

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

CLÁUDIO HUMBERTO FERREIRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DO LEITE PASTEURIZADO SUBMETIDO
AO TESTE DO ÁLCOOL VISANDO PROCESSAMENTO UHT**

**JUIZ DE FORA
2016**

CLÁUDIO HUMBERTO FERREIRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DO LEITE PASTEURIZADO SUBMETIDO
AO TESTE DO ÁLCOOL VISANDO PROCESSAMENTO UHT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Faculdade de Farmácia da 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.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca Da Silva.

Coorientador: Dr. Rodrigo Stephani.

JUIZ DE FORA

2016

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

Costa, Cláudio Humberto Ferreira da.

Avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool visando processamento UHT / Cláudio Humberto Ferreira da Costa. -- 2016.

102 p.

Orientador: Paulo Henrique Fonseca da Silva

Coorientador: Rodrigo Stephani

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, 2016.

1. Leite UHT. 2. Sais Estabilizadores. 3. Estabilidade ao álcool. 4. Microscópio Ótico ProScope. 5. Difração a laser Microestruturas. I. Silva, Paulo Henrique Fonseca da, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

**AVALIAÇÃO MICROESTRUTURAL DO LEITE PASTEURIZADO SUBMETIDO
AO TESTE DO ÁLCOOL VISANDO PROCESSAMENTO UHT**

Cláudio Humberto Ferreira da Costa

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca Da Silva

Coorientador: Dr. Rodrigo Stephani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como requisitos necessários à para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em: 24 de agosto de 2016.

Dr. Murilo Hadad Pires

Dr. Rodrigo Stephani

Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca Da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de pós-graduação em ciência e tecnologia do leite e derivados da UFJF que me permitiu voltar à academia para rever conceitos, além de fazer uma atualização teórica de qualidade nas ciências com as quais lidamos todos os dias.

Agradeço à empresa Globalfood na pessoa do senhor Klaus Hasserodt, que deu todo o apoio e correu o risco de disponibilizar parte do nosso tempo para uma tarefa paralela ao trabalho do dia a dia.

Agradeço ao Departamento de Química da UFJF, na pessoa do Professor Doutor Luiz Fernando Cappa de Oliveira que disponibilizou o Laboratório Microestrutural e Microanálise (Micro) do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (NEEM/UFJF).

Agradeço ao Doutor Rodrigo Stephani pelo seu envolvimento direto com os experimentos desde a concepção dos delineamentos, pelo seu empenho, suas boas ideias e pelo seu domínio operacional do Laboratório Microestrutural e Microanálise sem o qual muito pouco do que conseguimos teria sido feito.

Agradeço aos meus anjos da guarda João Pablo Fortes Pereira, Marcela Duarte Villas Mishima e Jacinta Ferreira da Costa que, foram meus múltiplos braços na preparação e durante as corridas dos experimentos, sem os quais seria impossível realizar tantas tarefas e com tanta precisão.

Agradeço ao Doutor Murilo Haddad Pires e demais membros da banca, já citados individualmente acima, que gentilmente aceitaram fazer parte da avaliação deste trabalho.

Finalmente agradeço ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Henrique Fonseca da Silva, que conseguiu me arrancar da rotina, me convidando e dando coragem para voltar aos livros, o que me fez um bem imenso e que, espero, traga algum fruto prático para o nosso setor laticinista.

RESUMO

Atualmente o teste do álcool é uma das avaliações mais difundidas para a liberação do leite destinado ao processamento UHT. A partir de seus resultados a indústria reduz perdas de lotes por desestabilização proteica, precipitação, gelificação e consegue aumentar a produtividade. Considerando o custo de interrupções de produção e o custo de cada turno de limpeza economizado, pode-se depreender o valor de um teste rápido que indique o ponto de equilíbrio para a maior estabilidade térmica de determinado lote de leite a ser processado. O teste do álcool é simples e barato, mas carece de confiabilidade e depende de avaliação subjetiva. Sendo assim, procurou-se avaliar novas metodologias para aumento da acurácia do teste do álcool. Optou-se por estudar as microestruturas do leite que se formam quando em contato com o álcool, na faixa de 72%(v/v) a 96%(v/v), em quatro condições de estabilidade diferentes, e através de três metodologias de visualização diferentes. Partiu-se de quatro amostras de leite integral pasteurizado nas versões: sem adição de sais estabilizadores, com adição de citrato de sódio, com adição de fosfato dissódico e com adição de uma mistura de citratos e fosfatos. As amostras assim preparadas foram submetidas ao teste do álcool. Confrontou-se a visualização ótica direta em placa de Petri com o microscópio ótico digital *ProScope* e com o analisador de partículas por difração a laser LS 13 320 (*Beckman Coulter*). Verificou-se que houve alta correlação entre os dois métodos qualitativos, ótico direto e o microscópio ótico digital com $p < 0,01$. Os resultados mostraram que o processo de aglutinação das proteínas se inicia bem antes da capacidade de percepção do olho humano. A facilidade de operação, o baixo investimento, a capacidade de registro digitalizado e os resultados obtidos permitem indicar o uso do microscópio ótico digital *ProScope* como equipamento de linha nos laboratórios das indústrias de leite UHT, tanto como argumento de liberação, como ferramenta de ajustes finos das dosagens de sais estabilizadores. Inédito como metodologia de apoio para elucidar as ocorrências do teste do álcool ao nível micrométrico, o LS foi capaz de avaliar as partículas nas regiões nanométricas do leite, dando respostas quantitativas e de alto grau de acurácia quanto ao processo de desestabilização ao álcool e demonstrando de maneira muito clara o efeito dos sais no aumento da estabilidade do leite no teste de performance ao etanol. A mistura de citratos e fosfatos foi o tratamento de maior efetividade no aumento da estabilidade do leite ao álcool.

Palavras-chave: Leite UHT. Microestruturas. Sais estabilizadores. Citrato. Fosfato. Microscópio ótico *ProScope*. Difração a laser. Estabilidade ao álcool.

ABSTRACT

The ethanol test is currently among the most spread and known control tests to release the milk batches designed to the UHT processing. Based on its results, the industry reduces batches loss by destabilization, precipitation, gelation and increases the productivity. Considering the production interruption cost and the cost of each cleaning relay saved, it is possible to surmise the value of a rapid test which shows the equilibrium point to the highest thermal stability of a milk batch to be processed. The ethanol test is simple and cheap, but it lacks reliability and depends on subjective observation. Being so, new methodologies were assessed in order to improve the ethanol test precision. It was decided to investigate the milk microstructures formed when it comes into contact with the ethanol in the range of 72%(v/v) to 96%(v/v), in four different conditions of stability, through three visualization methodologies. The test begun with four samples of hole pasteurized milk in different versions as: with no addition of stabilizer salts; with addition of sodium citrate; with addition of disodium phosphate; and with addition of citrates and phosphates mixture. The samples prepared were submitted to the ethanol test. The traditional method of evaluation in the Petri plates (optical direct visualization) was confronted with the optical digital microscope ProScope and with the laser diffraction particle analyzer LS 13.320 (Beckman Coulter). It was possible to infer that there was a positive correlation between the two qualitative methods, optical direct and the optical digital microscope with $p < 0,01$. The results showed the protein agglutination process begins far before the human eye perception capacity. The easy operation, the low investment, the capacity of digital registration and the obtained results, permit to recommend the optical digital microscope, ProScope, as laboratory equipment for the UHT dairy industries. It may also be recommended as a control and authorization argument, as well as a refined adjustment tool for the stabilizer salts dosage. Considered as an unprecedented support methodology to elucidate the ethanol test occurrences at the micrometric scale, the LS was able to assess the microstructures in the milk **nanometric** regions. It gave quantitative data with high precision about the ethanol destabilization process and demonstrates accurately the salt effects in the increase of the milk stability to the ethanol performance test. Beyond, it indicates that the mixture of citrates and phosphates was the treatment with greater effectiveness in the increase of the milk stability to the ethanol.

Keywords: UHT milk. Microstructures. Stabilizer salts. Citrate. Phosphate. Digital microscope ProScope. Laser diffraction. Ethanol stability.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABLV	Associação Brasileira de Leite Longa Vida
°C	Graus Celsius (unidade de temperatura);
Ca ²⁺	Íon cálcio
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
°D	Graus Dornic (medida de acidez)
ETL	Estabilidade térmica do leite
g	grama (unidade de medida de massa)
g/kg	grama por quilograma (unidade de medida de massa)
L	litro (unidade de medida de volume)
LS	Leitor de partículas por difração a laser
LINA	Leite instável não ácido
µm	Micrômetros (unidade de medida de comprimento)
µL	Microlitro (unidade de medida de volume)
mL	Mililitro (unidade de medida de volume)
nm	Nanômetro (unidade de medida de comprimento)
%	Percentual
% m/m	Percentual de massa em relação à massa
% v/m	Percentual de volume em relação à massa
% v/v	Percentual de volume em relação à volume
p	Valor p de probabilidade estatística
pH	Potencial hidrogeniônico
PIDS	<i>Polarization Intensity Differential Scattering System</i>
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
UAT	Ultra-Alta Temperatura
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Modificações das micelas de caseína em diferentes condições. O relevante equilíbrio de cálcio e fosfato de cálcio é destacado 29
- Figura 2:** Curva da estabilidade do leite ao etanol pelo pH, referenciando correlação com a variação do equilíbrio salino..... 31
- Figura 3:** Esquema de espalhamento e captura da luz nas análises de partículas..... 32
- Figura 4:** Precipitado com gelificação 30 dias após envase..... 34
- Figura 5:** Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) ao teste do álcool..... 35
- Figura 6:** Delineamento da avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool, visando processamento UHT..... 39
- Figura 7:** *ProScope* uso manual e uso fixado na base..... 43
- Figura 8:** Equipamento LS 13 320..... 44
- Figura 9:** Registro de dados do teste do álcool aplicado aos quatro tratamentos de sais e avaliados pelo método “visualização ótica direta”. Sendo que (vazio) significa não realizado, (-) significa realizado sem desestabilização aparente, (1-) significa dúvida, (1) significa ponto de coagulação e (1+, 1++, 1+++) significam visualizações crescentes e confirmativas da coagulação..... 50
- Figura 10:** Imagens da visualização do leite pasteurizado sem adição de álcool, nas versões pasteurizado sem adições (P), com adição de citrato de sódio (C), com fosfato dissódico (F), com mix de sais (M): *ProScope* 200x campo 1 (b_1) e *ProScope* 200X campo 2 (b_2)..... 54
- Figura 11a:** Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado sem adições de sais (P) em concentrações de álcool variando entre 72%(v/v) a 90%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b_1) e *ProScope* 200X campo 2 (b_2)..... 56
- Figura 11b:** Continuação da análise das imagens..... 57
- Figura 12a:** Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v) (C) em concentrações de

álcool variando entre 76%(v/v) à 92%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂)..... 58

Figura 12b: Continuação da análise das imagens..... 59

Figura 13a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de fosfato dissódico (F) em concentrações de álcool variando entre 76%(v/v) a 94%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂)..... 60

Figura 13b: Continuação da análise das imagens..... 61

Figura 14a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de Mix de sais Lac 8074-7 (M) em concentrações de álcool variando entre 76%(v/v) a 96%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂) 62

Figura 14b: Continuação da análise das imagens..... 63

Figura 15: Curvas representando a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado com e sem adição de sais e não submetido ao teste do álcool..... 66

Figura 16: Curvas representando a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado sem adição de sais e submetido ao teste do álcool [72%(v/v) a 90%(v/v)]..... 69

Figura 17: Curvas com a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado adicionado de citrato de sódio 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 92%(v/v)]..... 71

Figura 18: Variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 96%(v/v)]..... 73

Figura 19: Curvas com a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado adicionado de Mix de sais LAC 8074-7 a 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 96%(v/v)]..... 76

