**, n.45, p. 1305-1311, 1962.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. Pirassununga: Manole. 2007.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de estocagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira.** Orientador: Mirna Lúcia Gigante. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, P. H. F. Leite UHT: fatores determinantes para a sedimentação e gelificação. 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

SILVA, N. N. et al. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 22, e2018185, 2019.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação.** 1ª Edição. Juiz de Fora: Templo, 124 p., 2004.

SILVA, N. N. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** São Paulo: Livraria Varela, 2010. 617 p.

SINGH H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, 2004.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-41, 1997.

SWAISGOOD, H. E. **Chemistry of the caseins.** In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.). **Advanced Dairy Chemistry**, v. 1. , 3. ed., p. 139-201, Boston: Springer US, 2003.

TSIOULPAS, A. *et al.* Effects of stabilizer addition and in-container sterilization on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, v.122, p.1027–1034, 2010.

TUINIER, R.; KRUIF, C. G. Stability of casein micelles in milk. **The Journal of Chemical Physics**, v. 117, n. 3, p. 1290-1295, 2002.

UDABAGE, P.; MCKINNON, I.R.; AUGUSTIN, M. A. A. Effects of mineral salts and calcium chelating agents on the gelation of renneted skim milk. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 7, p. 1569-1575, 2001.

ZANELA, M. B et al. **Minicurso: Leite instável não ácido (LINA): do campo a indústria.** Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor de Ciências Agrárias Curitiba/PR. p.16. 2015.

ZANELA, M. B; FISCHER, Vivian. **Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no Subtrópico.** Capítulo VIII - Fatores que afetam a estabilidade do leite ao álcool. UPF EDITORA/PR. p.161. 2011.

ZANELA, M. B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA).** 2004. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, RS. 2004.

WALSTRA, P. **Physical chemistry of foods.** Boca Raton: CRC Press, 2002, 831 p.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J. A.; NOOMEN, A. J.; A. JELLEMA, A. VAN BOEKEL M. A. J. S. **Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes**. New York, NY: Marcel Dekker Inc, 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y FÍSICA LACTOLÓGICA**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984.

WHITE, J. C. D.; DAVIES, D. T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. **The Journal of Dairy Research**, v. 25, n. 2, p. 236-255, 1958.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y Productos Lácteos: Tecnología, Química y Microbiología**. Zaragoza (España): Acribia, 1995. 476 p.

VIDAL-MARTINS, A. M. *et al.* Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.698-704, 2005.

## ANEXOS

Tabela 1 - Visualização da coagulação do leite fresco em ótica direta – repetição 1

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	1	-	1	1+	1++	1+++	1++++	1++++	1++++	1++++	1++++	1++++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1+++
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1	1+++	1++++	1++++
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1++++
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1++	1++++	1++++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++	1++++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1++
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1++	1++++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+++	1+++	1++++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	1+++
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1+	1++	1++++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 2 - Visualização da coagulação do leite fresco em ótica direta – repetição 2

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	-	-	1	1	1+	1++	1+	1++++	1++++	1++++	1++++	1++++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1+
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+++	1++++	1++++	1++++
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1++	1++++
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++	1++++	1++++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1+++	1++++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	1
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1+++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++	1+++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	1+++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++	1++++	1++++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 3 - Visualização da coagulação do leite fresco em ProScope – repetição 1

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	1	-	1+	1++	1+++	1++++	1++	1+++	1++	1++	-	1+++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1+	1+++	
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++	1	1++	1+++	1+
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1+++	1++	1+++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++	1+++	1++++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1+++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1++++
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	1	-	1+	1++	1+++	1++++	1++	1+++	1++	1++	-	1+++
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 4 - Visualização da coagulação do leite fresco em ProScope – repetição 2

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	-	1	1+	1	1+	1++	1+	1+++	1++	1+++	1+	1++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1++++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+	1++
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	1+	1+
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	1++	1++++	1++++	1++++
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1++	1+++	1+++
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	1+++	1++++	1+++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1++++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+	1+
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++	1++++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1++	1++++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1+	1+	1++++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1+
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1+
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	1++++	1++++	1++++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 5 - Visualização da coagulação do leite estocado refrigerado em ótica direta – repetição 1

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	1	1	1+	1+++	1++	1++++	1+++	1++++	1++++	1++++	1++++	1++++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1	1+++	1++++	1++++
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1++	1	1++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++	1+	1+++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1+	1++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	1+
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1++++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 6 - Visualização da coagulação do leite estocado refrigerado em ótica direta – repetição 2

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)														
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98	
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	1	-	-	1	-	1++	1+++	1+++	1++++	1++++	1++++	1++++	
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1++	1+++	1++++	
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1++	1+++	1++++	
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1++	1++++	1++++	
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1+	
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++	1+++	
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1+	1++	
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	1+++	
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1+++	1+++	
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++	1++++	
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1++	1++
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+++	1+++	
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1++	1++++	1++++	1++++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 7 - Visualização da coagulação do leite estocado refrigerado em ProScope – repetição 1

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	1	-	1+	1++	1+++	1++++	1++	1+++	1++	1++	-	1+++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1+	1+++	
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++	1	1++	1+++	1+
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1+++	1++	1+++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++	1+++	1++++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1+	1++	1+++
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1++++
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	1	-	1+	1++	1+++	1++++	1++	1+++	1++	1++	-	1+++
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+++

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.

Tabela 8 - Visualização da coagulação do leite estocado refrigerado em ProScope – repetição 2

Tratamento	Descrição	Níveis de etanol (%v/v)													
		72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	98
1	Amostra controle – sem adição de fosfato de sódio	-	-	-	-	-	1+	1++	1++	1+++	1++++	1++	1+++	1++	1++
2	Monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1+	1++
3	Difosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1++	1+++	1++++
4	Trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1++	1+++	1++++
5	Polifosfato de sódio	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+	1++	1++	1++	1++++	1++++
6	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1++	1+
7	Trifosfato de sódio + polifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+	1+++	1++
8	Trifosfato de sódio + monofosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1+	1++	1+++
9	Mistura de fosfatos 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	1++	1+++
10	Citrato e fosfatos de sódio	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	-	1+	1+	1+++	1++
11	Citrato de sódio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++	1++	1+++
12	Mistura de fosfatos 2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1+	1+
13	Difosfato de sódio + trifosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
14	Monofosfato de sódio + fosfato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++	1+
15	Difosfato de sódio + bicarbonato de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+	1++	1++++	1+++
16	Polifosfatos de sódio	-	-	-	-	-	1	1	1+	1+	1+	1++	1+++	1++	1+

Legenda: (1) ponto de coagulação; (1, 1+, 1++, 1+++ , 1++++) nível de coagulação sendo +, pouca coagulação e +++++, muita coagulação; (-) ausência de coagulação.