Figura 20: Registro de dados do teste do álcool aplicado aos quatro tratamentos de sais e avaliados por três diferentes métodos: visualização ótica direta, microscopia ótica digital (*ProScope*) com objetiva 200x e analisador de partículas LS avaliando volume (%) de partículas nas regiões <0,5µm e >10µm. Sendo que (x) significa não realizado, (-) significa realizado sem desestabilização aparente, (1-) significa dúvida, (1) significa ponto de coagulação e (1+, 1++, 1+++) significam visualizações crescentes e confirmativas da coagulação. No LS (Volume% >10µm), os valores em vermelho indicam a zona de resistência à desestabilização..... 80

Figura 21: Dinâmica da evolução das micropartículas do leite pasteurizado quando submetido ao teste do álcool, em quatro condições salinas (sem adição de sais, com citrato de sódio 0,05%(m/v), com fosfato dissódico 0,05%(m/v) e com Mix de sais LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)), avaliados em duas zonas micrométricas (<0,5µm e >10µm) e quantificado pelo analisador de partículas - LS..... 81

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Diferenças de foco entre duas aplicações do teste do álcool 33
- Quadro 2:** Imagens de incrustações em tubulações abertas após um ciclo produtivo do ultrapasteurizador (UHT), em duas situações de ajuste salino..... 35
- Quadro 3:** Comparação de eficiência entre Metodologias ótica direta e microscópica ótica digital..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição físico-química do leite	17
Tabela 2: Fração proteica do leite	18
Tabela 3: Composição salina do leite (mg/100ml)	19
Tabela 4: Composição e propriedades físico-químicas do leite pasteurizado usado no experimento.....	47
Tabela 5: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5µm e >10µm), no leite pasteurizado nos quatro tratamentos de sais e sem os efeitos do teste do álcool.....	67
Tabela 6: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5µm e >10µm), no leite pasteurizado sem adição de sais (Past) e submetido ao teste do álcool nas concentrações de 72%(v/v) a 90%(v/v).....	70
Tabela 7: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5µm e >10µm), no leite pasteurizado adicionado de citrato de sódio (Cit) 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 92%(v/v)].....	72
Tabela 8: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5µm e >10µm), no leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico (Fosf) 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool.....	74
Tabela 9: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5µm e >10µm), no leite pasteurizado adicionado de mistura (Mix) de sais citrato/fosfatos (LAC 8074-7) a 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O leite	17
2.1.1 <i>Composição do leite</i>	17
2.1.2 <i>Fração proteica do leite</i>	18
2.1.3 <i>Composição mineral</i>	19
2.1.4 <i>Estrutura micelar da caseína</i>	19
2.2 Tratamento térmico	21
2.2.1 <i>Estabilidade Térmica do Leite (ETL)</i>	22
2.2.2 <i>Efeitos do aquecimento</i>	23
2.2.3 <i>Outros fatores que afetam a ETL</i>	23
2.3 Teste do álcool	25
2.3.1 <i>Fatores que afetam a estabilidade do leite ao álcool</i>	25
2.3.2 <i>Cálcio iônico</i>	26
2.3.3 <i>Sais estabilizadores</i>	26
2.3.4 <i>Ação da temperatura</i>	28
2.3.5 <i>Leite instável não ácido (LINA)</i>	29
2.3.6 <i>Estabilidade coloidal do leite</i>	30
2.3.7 <i>Relação entre a ETL e a estabilidade do leite ao álcool</i>	30
2.4 Difração a laser	32
3 LIMITAÇÃO DO TESTE DO ÁLCOOL – JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS	36
4.1 <i>Objetivo geral</i>	37
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 <i>Delineamento do experimento – Teste do álcool</i>	38
5.2 <i>Leite pasteurizado padronizado</i>	40
5.3 <i>Pesagem e mistura dos sais estabilizadores</i>	40
5.4 <i>Preparação das soluções alcoólicas</i>	41
5.5 <i>Teste do álcool</i>	41

5.6 Microscopia ótica digital	42
5.7 Medição de partículas por difração a laser (LS)	43
5.8 Análises estatísticas	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1 Ensaio preliminares	46
6.2 Análises do leite	47
6.3 Sais estabilizadores	48
6.4 Soluções alcoólicas	49
6.5 Teste do álcool	50
6.6 Microscopia ótica digital – <i>ProScope</i>	51
6.6.1 <i>Imagens dos leites antes do teste do álcool – Controle</i>	53
6.6.2 <i>Teste do álcool no leite sem adição de sais</i>	54
6.6.3 <i>Teste do álcool no leite com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v)</i>	57
6.6.4 <i>Teste do álcool no leite com adição de fosfato dissódico 0,05%(m/v)</i>	59
6.6.5 <i>Teste do álcool no leite com adição de LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)</i>	61
6.6.6 <i>Procedimento analítico padrão (ProScope) – Teste de performance ao Etanol</i>	64
6.7 Analisador de partículas – LS	64
6.7.1 <i>Resultados dos leites antes do teste do álcool – Controle</i>	65
6.7.2 <i>Considerações gerais - leitura dos efeitos do teste do álcool no LS</i>	67
6.7.2.1 <i>Teste do álcool no leite pasteurizado sem adição de sais</i>	68
6.7.2.2 <i>Teste do álcool no leite com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v)</i> ...	71
6.7.2.3 <i>Teste do álcool no leite com adição de fosfato dissódico 0,05%(m/v)</i> .	73
6.7.2.4 <i>Teste do álcool no leite com adição de LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)</i>	75
6.8 Análise de Correlação	78
6.9 Discussão consolidada das três metodologias	78
7 CONCLUSÃO	84
8 INDICAÇÕES PARA FUTUROS ESFORÇOS	86
REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	93
APÊNDICE – PROCEDIMENTO ANALÍTICO PADRÃO	99

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem correspondido aos desafios da concentração populacional nos grandes centros. O êxodo rural provocou a necessidade de desenvolvimento de soluções alimentares seguras tanto nos aspectos microbiológicos quanto nos aspectos nutricionais. Os produtos alimentícios, outrora produzidos e distribuídos de maneira artesanal, regionalizada e pulverizada, sofreram um forte processo de modernização, passando a ser preparados e distribuídos por um grupo menor de atores, mais especializados e, dedicados a uma escala maior de produção. Por conseguinte, surgiu a necessidade de se investir em pesquisas para conservação dos alimentos a fim de permitir uma distribuição adequada no novo cenário de grandes volumes. O leite não escapou a este cenário e, apesar de ser uma matéria prima altamente perecível, encontrou nas novas tecnologias várias formas de transformação e conservação que conseguiram responder ao desafio. O leite tratado termicamente a altas temperaturas por curto tempo se destacou como solução viável e de grande aceitação e contribuiu para solucionar o fornecimento deste alimento na sua forma fluida e de inegável valor nutricional.

De acordo com os dados apresentados pela Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV), no ano de 2014, a participação do leite longa vida (ultrapasteurizado ou UHT) alcançou 84% do consumo total de leite fluido do país em contraste com o leite pasteurizado. Neste contexto de desenvolvimento da importância comercial do leite UHT, observa-se a necessidade de estudos acerca dos efeitos do aquecimento sobre as qualidades nutricionais do leite e sua estabilidade.

As pesquisas acadêmicas sobre tecnologias e processos envolvendo o leite UHT têm se intensificado. O setor industrial se alia ao esforço científico demandando soluções práticas que auxiliem a rotina operacional. Nesta perspectiva surgiu o uso do teste do álcool como atributo de qualidade para liberação de lotes de leite pasteurizado, destinado ao processamento UHT. Este teste tem se difundido como ferramenta eficiente e de baixo custo para se encontrar o ponto de equilíbrio salino,

no qual cada lote de leite apresente melhores condições de estabilidade para resistir ao binômio tempo/temperatura do processamento UHT.

Desde a década de 1930 o teste do álcool foi aceito como indicador de leite ácido. O Ministério da Agricultura (BRASIL, 1952) normatizou o uso do teste do álcool para plataformas de recepção de leite. Adicionado do indicador Alizarina, o álcool 68° (v/v) foi declarado o ponto de corte inferior para aceitação do leite cru como apropriado para o processamento industrial. A medição era feita individualizada, a cada latão de transporte de leite, usualmente com 50L.

O cenário da coleta, do transporte e da recepção de leite no Brasil se alterou muito, principalmente nos últimos 15 anos. A expansão da eletrificação rural permitiu incrementar o uso da refrigeração nas fazendas, via tanques de expansão. Esta mudança praticamente eliminou o manuseio do leite em latões e consolidou a coleta granelizada. Estas duas mudanças reduziram muito a ocorrência do “leite ácido”, outrora tão comum.

No Brasil, segundo a Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), a concentração mínima do álcool para avaliação de qualidade do leite cru refrigerado na propriedade rural é de 72%(v/v).

Por ser um método de alta simplicidade e de baixo custo o teste do álcool, apesar da melhora dos índices de acidez na plataforma, resistiu ao tempo e ainda é utilizado para recepção do leite generalizado transportado em caminhões.

Há vertentes de entendimento que consideram que o teste do álcool não seria mais adequado para os controles de plataforma, pois, em um cenário de leites de melhor qualidade a acidez deixou de ser o problema principal e que, se evidenciaram outras fragilidades do leite que também afetam a leitura do teste do álcool ocasionando resultados falsos positivos como: leite instável não ácido (LINA), polimorfismo genético da κ -caseína, fatores como espécies, raça, estágio de lactação e alimentação.

No entanto, o teste do álcool revelou também possuir potencialidade de uso na discriminação da qualidade do leite. Segundo Lin, Lewis e Grandinson (2003) a estabilidade ao etanol poderia ser usada como referência de estabilidade do leite destinado ao tratamento UHT.

Autores como Molina *et al.* (2001) estudaram a correlação entre o teste do álcool e a estabilidade térmica do leite (ETL) ao tratamento UHT (135°C a 140°C por 2s a 4s), usando diferentes concentrações de etanol.

A partir do seu uso inicial como estimador da qualidade microbiológica por meio da acidez nas análises de recepção do leite, o teste do álcool migrou então para dentro das fábricas e passou a ser usado também, como indicador da estabilidade térmica dos leites destinados ao processamento UHT.

Atualmente, a maioria dos laticínios brasileiros que produzem leite UHT adota como especificação de qualidade o álcool 80%(v/v) para liberação dos lotes de leite.

Ainda que simples, rápido e de baixo custo, o teste do álcool tem algumas fragilidades como a falta de padronização do método e da forte componente humana na avaliação dos resultados.

A aplicação de metodologias digitais e métodos instrumentais de maior magnitude poderiam reduzir o erro humano no momento da avaliação do teste do álcool, aumentando a sua acurácia e utilidade na tomada de decisão.

Sabe-se que o equilíbrio salino é decisivo na estabilidade térmica do leite (ETL) diante do tratamento UHT. Como a estabilidade do leite ao teste do álcool pode ser associada com a ETL (SILVA, 2004), o teste do álcool passa a apresentar grande interesse na estimativa da ação dos diferentes sais estabilizadores para a ETL.

Depreende-se que, ao aumentar a acuidade da leitura do teste do álcool, oferece-se uma ferramenta de grande valia para auxiliar nos ajustes finos da ETL que, por sua vez, podem se traduzir por efetivos ganhos de produtividade industrial e ganhos de qualidade do produto final, na indústria de leite UHT.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O leite

A Instrução Normativa IN 62/2011 do Ministério da Agricultura define Leite como sendo o produto de ordenha completa, ininterrupta, sob condições de higiene, oriundo de vacas sob condições de bem-estar animal (BRASIL, 2011).

2.1.1 Composição do leite

O leite se caracteriza por uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão de micelas de caseína em uma fase aquosa, além de moléculas de lactose, soro proteínas e sais minerais solubilizados (GONZÁLEZ, 2001). Em média, o leite apresenta a composição apresentada na Tabela 1:

Tabela 1: Composição físico-química do leite

Constituintes	Teor em g/kg	Variação em g/kg
Água	873	855 – 887
Etrato Seco Desengordurado	88	79 – 100
Gordura	39	24 – 55
Lactose	46	38 – 53
Proteínas	32,5	23 – 44
Substâncias Minerais	6,5	5,3 – 8,0
Ácidos Orgânicos	1,8	1,3 – 2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptado de Walstra e Jenness (1984) por Silva e Almeida (1998).

Além dos principais constituintes listados na Tabela 1, o leite contém centenas de outros constituintes como vitaminas, íons e componentes aromáticos, que têm grande importância nas propriedades nutricional, tecnológica e sensorial do

leite e seus derivados (FOX e MCSWEENEY, 1998). As variações se devem a fatores como raça, alimentação, estágio de lactação, sazonalidade e estado de saúde animal (WALSTRA e JENNESS, 1984).

2.1.2 Fração proteica do leite

Os compostos nitrogenados do leite se dividem em proteicos, com 95%, e não proteicos representando 5% do total. Os compostos nitrogenados proteicos se dividem em caseínas, com 80%, e soro-proteínas representando 20% do total. Já os compostos nitrogenados não proteicos compreendem a ureia, o ácido úrico, a creatina e os aminoácidos (ORDOÑEZ et al. 2005). As proteínas estão presentes no leite à razão de 33g/kg e se subdividem conforme o Tabela 2:

Tabela 2: Fração proteica do leite

PROTEÍNAS	Concentração em g/kg
Proteína Total	33
Caseína Total	26
Soro-proteínas	6,3
Proteínas. Associadas ao Glóbulo de Gordura	0,4
Caseína α_{s1}	10
Caseína α_{s2}	2,6
Caseína β	9,3
Caseína γ	0,8
Caseína κ	3,3
α – Lactoalbumina	1,2
β – Lactoglobulina	3,2
Albumina do Soro Bovino	0,4
Imunoglobulinas	0,7
Outros	0,8

Fonte: Silva e Almeida (1998).

As características de muitos derivados lácteos têm sua origem nas proteínas do leite, apesar da gordura, a lactose e os sais também exercerem uma grande influência. As caseínas são as principais proteínas do leite e estão envolvidas na produção da grande variedade dos queijos. Os altos tratamentos térmicos aos quais são submetidos muitos dos derivados lácteos só são possíveis graças a excepcional estabilidade das caseínas às altas temperaturas (FOX e MCSWEENEY, 1998).

2.1.3 Composição mineral

O leite é composto por uma grande variedade de minerais integrados às micelas, podendo se apresentar isolados ou interligados, conforme sua capacidade de ligação. Os sais se distribuem em duas fases: a fase livre ou solúvel e a fase ligada às micelas ou coloidal (ÓRDONEZ *et al.*, 2005).

A observação da composição salina do leite (Tabela 3) mostra o quanto situações extremas se afastam da média, dificultando os processos tecnológicos.

Tabela 3: Composição salina do leite (mg/100ml)

Constituinte	Teor Médio (mg/100ml)	Faixa Usual (mg/100ml)	Extremos Reportados (mg/100ml)
Sódio	50	35 – 60	11 – 115
Potássio	145	135 – 155	115 – 200
Cálcio	120	100 – 140	65 – 265
Magnésio	13	10 – 15	2 – 23
Fósforo Total	95	75 – 110	47 – 144
Fósforo Inorgânico	75		54 – 242
Cloreto	100	80 – 140	
Sulfato	10		
Carbonato (CO ₂)	20		
Citrato (ácido cítrico)	175		

Fonte: Silva e Almeida (1998).

Segundo Walstra e Jenness (1984), os sais do leite se mantêm em equilíbrio constante, se movendo entre as fases solúvel e coloidal conforme variações das condições do meio, como temperatura, pH e concentração salina. E essa mobilidade dos sais pode interferir na estabilidade do leite.

2.1.4 Estrutura micelar da caseína

A estabilidade do leite se deve à organização das caseínas em micelas. A caseína se apresenta como uma proteína globular de conformação quaternária e anfipática tendo uma porção hidrofóbica que se interioriza na estrutura micelar e uma porção hidrofílica superficial (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As caseínas são um grupo de fosfoproteínas específicas do leite que apresentam baixa solubilidade em pH 4,6. São constituídas de micelas com 40nm a 500nm de diâmetro. Segundo o modelo Waugh/Schmidt/Walstra, as micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de várias moléculas de caseína, com a seguinte relação: [α_{s1} : α_{s2} : ($\beta + \gamma$): κ = 4: 1: 4: 1,3]. São mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. O fosfato de cálcio amorfo liga as submicelas entre si, com participação de ésteres fosfatos. Desta forma, quase todas as regiões nas moléculas de caseína têm mobilidade restrita. A porção carboxi-terminal da κ -caseína está predominantemente presente como filamentos flexíveis, orientados para o meio externo (SILVA; ALMEIDA, 1998).

A κ -caseína possui regiões de grande hidrofília em sua molécula orientando-se para o exterior, enquanto as demais se orientam para o interior. Assim, a κ -caseína ocupa uma posição de destaque, atuando como estabilizadora da micela, graças à sua solubilidade ao Ca^{2+} , independente da temperatura (SILVA; ALMEIDA, 1998).

Em Kruif *et al.* (2012) lemos que na literatura vários modelos foram propostos para a estrutura interna das micelas de caseína. O mais antigo e mais frequentemente citado é o modelo de submicelas, baseado na ideia que as caseínas das micelas são ligadas entre si pelo fosfato de cálcio coloidal. Um modelo mais recente, baseado em experimentos com *nanoclusters*, enxergou as micelas como uma matriz homogênea de caseínas na qual *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal estão dispersos como minúsculos grupamentos (de 1,72nm a 2,27nm de raio médio). Ligados à superfície dos *nanoclusters* estão os centros de fosforilação das caseínas. A partir dos resíduos destas caseínas fosforiladas e ligadas aos *nanoclusters* se ligam as caseínas umas às outras formando uma matriz proteica. As ligações entre as caseínas se fazem por uma coleção de forças chamadas de interações fracas. São interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, força de Van der Waals e outros fatores – mas, nenhuma tão forte quanto às interações com o fosfato de cálcio –, e todas construindo a associação entre as caseínas. A associação é altamente cooperativa e originada nas múltiplas interações fracas. E é esta cooperação que torna estável a micela de caseína. Invariavelmente, a κ -caseína se encontrou nos limites dos processos auto-associativos, garantindo a estabilidade das micelas de caseína.

Dalgleish (2011), comparando as estruturas definidas como micelas na ciência de colóides com as partículas de caseína, conclui que o termo não seria realmente aplicável, pois as micelas características são agregados multimoleculares de moléculas anfífilas, enquanto as caseínas compõem uma estrutura com muitas moléculas (mais de 20.000 unidades individuais de proteínas em uma partícula típica), mas estas não estão agregadas com as cabeças hidrofílicas em posição externa e as caudas hidrofóbicas internamente (considerando um solvente polar, como é o caso da água no leite), conformação característica das pequenas moléculas anfífilas normalmente consideradas. As partículas de caseína na verdade resultam da agregação de α -CN e β -CN com fosfato de cálcio e estabilização superficial pela κ -CN. Além disso, a partícula contém porções consideráveis de água (3g a 4 g por g de proteína), este é um fator importante para sua estrutura interna. Além disso, as evidências atuais da falta de evidência de estruturas internas referidas como submicelas por um lado corrobora o modelo de estrutura que considera os nanoclusters de fosfato de cálcio como iniciadores da partícula de caseína, por outro lado torna-se mais um fator no sentido da ênfase de que tais agregados não caracterizam uma micela clássica. A dimensão das caseínas, que é da ordem de nanômetros e a composição complexa, leva a sugestão de que caracteriza mais um nanocompósito do que uma micela (SILVA, L. H. M. Professor Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Comunicação pessoal. 2010 in: PEREIRA, 2013).

2.2 Tratamento térmico

Entende-se por leite UHT (do inglês, *Ultra High Temperature*) ou UAT (Ultra-Alta Temperatura), também conhecido como leite Longa Vida, o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

Segundo Silva (2004), o tratamento térmico do leite, em função de sua intensidade, destrói as microbiotas contaminantes oportunistas, as patogênicas e as esporuladas, garantindo ao público consumidor um produto seguro.

2.2.1 Estabilidade Térmica do Leite (ETL)

O tratamento térmico do leite é uma necessidade industrial que deve ser avaliada quanto à sua intensidade para não trazer prejuízos à qualidade do alimento processado.

A estrutura micelar da caseína é responsável pela alta resistência do leite ao aquecimento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Vários esforços têm sido feitos no intuito de se conhecer melhor em quais condições esta resistência é alterada e o leite perde sua estabilidade.

Num primeiro momento, Miller e Sommer (1940) definiram a ETL baseados na temperatura que uma amostra de leite, de pH ajustado, deve ser aquecida para induzir coagulação dentro de dois minutos. Posteriormente, Horne e Muir (1990) definiram a ETL baseados no tempo necessário para ocorrer a coagulação em condições de temperatura padrão (140°C).

Segundo Silva e Almeida (1998), as variáveis fundamentais que influenciam na ETL são: equilíbrio salino, teor natural de ureia e estabilidade das micelas de caseína; associados a tempo e temperatura.

Segundo Ferron-Baумы *et al.* (1991), o tratamento térmico do leite provoca, em função de sua intensidade, mudanças sobre as propriedades físico-químicas e tecnológicas do leite. O aquecimento a 90°C durante um minuto leva a uma desnaturação na ordem dos 40% ou mais das proteínas solúveis.

Fox (1981), ao estudar o leite submetido ao aquecimento, classificou as mudanças que precedem a coagulação em cinco grupos: produção de ácidos, precipitação do fosfato de cálcio, modificações da caseína, reação de escurecimento (Maillard) e interação de grupos sulfidril, incluindo proteínas do soro ou ureia.

Negri *et al.* (2001) encontraram correlações entre a 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.

2.2.2 Efeitos do aquecimento

Nos estudos de Fox e Morrissey (1977) vemos que o aquecimento tem uma influência sobre os constituintes do leite causando alterações significativas tanto nas proteínas, como sobre o equilíbrio salino. Entre os efeitos causados nas proteínas os autores citam a desnaturação das proteínas solúveis e as associações entre proteínas, formando o complexo β -lactoglobulina/ κ -caseína. E, entre os efeitos sobre o equilíbrio salino, os autores citam a precipitação de fosfato de cálcio com associação à fase micelar e a diminuição dos teores de cálcio e fósforo inorgânicos solúveis. O equilíbrio salino perdido com o aquecimento é parcialmente recuperado graças à solubilização de parte do fosfato de cálcio coloidal original.

As soro-proteínas são solúveis, de estrutura terciária, globular, termo lábeis acima de 65°C e não são fosforiladas. Isso explica a baixa estabilidade térmica. A desnaturação térmica diminui a solubilidade das soro-proteínas. Acima de 80°C e até 90°C ocorre a desnaturação da β -lactoglobulina e formação do complexo com a sub-fração κ -caseína (CHELINI; COSTA, 2002).

2.2.3 Outros fatores que afetam a ETL

Rose (1962) descreve que animais com estágios avançados de lactação tendem a apresentar leite instável.

Segundo Silva e Almeida (1998), outras variáveis relacionadas ao manejo atuam sobre a fonte do leite, modificando de tal maneira seus constituintes que promovem desequilíbrios prejudicando a ETL. São citados: período de lactação, alimentação deficiente e saúde animal (mamites).

Lactação – Durante a lactação, os teores de lactose e potássio tendem a decrescer continuamente, tendo seu pico no início e seu mais baixo teor no final. Cloretos e Sódio se comportam inversamente partindo de níveis baixos e sofrendo aumento durante toda a lactação, tendo seus maiores teores no final da lactação. Os autores citam ainda que, tanto no início quanto no final de lactação observa-se

aumento na concentração de proteínas no leite, acarretando numa maior formação de complexo β -Lactoglobulina/ κ -caseína e que as concentrações de cálcio e fósforo seguem o mesmo perfil de distribuição durante a lactação. Nas fases iniciais e finais de lactação, há um aumento do nível de cálcio iônico, o que interfere de forma decisiva na estabilidade do leite (BARROS, 2002).

Alimentação – Quanto a variações na oferta de alimentos, a dieta pobre em forrageiras pode diminuir o teor de citrato que é formado no ciclo de Krebs a nível mitocondrial. Isto ocasiona um desequilíbrio salino, diminuindo a ETL (SILVA; ALMEIDA, 1998).

Saúde animal – Os processos de mastites determinam uma alteração das características naturais do leite, reduzindo componentes como lactose, caseína e gordura e aumentando substâncias indesejadas como sais e enzimas proteolíticas (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Molina *et al.* (2001) associaram leites com alta contagem de células somáticas com redução da ETL.

Quadros de mastite levam a um aumento da passagem de cloreto de sódio direto do sangue para o leite gerando um desequilíbrio salino que vai interferir na estabilidade do leite (TOZZETTI, 2008).

Bueno *et al.* (2008), ao analisarem leite originado de vacas com mamite apresentando alta contagem bacteriana (CBT), determinaram um aumento de concentrações de proteínas e redução dos níveis de lactose.

O aumento da CBT está relacionado com o aumento de enzimas proteolíticas produzidas pelas bactérias (SILVA, 2004).

Quanto às variações no quadro da saúde animal, em leites provenientes de animais com mamite, ocorre aumento da rota para-celular com secreção de constituintes do sangue diretamente no leite. Como consequência, tem-se o aumento de frações do soro do sangue e desequilíbrio salino. Ocorre elevação no pH e diminuição da estabilidade das proteínas nativas do leite. Tais fatores contribuem para a redução da ETL (SILVA; ALMEIDA, 1998).

2.3 Teste do álcool

O teste do álcool é amplamente usado no Brasil para previsão da ETL e seleção de diferentes lotes de leite nas indústrias. É um teste simples, rápido e de baixo custo.

Segundo Horne e Parker (1981a), pode-se definir a estabilidade do leite ao álcool pela mínima concentração de solução de álcool capaz de causar coagulação do leite quando adicionada em volume igual ao da amostra. A agregação das micelas ocorre na presença de etanol por causa da redução na constante dielétrica da solução que gera o colapso da κ -caseína e reduz a repulsão estérica.

Silva (2004) relata que o mecanismo de desestabilização das caseínas por ação do etanol está vinculado ao efeito desnaturante do álcool, o qual promove redução na constante dielétrica da mistura, tornando-a um solvente desfavorável, podendo chegar a um limite crítico em que ocorra a precipitação.

2.3.1 Fatores que afetam a estabilidade do leite ao álcool

Segundo Horne e Parker (1981b), a instabilidade das micelas de caseína se deve em grande parte pela quantidade de cálcio ligado à proteína. Na faixa de pH normal do leite (entre 6,4 e 6,8) as micelas de caseína são carregadas negativamente formando o que pode-se chamar de barreira energética. A variação dos níveis de cálcio iônico influenciam diretamente na força desta barreira. O aumento da disponibilidade de cálcio no sistema aumenta o cálcio ligado, diminuindo a carga negativa líquida da micela e diminuindo a barreira energética à coagulação. Já a redução do nível de cálcio aumenta a carga negativa das micelas fortalecendo a barreira energética e dificultando a precipitação.

Horne e Parker (1981b) afirmam que o etanol tem a propriedade de alterar a força da barreira energética, variando a força elétrica do meio onde as micelas se encontram. Em situações de baixo pH a barreira energética fica prejudicada e aumenta a facilidade de coagulação com baixas quantidades de etanol. Em

ambientes de elevação do pH temos uma redução gradativa do cálcio solúvel por sequestro pelos íons fosfatos. Com esta redução dos íons de cálcio, a carga negativa da barreira energética volta a aumentar exigindo maior percentagem de etanol para que ocorra a precipitação.

2.3.2 Cálcio iônico

O leite está entre os alimentos mais ricos em cálcio. O cálcio no leite está distribuído em três fases: coloidal, solúvel e iônica. Segundo Lin, Lewis e Grandinson (2003), o equilíbrio entre as três fases do cálcio é muito importante para a estabilidade do leite. Aproximadamente 70% do cálcio está na fase coloidal e se encontra na forma de fosfato de cálcio ligado as micelas de caseína. Os 30% restantes estão em solução, distribuídos entre ligações com citratos e fosfatos ou na forma de íons livres.

Ainda segundo Lin, Lewis e Grandinson (2003), variações de pH influenciam diretamente no deslocamento do cálcio de uma fase para outra. A diminuição do pH provoca deslocamento do cálcio da fase coloidal para a fase solúvel, aumentando o cálcio iônico.

Trabalhos de Barros *et al.* (1999) afirmam que a migração do cálcio coloidal para a fase aquosa e o conseqüente aumento do cálcio iônico no leite estão relacionados com a diminuição da estabilidade da fração proteica do leite.

Horne e Parker (1981a) consideram que o cálcio solúvel é o mais importante fator que, isoladamente, influencia a estabilidade ao etanol diante da variação do pH.

2.3.3 Sais estabilizadores

A portaria Nº 370, de 4 de setembro de 1997 (Brasil, 1997) em anexo ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT), regulamenta o uso dos sais estabilizantes, citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), monofosfato de sódio

(NaH_2PO_4), difosfato de sódio (Na_2HPO_4), trifosfato de sódio (Na_3PO_4), separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1g/100mL expressos em P_2O_5 .

Como íons cálcio elevado é a maior causa de instabilidade, quanto maior a relação Ca/P, menor será a estabilidade ao etanol (SILVA et al., 2004).

A ação de sais estabilizadores, como fosfatos e citratos, influenciam a estabilidade ao teste do álcool. A adição de citrato muda de forma mais sensível o perfil da curva de estabilidade, pois o citrato é um sequestrador de cálcio mais potente que o fosfato, tornando o leite um pouco mais estável (HORNE; PARKER, 1981a).

Em Fox (1991) temos que o citrato do leite, que é sintetizado nas células epiteliais do alvéolo mamário, se apresenta distribuído em aproximadamente 94% na fase solúvel, dos quais mais ou menos 85% estão ligados ao cálcio e ao magnésio e, 6% se encontram na fase coloidal ligado às subunidades das micelas de caseína. E que o citrato tem a característica de sequestrar o cálcio livre determinando alterações na estabilidade do leite.

Segundo Silva (2004), os níveis de citrato do leite apresentam correlação direta com a alimentação dos animais, sendo que os volumosos são as principais fontes desse componente, onde dietas pobres em volumosos determinam baixas produções de citrato.

A adição de fosfatos promove uma redução do cálcio iônico no leite, resultando num aumento da estabilidade (Horne e Muir, 1990). Os fosfatos têm a função de manter a estrutura micelar e, seu posicionamento nas distintas fases do leite, está relacionado ao pH. Em ambientes mais ácidos, o fosfato coloidal se solubiliza, o que provoca desestabilização do leite (Rose, 1962).

McMahon (2010) divide os fosfatos em dois grupos na micela de caseína, o fosfato orgânico, covalentemente ligado à caseína como parte das cadeias laterais dos resíduos de fosfoserina, e o fosfato inorgânico, presente como cristais de fosfato de cálcio que são deslocados da micela por acidificação e cuja interação tem caráter mais iônico que covalente.

2.3.4 Ação da temperatura

A pasteurização do leite aumenta a estabilidade ao etanol. A estabilidade é alterada principalmente na faixa de pH entre 6,4 e 6,8, o que se justifica possivelmente pela alteração no balanço iônico do sistema devido a redução do cálcio solúvel pela precipitação do fosfato de cálcio induzida pela temperatura (HORNE; PARKER, 1981c).

No leite mantido sob refrigeração, a β -caseína deixa as micelas e se dispersa. Enquanto a 20°C a caseína micelar representa de 93% a 95% da caseína total, a 2°C esse percentual cai para 80% a 85%. Isso ocorre por que, no leite resfriado, tem-se uma movimentação das β -caseínas em direção à fase solúvel e uma diminuição no diâmetro médio das micelas. O grau de hidratação das micelas aumenta consideravelmente no leite refrigerado. A quantidade de água retida após 48h de conservação entre 3°C a 4°C é de 30% a 40% superior aos valores iniciais registrados a 20°C (MATHIEV, 1985 apud SILVA; ABREU, 2003).

Os minerais tendem a uma maior solubilização no leite resfriado. Na condição de resfriamento temos uma migração de minerais do sistema micelar para a solução do leite. A solubilização do fosfato de cálcio com o frio provoca elevação no pH do leite (MATHIEV, 1985 apud SILVA; ABREU, 2003).

O resfriamento do leite provoca solubilização e dissociação da fração β -caseína e incrementa a solubilização do fosfato de cálcio coloidal, alterando a estrutura das micelas e o pH do leite (FOX, 1997). A dissolução de parte do fosfato coloidal pelo frio contribui para a desintegração das micelas de caseína, reduzindo a atração entre as frações no interior da micela e debilitando a união das moléculas individuais de caseína (GAUCHERON, 2005).

A diferença de migração da β -caseína da forma micelar agregada para a forma molecular dispersa na fase solúvel do leite, de acordo com a variação da temperatura contribui para que as micelas diminuam de tamanho liberando água e íons cálcio para a fase aquosa do leite (DICKINSON *et al.*, 2001). Esse fato pode causar alteração nas cargas micelares totais, o que ocasionaria maior capacidade de agregação entre as micelas e dessa forma, influenciaria o ponto de coagulação do leite frente ao etanol (PEREIRA, 2013).

O comportamento das frações que compõem a micela de caseína frente a diferentes fatores externos foi esquematizado na Figura 1.

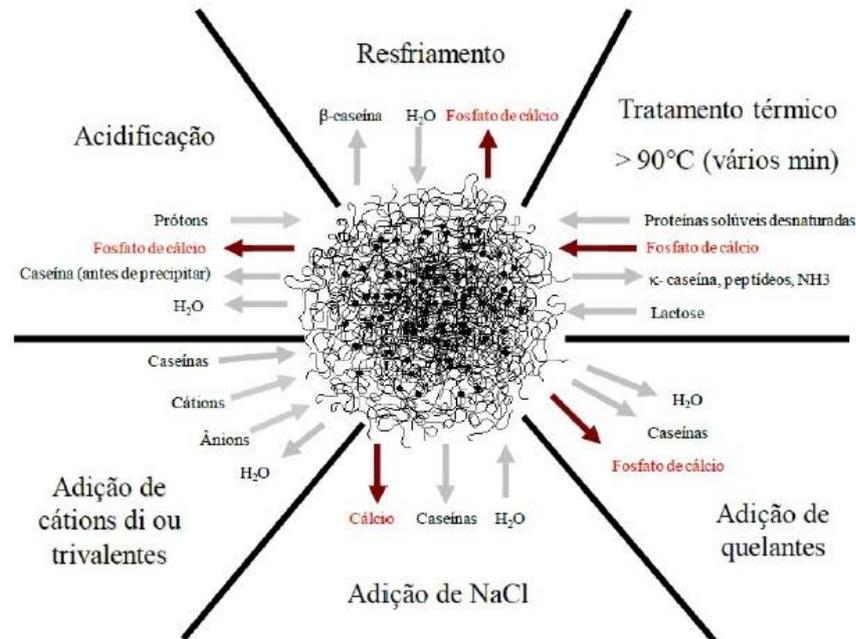


Figura 1: Modificações das micelas de caseína em diferentes condições. O relevante equilíbrio de cálcio e fosfato de cálcio é destacado.

Fonte: GAUCHERON, 2005, traduzida por SILVA, 2010. In: PEREIRA, D. B. C., Efeito de dietas restritivas para bovinos sobre a composição e propriedades de processabilidade do leite. **Tese de Doutorado**, UFV. Viçosa: 2013.

2.3.5 Leite instável não ácido (LINA)

LINA é o leite com pH normal que coagula no teste do álcool. Apesar da associação mais comum da instabilidade do leite ao teste do álcool ser com a acidez de produção microbiana, Donatele, Vieira e Folly (2003), na busca de estudar o fenômeno de LINA pesquisaram um lote de 287 amostras de leite positivas ao teste do álcool 72% (v/v) e constataram que 69,34% das amostras não apresentavam nenhum tipo de crescimento microbiano concluindo que, nestes casos, não houve envolvimento de bactérias na causa da instabilidade do leite ao álcool.

Da mesma forma, Donatele, Vieira e Folly (2003) sugerem não haver relação direta entre a positividade do leite ao teste do alizarol 72%(v/v) e o número de células somáticas. Os autores encontraram que 61,67% das amostras positivas ao

alizarol apresentaram baixas contagens de células somáticas – inferior a 300 mil células/mL de leite – sugerindo que fatores ligados a própria composição do leite seriam os responsáveis pela instabilidade do leite ao teste do álcool.

2.3.6 Estabilidade coloidal do leite

Kruif *et al*, (2012) citam que o modelo de Holt, para explicar a estrutura micelar das caseínas, muda a concepção da maneira como ocorrem as ligações internas entre as caseínas a partir de *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal na construção das micelas de caseínas. Na conclusão deste modelo os autores afirmam que múltiplas interações fracas são responsáveis por uma associação cooperativa e que esta cooperação de interações é que torna a micela estável e, portanto, que o modelo de repulsão estérica para a estabilidade das micelas não sofreu mudança, pois, invariavelmente a κ -caseína se encontrou nas extremidades da cadeia associativa, garantindo a conformação de filamentos, responsável pela estabilidade das micelas de caseína.

Desta forma, se mantém a explicação de Horne e Parker (1981a) para definir a estabilidade do leite ao álcool como a agregação das micelas na presença de etanol por causa da redução na constante dielétrica da solução gerando o colapso da κ -caseína e reduzindo a repulsão estérica que continua representando bem o fenômeno.

2.3.7 Relação entre a ETL e a estabilidade do leite ao álcool

Comparando o método de medição de ETL com o método de estabilidade ao etanol Horne e Muir (1990) concluíram que existem similaridades entre os dois métodos. Os testes apresentaram resposta similar ao ajuste de pH e respondem, pelo menos qualitativamente, da mesma maneira ao aumento ou diminuição do cálcio disponível.

Negri *et al.* (2001) avaliaram que amostras de leite estáveis ao álcool 78% submetidas ao teste estabilidade térmica apresentaram tempo de coagulação superior ao das amostras de leite instáveis ao álcool 72%. No que diz respeito ao pH, avaliaram que tanto o leite estável quanto o leite instável ao álcool aumentaram a sua estabilidade ao álcool conforme aumentou o pH.

O ajuste artificial do pH do leite permitiu montar uma curva com um perfil de estabilidade ao etanol pelo pH, que apresenta perfil semelhante à curva de tempo de coagulação (teste de estabilidade térmica) pelo pH, como apresentado na Figura 2.

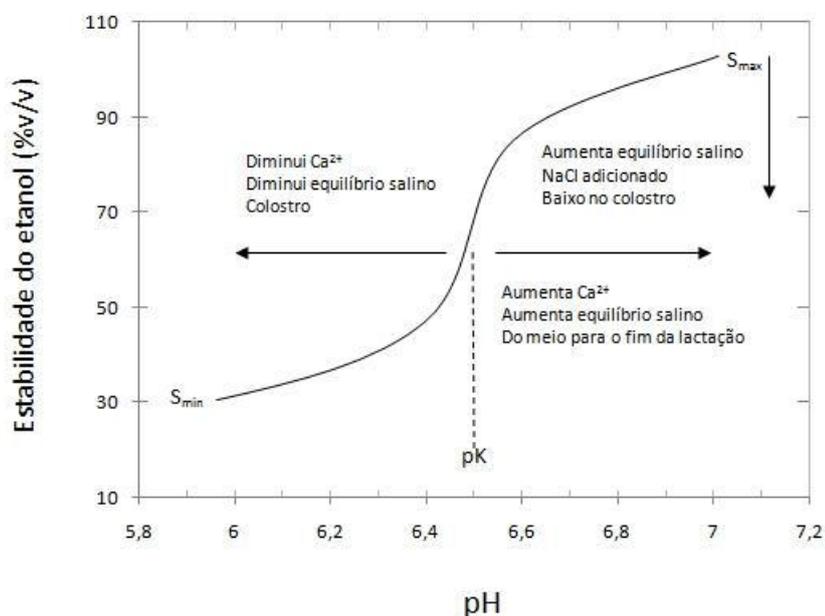


Figura 2: Curva da estabilidade do leite ao etanol pelo pH, referenciando correlação com a variação do equilíbrio salino.

Fonte: In: FOX; MCSWEENEY. *Advanced dairy chemistry*. Vol.1 part B. 3ed. KA/PP: London. pp. 1346

Silva e Almeida (2004) citam como as principais variáveis que influenciam na estabilidade térmica do leite o pH, o equilíbrio salino, o teor natural de ureia, a estabilidade das micelas de caseína, o período de lactação, a alimentação deficiente do gado e a saúde animal (mamite). Esses autores estimam que a avaliação da estabilidade térmica por meio do teste do álcool seja um procedimento útil para verificar a aptidão do leite para o processamento.

2.4 Difração a laser

A técnica de análise de tamanho de partículas por difração de laser é muito usada em diversos ramos industriais devido à sua facilidade de operação, rapidez e amplitude de leitura.

A difração a laser baseia-se no princípio (difração da luz) de que, quanto menor o tamanho da partícula, maior o ângulo de difração de um feixe luminoso que atravessa uma população de partículas. Essa técnica não mede partículas individuais. Através de ferramentas matemáticas (transformada de Fourier inversa), calcula-se uma estatística de distribuição de tamanho dessa população de partículas. O tamanho das partículas é indicado como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente (MALVERN INSTRUMENTS, 2016).

Allen (1993) explicou que, por este método, as partículas são dispersas num fluido em movimento causando descontinuidades no fluxo deste fluido, que são detectadas por uma luz incidente e correlacionadas com o tamanho de partícula. Ao atingir uma quantidade de partículas, a luz incidente sofre uma interação segundo quatro diferentes fenômenos (difração, refração, reflexão e absorção) formando um invólucro tridimensional de luz. O formato e o tamanho deste invólucro são afetados pelo índice de refração relativo da partícula no meio dispersante, pelo comprimento de onda da luz e pelo tamanho e formato da partícula. Detectores estrategicamente posicionados medem a intensidade e o ângulo da luz espalhada. O sinal dos detectores é então convertido para a distribuição de tamanho de partícula através de algoritmos matemáticos, com base na teoria de difusão da luz de Mie.

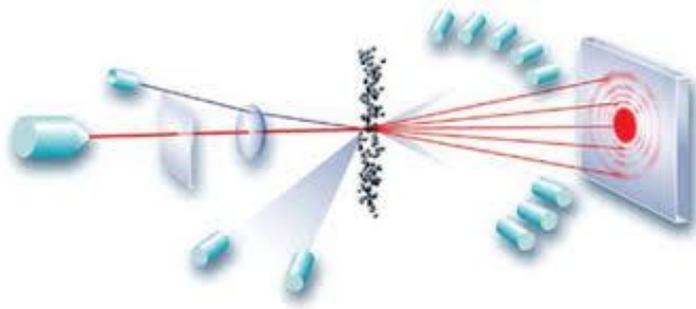


Figura 3: Esquema de espalhamento e captura da luz nas análises de partículas.
Fonte: MALVERN INSTRUMENTS (2016).

3 LIMITAÇÃO DO TESTE DO ÁLCOOL - JUSTIFICATIVA

O Quadro 1 relaciona uma série de fatores que permitem sugerir que existem motivos suficientes para a separação do teste do álcool em dois tipos, caracterizados por duas finalidades bem diferentes.

Quadro 1: Diferenças de foco entre duas aplicações do teste do álcool.

Fatores Considerados	Teste do álcool para Detecção de leite ácido	Teste do álcool para Avaliação da ETL
Momento da Análise	- No Campo – coleta no produtor; - Plataformas – recepção;	- Na Indústria - Após pasteurização; - Liberação UHT;
Matéria prima	- Leite cru; - Sem adição de sais;	- Leite pasteurizado; - Com adição de sais;
Força do álcool	- 72%(v/v);	- 80%(v/v) a 85%(v/v);
Nº Produtores por análise	- Unitário, pequenos grupos (tanques comunitários) e linhas de leite (generalizadas);	- Nunca unitário, sempre em lotes e grandes conjuntos (frequentemente > 100.000 litros);
Objetivos	- Aceitação ou não do leite cru, Segundo IN 62/2011;	- Liberação ou não do leite pré-processado e estabilizado, para o processamento UHT;
Aplicação	- Separação de leites com maior estabilidade ao álcool para diferentes destinações no processo produtivo. (ex: queijos, fermentados, UHT...);	- Sinalização da capacidade de determinado lote de leite em suportar o tratamento térmico UHT; - Auxílio na calibração dos ajustes salinos;
Benefícios	- Permite interagir com o campo informando com agilidade a existência de fragilidades na cadeia produtiva; - É um argumento usado para pagamento por qualidade.	- Permite melhorar o tempo de máquina em regime de processamento UHT; - Diminui turnos de CIP; - Reduz descaracterização durante <i>shelf life</i> (sedimentação); - Reduz pressão sobre o SAC.
Pontos fortes	Simples, rápido e baixo custo	Simples, rápido e baixo custo
Pontos fracos	Confusão para casos de fragilidades ligadas à síntese do leite (ex: LINA).	Leitura mais difícil quando o leite está adicionado de sais corretores, gerando maior grau de subjetividade na leitura.

Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

A evolução das práticas de ordenha, o armazenamento sob refrigeração e o transporte granelizado, ao reduzir a CBT, diminuíram a importância do teste do álcool de plataforma. A discussão sobre a ocorrência de fragilidades em certas amostras de leite ao teste do álcool, oriundas de anomalias fisiológicas ao nível da síntese do leite que, acabam gerando leite instável não ácido (LINA) é válida. Esta abordagem merece a atenção dos estudiosos quanto à adequabilidade da legislação atual sobre o uso do teste do álcool como método de controle de coleta e recepção do leite. No entanto, ela não se enquadra no estudo em questão.

Baseados na premissa de que existe uma correlação entre a ETL e a estabilidade ao álcool (Horne e Muir, 1990), o teste do álcool (80%v/v) passou a ser utilizado nas indústrias como método auxiliar na previsão da ETL dos lotes de leite destinados ao tratamento UHT.

O teste do álcool, por ser um método simples, rápido e de baixo custo acaba sendo a base, a partir da qual tomam-se decisões de alto impacto econômico para as empresas de leite UHT.

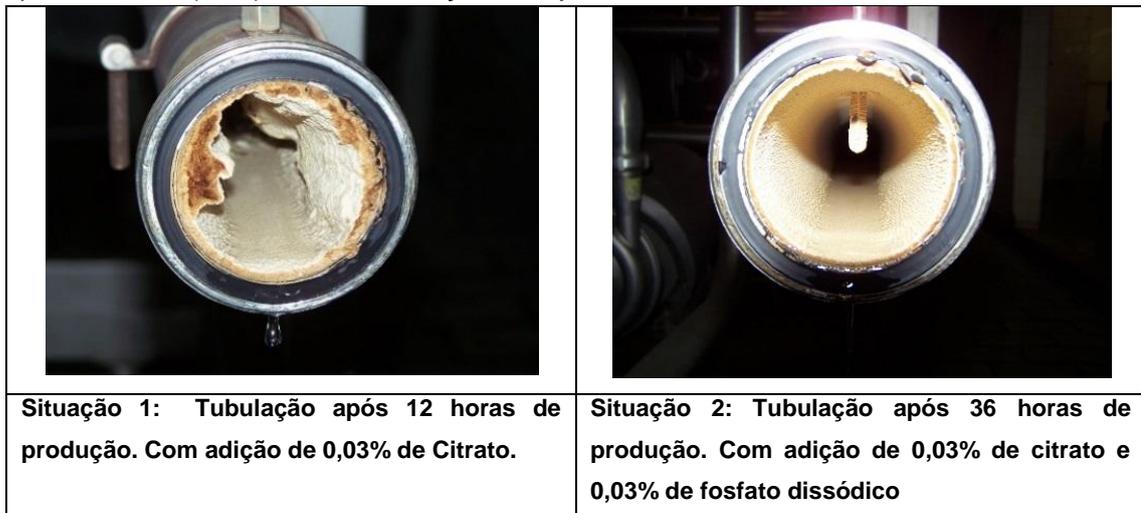


Figura 4: Precipitado com gelificação, 30 dias após envase.

Fonte: Foto do autor

Em nível industrial, o grau de ETL determina a intensidade da desnaturação e associação de proteínas com a formação de precipitados e/ou gelificação, gerando perda de qualidade no produto final. Assim como o tempo de operação continuada que um ultrapasteurizador (UHT) leva para incrustar a linha.

Quadro 2: Imagens de incrustações em tubulações abertas após um ciclo produtivo do ultrapasteurizador (UHT), em duas situações de ajuste salino.



Fonte: Foto do autor

Considerando-se a magnitude dos volumes de leite e dos valores envolvidos no processamento UHT, podemos avaliar quais são as consequências de uma má avaliação da ETL.

Na indústria, a correta utilização dos sais estabilizadores promove reais economias de tempo, de energia, de mão de obra e de consumo de produtos químicos, com ganhos expressivos de produtividade (maior volume processado num mesmo tempo), além de promover alívio nas estações de tratamento pela redução do número de ciclos de limpeza CIP e consequente redução na geração de resíduos orgânicos e químicos. Vale ainda citar ganhos na melhor ocupação da mão de obra, o que não ocorre quando temos múltiplas paradas de CIP de aproximadamente 5 horas de duração cada.

De fato, na prática, observa-se que o teste do álcool, devido à sua rusticidade, tem uma componente de subjetividade na avaliação ótica direta que dificulta a padronização da decisão.



Figura 5: Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) ao teste do álcool

Fonte: (FISCHER, V. et al. 2012)

Considerando-se a acurácia dos novos equipamentos de laboratório e da sensibilidade dos controles internos dos próprios equipamentos e processos UHT, pode-se observar que os mesmos têm alto grau de precisão que não condizem com o grau de empirismo da avaliação visual do teste do álcool.

Este trabalho buscou encontrar um método que aumentasse a magnitude da visualização das estruturas geradas no teste do álcool aplicado ao processamento de leite UHT, diminuindo a subjetividade das avaliações, aumentando a acurácia e contribuindo para uma tomada de decisão mais precisa.

4 OBJETIVOS

As indústrias de leite que se dedicam à produção de leite UHT se deparam com o problema de falta de uniformidade dos lotes de leite quanto à resistência ao tratamento térmico a ser aplicado. O binômio tempo/temperatura utilizado no tratamento UHT, entre 130°C e 150°C por 2 segundos a 4 segundos (BRASIL, 1997), é rigoroso e requer atenção ao equilíbrio entre os componentes do leite para evitar a desestabilização por aquecimento gerando entupimento dos equipamentos, perdas de eficiência e alterações físicas durante o tempo de validade.

Apesar de sua pouca acurácia, o teste do álcool tem sido usado como indicador de estabilidade térmica para liberação de lotes de leite destinados ao processamento UHT. Além da subjetividade na leitura dos resultados, a rusticidade deste teste destoa da importância que ele assume ao ser usado como fator de decisão para a liberação de grandes lotes de leite.

Este trabalho buscou encontrar um método que aumentasse a magnitude da visualização das estruturas geradas no teste do álcool, diminuindo a subjetividade das avaliações, aumentando a acurácia e contribuindo para uma tomada de decisão mais assertiva.

4.1 Objetivo geral

Aperfeiçoar a visualização das partículas geradas no leite pasteurizado, quando submetido ao teste do álcool, sob a ação de três tipos de sais estabilizadores, avaliado por três diferentes métodos de visualização, comparando com a forma como este teste é visualizado hoje nos laboratórios das indústrias de leite UHT.

4.2 Objetivos específicos

- Aprimorar a capacidade de visualização das micropartículas e da interpretação do teste do álcool em amostras de leite pasteurizado destinado ao tratamento UHT;
- Avaliar e comparar a influência dos sais estabilizadores sobre a formação de micropartículas em leite pasteurizado submetido ao teste do etanol;
- Incrementar a visualização e interpretação dos resultados do teste do álcool sobre as amostras de leite pasteurizado, por meio de três diferentes métodos: observação ótica direta, observação microscópica ótica digital e medidor de partículas por Difração a Laser (LS);
- Inferir sobre a capacidade de uso do teste do álcool como metodologia para decisão de ajustes finos na escolha e dosimetria de sais estabilizadores nos laticínios;
- Inferir sobre a capacidade de uso do teste do álcool como metodologia para apoio nos desenvolvimentos de novas combinações de sais estabilizadores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Como proposta inicial de trabalho procurou-se uma solução metodológica para aumentar a acuidade da visualização das microestruturas do leite, geradas pelo teste do álcool e comparar com a forma como este teste é visualizado hoje nos laboratórios das indústrias de leite UHT.

5.1 Delineamento do experimento – Teste do álcool

A partir de uma amostra de leite pasteurizado integral, 3% gordura (m/v) foram preparados quatro tratamentos com quatro variações no ambiente salino: leite pasteurizado sem adição de sais como controle; leite pasteurizado com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v); leite pasteurizado com adição de fosfato dissódico 0,05%(m/v); e leite pasteurizado com adição de uma mistura comercial de sais de citrato e fosfatos (LAC 8074-7) a 0,05%(m/v).

Cada tratamento foi submetido ao teste do álcool. Foram usadas concentrações de etanol de 72%(v/v) a 96%(v/v), em intervalos de duas unidades percentuais.

Para a avaliação das micropartículas resultantes do teste do álcool, foram usados três diferentes métodos de observação: visualização ótica direta em placa de Petri, visualização por microscopia ótica digital ampliada em 200x (*ProScope*) e medição por refração a laser em analisador de partículas LS 13.320.

Na Figura 6, o esquema do delineamento proposto para o trabalho.

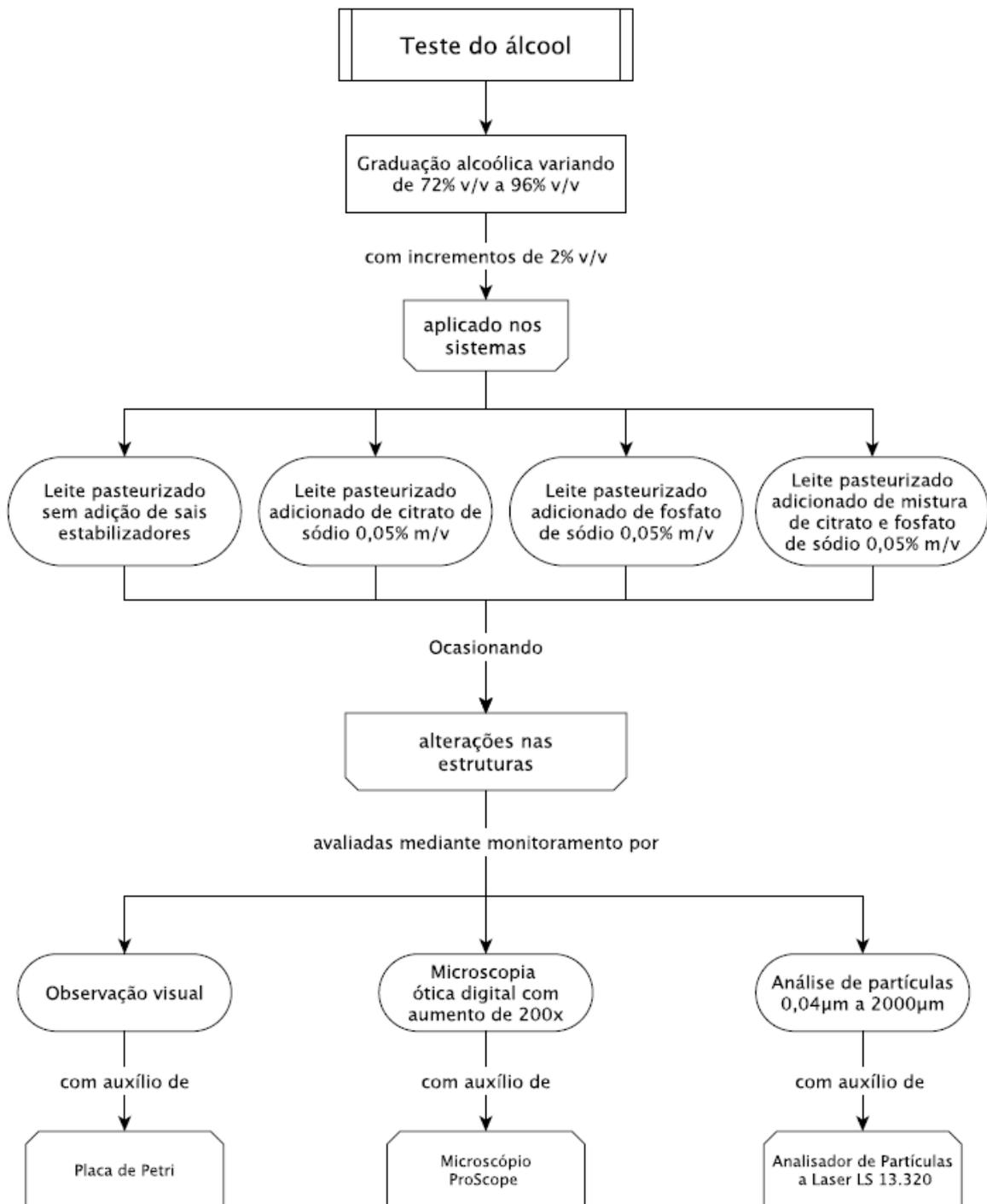


Figura 6: Delineamento da avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool, visando processamento UHT.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cada amostra submetida a uma determinada graduação alcoólica, logo após a observação ótica direta, uma fração da solução resultante foi imediatamente transferida para o *ProScope* e outra para o LS. Procurou-se através deste

procedimento linearizado minimizar a ação do tempo sobre as amostras e garantir que o objeto de avaliação fosse sempre o mesmo para as três metodologias.

5.2 Leite pasteurizado padronizado

Para o experimento utilizou-se leite pasteurizado integral padronizado a 3% (m/v) de gordura, sendo leite de conjunto, de uma empresa de Juiz de Fora/MG.

As análises de composição do leite foram realizadas no Laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF, a saber: 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).

5.3 Pesagem e mistura dos sais estabilizadores

Tendo em vista a importância da relação entre a ETL e a estabilidade do leite ao álcool elegeram-se três diferentes sais para, adicionados ao leite pasteurizado, promover diferentes condições de estabilidade simulando o que ocorre nas indústrias de leite UHT. Os sais foram o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e uma combinação comercial de sais “LAC 8074-7” (fosfato trissódico (Na_3PO_4), fosfato dissódico e citrato de sódio), todos fornecidos pela Globalfood Sistemas de Ingredientes.

Foram preparados quatro tratamentos; o primeiro sem adição de sais como controle e três tratamentos com adições de citrato de sódio 0,05% (m/v), de fosfato dissódico 0,05% (m/v) e do “LAC 8074-7” 0,05% (m/v), na razão de 0,125g de cada sal em cada pote de 250mL de leite.

As pesagens dos sais foram feitas em balança analítica de precisão SHIMADZU AY220 (capacidade de 0,01g a 220g) do Laboratório de Composição e

Valor Nutricional dos Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF. Os sais foram adicionados em potes de vidro de 250mL de boca larga e tampa de metal com selo. A mistura ao leite foi feita a 5°C. Os potes foram agitados de maneira intermitente durante uma hora e depois foram agitados a cada nova intervenção.

5.4 Preparação das soluções alcoólicas

As soluções alcoólicas foram preparadas no Laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF, em concentrações de álcool de 72%(v/v) a 96%(v/v) em intervalos de duas unidades percentuais. As concentrações foram inicialmente ajustadas com alcoômetro de Gay-Lussac. Posteriormente, as graduações alcoólicas foram conferidas e reajustadas com auxílio de um densímetro digital “DENSITO 30P” da METTLER TOLEDO e, para o pH 6,8 a 7,0 com auxílio de potenciômetro Gehaka, modelo PG 1800.

5.5 Teste do álcool

Este teste foi conduzido no Laboratório Microestrutural e Microanálise (Micro) do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (NEEM/UFJF).

O teste do álcool foi realizado, nos quatro tratamentos, em placa de Petri para reprodução do que se faz nos laticínios. Misturou-se 2mL de álcool sobre 2mL de leite (6°C) para cada ensaio de variação alcoólica e foi observada visualmente a reação de desestabilização ao álcool. Foi criada uma planilha para registro do ponto de coagulação. Foi realizado registro fotográfico em fundo preto para cada ensaio.

Usou-se micropipetadores INTECH (Volumes de 200µL a 1000µL) e micropipetas de 1mL exclusivas para evitar contaminações cruzadas. As amostras foram mantidas em geladeira de 3°C a 6°C e os testes de álcool foram realizados

com as amostras de leite a 6°C. A temperatura do Laboratório ficou estável a 19°C durante todo o tempo decorrido para as análises.

Trabalhou-se com concentrações crescentes de álcool até a observação de desestabilização visível. Foi considerado como resultado do teste 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.

5.6 Microscopia ótica digital

Os trabalhos de visualização, com auxílio de microscopia ótica digital, das micropartículas formadas no leite pasteurizado, quando submetido aos diferentes níveis do teste do álcool e para cada tratamento, foram realizados no Laboratório Microestrutural e Microanálise (Micro) do Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (NEEM/UFJF).

Utilizou-se para esta finalidade o microscópio ótico digital “*ProScope HR*” (*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.

Graças a uma base de fixação que faz parte do kit, o *ProScope* pode ficar na bancada fixado com a objetiva virada tanto para baixo quanto para cima, de maneira a facilitar a leitura. A lâmina com a amostra é que se move sobre a objetiva não exigindo do analista perícia específica para com os ajustes óticos do equipamento a cada nova amostra.

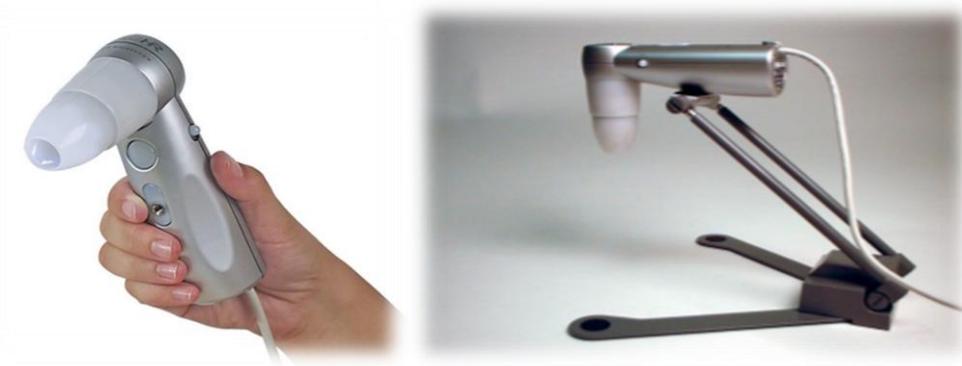


Figura 7: *ProScope* uso manual e uso fixado na base
Fonte: MANUAIS DO PROSCOPE HR (2016).

A cada corrida do teste de álcool, uma parcela de 10 μ L da mistura leite/álcool foi transferida com micropipetador KASVI basic (Volumes de 10 μ L a 100 μ 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 200 x.

A leitura do *ProScope* foi obtida diretamente na tela de um computador, mediante uso de *software* de transferência de imagem “*ProScope HR 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.

5.7 Medição de partículas por difração a laser (LS)

Os trabalhos de análise das micropartículas formadas no leite pasteurizado, quando submetido aos diferentes níveis do teste do álcool para cada tratamento foram realizados no Laboratório Microestrutural e Microanálise (Micro) do Núcleo de

Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora (NEEM/UFJF). As distribuições dos tamanhos das partículas das amostras de leite pasteurizado com e sem adição de sais foram obtidas através do analisador de partículas por difração a laser Beckman Coulter LS 13 320 (BECKMAN COULTER, Miami, FL, EUA, 2011), conforme a Figura 8, acoplado ao módulo de análise líquida (*Aqueous liquid module, Beckman Coulter, Miami, FL, EUA*).

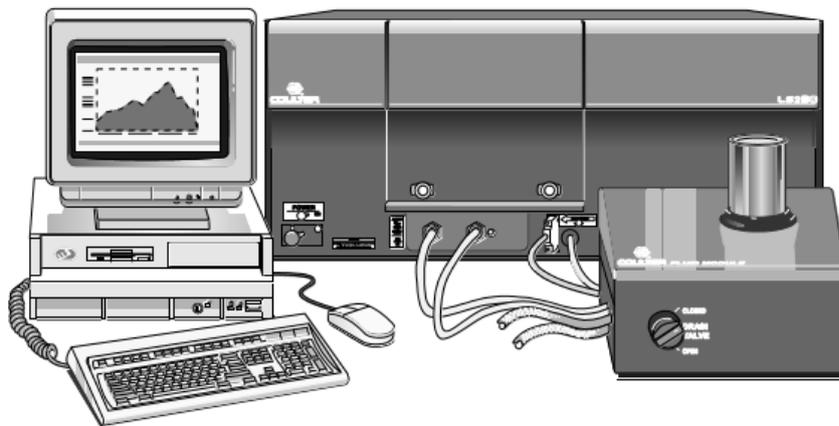


Figura 8: Equipamento LS 13 320.

Fonte: Manual Beckman Coulter (2016, p.Capa).

A cada diluição do teste do álcool, uma fração de aproximadamente 1,5g da solução, resultante da mistura de leite e álcool, foi imediatamente levada ao LS para o procedimento de contagem a laser das partículas.

O equipamento LS tem *software* interno de leitura, processamento e armazenamento de dados próprio (Software Version 2.01, Miami, FL, EUA). A dosagem da amostra se dá por adição lenta por gotejamento da amostra no misturador de entrada com água circulante. A quantidade de amostra suficiente é medida pelo grau de obscurecência da água circulante. A obscurecência de operação é sinalizada pelo equipamento, como 50% + ou - 5% de PIDS (*Polarization Intensity Differential Scattering System*). O sistema é dotado de 5 PIDS fotodetectores.

Após a contagem, o LS forneceu os resultados na forma de relatórios e curvas levando em consideração diferentes grandezas como: número de partículas, área superficial total das partículas ou volume ocupado pelas partículas.

Os dados foram coletados na região de 0,04 μ m a 2000 μ m com tempo de coleta estabelecido em 90 segundos. Os resultados foram obtidos utilizando o índice

refração de 1,332 para o meio dispersante (água) e 1,57 para as partículas de micelas de caseína. De acordo com Mimouni *et al.* (2009) foram representados pelo volume (%) ocupado pelas partículas em função do seu tamanho. As condições acima fixadas foram utilizadas para as análises de todas as amostras provenientes do teste do álcool, em diferentes concentrações.

5.8 Análises estatísticas

Para fundamentar o estudo das partículas do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool, foram utilizadas duas metodologias qualitativas e uma quantitativa de visualização das micropartículas. Os sistemas qualitativos foram o ótico direto e a microscopia ótica digital. Já o sistema quantitativo – LS – permitiu a contagem de microestruturas a laser com a capacidade de detectar em uma escala nanométrica a quantificação e a distribuição das microestruturas.

A análise estatística dos efeitos do teste do álcool entre os métodos qualitativos de visualização ótico direto e o método de microscopia ótica digital foi realizada por meio do método de Correlações Paramétricas de Pearson. Para análise estatística paramétrica foi usado o programa do SAEG sistema para análises estatísticas, versão 9.1 (SAEG, 2007). O nível de significância estabelecido foi pelo menos de $p < 0,05$.

A análise estatística do contador de partículas LS 13 320 foi realizada por programa de *software LS Series*, versão 2.01, para *Windows Microsoft (BECKMAN COULTER, 2016)* que analisou os dados coletados durante 90 segundos de leitura a laser do fluxo de micropartículas de cada ensaio. Os resultados são apresentados em planilhas de dados, gráficos e resumos estatísticos expressos em: volume (%) por tamanho (μm), diâmetro (%) por tamanho (μm) e número de partículas por tamanho (μm).

Optou-se pelo volume (%) de partículas em cada faixa de tamanho nanométrico para avaliação do comportamento das micropartículas. Os dados relativos às curvas geradas pelo programa do LS foram avaliados por análise descritiva.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo trabalhou-se com o conceito de Teste de Álcool para Avaliação da ETL, usado como argumento de liberação industrial dos lotes de leite para o processamento UHT.

6.1 Ensaio preliminares

A pesquisa para a montagem do delineamento contou com uma fase preparatória, onde uma série de fatores foram testados até se chegar na configuração escolhida. Precisou-se definir qual tipo de leite seria o mais adequado e representativo para o objetivo do trabalho. Trabalhou-se com oito diferentes fontes de leite.

Iniciou-se uma busca por diferentes equipamentos óticos, desde lupas até a microscopia convencional. Tanto a aplicação do *ProScope* quanto a do LS na avaliação de microestruturas do teste do álcool são inéditas. Por isso, foi necessária a criação de protocolos de trabalho para ambos os métodos.

Testou-se diferentes objetivas no *ProScope*. A alta sensibilidade do LS chamou a atenção para a calibração das concentrações alcoólicas que tiveram que ser retrabalhadas com metodologia mais refinada. O tempo que leva para perfazer todo um ciclo de graduações alcoólicas levantou o problema do armazenamento e da temperatura das amostras. Decidiu-se registrar 10 a 12 fotos e 1 a 2 filmes para cada graduação alcoólica testada.

Notou-se que o teste do álcool tem um tempo curto de leitura. Ao se esperar demais, amostras que seriam consideradas boas acabaram apresentando estrias de desestabilização. Por isso, montou-se um procedimento ágil e linear para que as três 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 120 testes que geraram 120 curvas e 120 estatísticas no LS e 1700 capturas de imagens. Diante dos resultados

obtidos 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). Já o LS foi usado para quantificar os fenômenos visuais e fornecer uma interpretação matemática e menos subjetiva das ocorrências observadas pelos dois meios óticos.

Para estudar diferentes condições de estabilidade do leite ao álcool, elegeu-se trabalhar com quatro diferentes sistemas de estabilização salina.

Uma vez ajustados os protocolos, foram realizados mais 48 testes com geração de 48 curvas e 48 estatísticas no LS e 664 capturas de imagens no *ProScope*, os quais confirmaram os comportamentos observados anteriormente.

6.2 Análises do leite

A indústria de leite UHT tem como procedimento padrão a pasteurização do leite como prática obrigatória na preparação dos lotes que serão destinados ao tratamento UHT. O leite pasteurizado integral foi devidamente analisado conforme a Tabela 4, abaixo.

Tabela 4: Composição e propriedades físico-químicas do leite pasteurizado usado no experimento

Constituinte / Propriedade	Valor
Umidade (% m/m)	87,85
Gordura (% m/v)	3,20
Proteína (% m/v)	3,24
Resíduo mineral fixo (cinzas) (% m/m)	0,69
Lactose (por diferença) (% m/v)	5,02
Acidez (°D)	15,0
pH	6,76

Fonte: Elaborado pelo autor a partir de dados laboratoriais (2016).

6.3 Sais estabilizadores

Adição de sais sequestrantes de cálcio como citratos e fosfatos tem a função estabilizadora pela modificação das propriedades físicas do leite formando complexos estáveis por meio de ligações iônicas com metais ou metais alcalino terrosos (FOX; MCSWEENEY, 1998). Os sais estabilizadores, aumentando a estabilidade térmica, melhoram as condições de processabilidade do leite, minimizando a formação de sedimentos e gelificação em produtos UHT (WALSTRA *et al.*, 1999).

Conforme citado na literatura (Horne e Parker, 1981a), pode-se constatar que a adição de citrato e fosfato dissódico mudou o perfil da curva de estabilidade. A afinidade destes sais com o cálcio aumentou a estabilidade do leite ao teste do álcool, graças à redução do cálcio solúvel.

A escolha dos tipos de sais e seus níveis de aplicação empregados na montagem dos quatro tratamentos se mostrou acertada pois, como o objetivo principal era a comparação de diferentes métodos de visualização das estruturas formadas no teste do álcool, caso as diferenças entre os comportamentos salinos fossem muito pequenas e de difícil percepção, ter-se-ia mais uma variável a ser gerenciada.

A diferença de estabilidade ao teste do álcool observada nos quatro tratamentos foi grande, formando quatro ambientes salinos bem distintos, e isso facilitou a comparação entre os três métodos de visualização das estruturas formadas.

O tratamento “Pasteurizado sem adição de sais” tendo sido montado como Controle, serviu de base de comparação para avaliação dos incrementos na estabilização ao teste do álcool dos demais tratamentos.

Constatou-se uma sequência crescente de estabilidade na seguinte ordem: “adicionado de citrato de sódio 0,05%(v/v)” seguido do “adicionado de fosfato dissódico 0,05%(v/v)” e do tratamento “adicionado de Mix de estabilizantes LAC 8074-7 0,05%(v/v)”, que foi o que apresentou maior estabilidade ao teste do álcool.

Segundo Singh, (2004) o fosfato adicionado ao leite reduz o fosfato solúvel e altera o padrão de pH para valores alcalinos, aumentando o tempo de coagulação

térmica. Nos casos em que o pH estiver abaixo da faixa de estabilidade (6,7 a 6,9) o citrato de sódio ou fosfato dissódico são os mais indicados, com objetivo de aumentar a estabilidade ao tratamento UHT. O autor relata ainda que, o efeito do fosfato é menos duradouro do que o citrato por esse se manter por mais tempo na fase solúvel.

No presente trabalho constatou-se diferença na especificidade entre citrato e fosfato dissódico, contudo foi no Mix de sais estabilizantes que se observou o efeito sinérgico entre os sais, potencializando o efeito estabilizador frente ao teste do álcool. Embora a função sequestrante seja comum aos sais utilizados, a propriedade alcalinizadora dos fosfatos aumentando ligeiramente o pH (para 6,94) promoveu uma melhor condição de estabilidade às micelas de caseína.

6.4 Soluções alcoólicas

As concentrações alcoólicas foram previamente preparadas com alcoômetro de Gay-Lussac, reproduzindo-se o que se faz na indústria. Este método se mostrou impreciso e fonte de erro grosseiro pelo grau de subjetividade das leituras. Ao checar as concentrações através de densímetro digital “DENSITO 30P” da METTLER TOLEDO, deparou-se com diferenças de até 6%(v/v). A partir desta constatação, adotou-se o densímetro digital como procedimento padrão, ficando o erro das concentrações entre 0,1%(v/v) e 1%(v/v).

Fica a recomendação para que a indústria tenha uma atenção redobrada à metodologia de calibração das diferentes soluções alcoólicas, principalmente quando o objetivo do teste do álcool for o ajuste do balanço salino de grandes lotes de leite.

6.5 Teste do Álcool

Partindo de um mesmo leite integral pasteurizado registraram-se os resultados obtidos para os quatro tratamentos com e sem adição de sais. Os resultados refletiram a influência dos diferentes sais sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool, como citado por Horne e Parker (1981a), cada sal interferindo com sua especificidade. A Figura 9 mostra os registros das leituras da desestabilização de cada tratamento e a cada graduação alcoólica. A planilha foi elaborada para registro imediato do grau de desestabilização ao teste do álcool, pelo método de visualização “ótica direta”.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO	pH do Leite	Temperatura da análise	NÍVEIS DE ETANOL (% v/v)															
				72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	96	99		
	Calibração do álcool	--	--	72	73	75,5	77,8	80,5	82,1	83,5	85,5	87	89	91,2	93,5	96	99		
	Calibração do pH álcool	--	--	6,85	7,01	6,89	7,00	7,00	7,05	6,95	6,73	6,98	7,10	7,10	6,62	7,00	7,00		
T1	Leite pasteurizado	6,76	6°C	-	-	-	1-	1-	1	1+	1+	1++	1+++						
T2	Leite past + citrato de sódio 0,05% (m/v)	6,85	6°C			-	-	-	-	-	-	1	1++	1+++					
T3	Leite past + fosfato dissódico 0,05% (m/v)	6,85	6°C			-	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++			
T4	Leite past + LAC 8074-7 0,05% (m/v)	6,94	6°C			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1++		

Figura 9: Registro de dados do teste do álcool aplicado aos quatro tratamentos de sais e avaliados pelo método “visualização ótica direta”. Sendo que (vazio) significa não realizado, (-) significa realizado sem desestabilização aparente, (1-) significa dúvida, (1) significa ponto de coagulação e (1+, 1++, 1+++) significam visualizações crescentes e confirmativas da coagulação.

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos dados do experimento (2016).

Todos os três sais igualmente dosados [0,05% (m/v)] em um mesmo leite melhoraram a estabilidade do leite ao álcool comparado com o “controle”. Ocorreu grande diferença no comportamento de cada tratamento. O leite pasteurizado sem adição de sais mostrou coagulação visível no álcool 82%(v/v), com citrato de sódio a coagulação visível ocorreu no álcool 88%(v/v), com fosfato dissódico a coagulação visível ocorreu no álcool 92%(v/v) e a mistura de sais LAC 8074-7 mostrou coagulação visível no álcool 96%(v/v).

Chavez *et al.* (2004) sugerem que o teste do álcool pode ser útil no entendimento sobre os fatores que afetam a estabilidade micelar e pode ser usado como método para selecionar tipos e dosagens de sais estabilizadores.

Deu-se atenção especial a alguns fatores ao se fazer o teste do álcool:

- Agilidade - O tempo de exposição ao álcool muda o resultado do teste. Se variar o tempo da leitura, varia o resultado;
- Temperatura - Fixou-se a temperatura do leite em 6°C, tendo em vista que a variação da temperatura do leite muda a densidade do meio e altera o resultado do teste do álcool. Desta forma, foi garantida a temperatura das amostras de leite dentro da faixa da temperatura que o leite da indústria fica estocado nos silos (entre 4°C e 8°C);
- Subjetividade - As visualizações foram feitas por apenas um observador com o objetivo de reduzir o grau de subjetividade.

6.6 Microscopia ótica digital – *ProScope*

Existe uma dificuldade real na indústria quanto à tomada de decisão no momento da liberação dos lotes de leite para o tratamento UHT.

A visualização ótica direta das micropartículas do teste do álcool é subjetiva e faz com que os operadores tenham opiniões diferentes sobre a leitura de uma mesma análise. As amostras para a visualização ótica direta são de 4mL (2mL de leite e 2mL de álcool) e estão distribuídas numa placa de Petri com área de 78,54cm² (considerando uma placa de Petri de 10cm de diâmetro).

Quando se escolheu o *ProScope* como solução ótica objetivou-se, aumentar a capacidade de visualização das partículas do leite, permitindo enxergar e registrar em imagens a coagulação do leite ao teste do álcool em seus primeiros estágios de formação.

Na nova metodologia, as amostras foram de 10µL e ficaram homogeneamente distribuídas em uma camada delgada formada pelo uso de lâmina e lamínula de vidro com dimensões de 20mm x 20mm, ou seja, uma área total de 400mm². Além de ter-se trabalhado com um aumento de magnitude de 200x.

A relação entre as observações pôde ser assim exemplificada:

- **Placa de Petri:** $4 \text{ mL} / 78,53 \text{ cm}^2 = 0,05 \text{ mL. cm}^{-2}$

- **ProScope:** $0,01 \text{ mL} / 4 \text{ cm}^2 = 0,0025 \text{ mL. cm}^{-2}$

Diminuiu-se em 20x a quantidade de amostra por cm^2 de área observada e incrementou-se em 200x o aumento da visualização.

Olhando por este aspecto, o método permitiu observar a microestrutura do material de forma mais assertiva, pois o campo de observação não foi saturado com muita amostra (como no caso da placa de Petri) e teve-se ainda acesso a uma escala de grandeza que permitiu identificar a formação dos primeiros agregados com tamanho inferior à capacidade de identificação do olho humano ($100\mu\text{m}$). Os primeiros indícios de desestabilização com a formação dos primeiros agregados foram detectados pela microscopia ótica digital na faixa de $20\mu\text{m}$.

Os aglomerados observados na visualização ótica direta (em placa de Petri) representaram interações secundárias entre os primeiros aglomerados, até a formação de agregados maiores que $100\mu\text{m}$. Já o *ProScope* permitiu acessar a escala sub $100\mu\text{m}$.

Em complementação, com a formação da camada delgada pela deposição da lamínula, aumentou-se a área de observação de cada agregado unitário formado, devido ao efeito de espalhamento da massa do material, ocasionado pela exposição dos constituintes originalmente estruturados na parte interna do agregado.

O aumento da capacidade ótica (200x) do *ProScope* permitiu ao operador uma antecipação da visualização da formação de grumos e, conseqüentemente, permitirá uma maior assertividade na tomada de decisão na liberação dos lotes de leite para o tratamento UHT. Desta forma, o uso do *ProScope* trouxe uma colaboração inédita para que, o teste do álcool, mantendo a sua simplicidade, seja capaz de ajudar na tomada de decisões de fábrica com melhor definição, segurança e capacidade de registro.

Através da comparação entre as duas metodologias (Quadro 3), pôde-se registrar algumas vantagens da microscopia ótica digital sobre a ótica direta.

Quadro 3: Comparação de eficiência entre metodologias ótica direta e microscopia ótica digital

Atributos	Metodologia Ótica	
	Ótica direta	Microscopia ótica digital
Magnitude da visualização	1 x	200 x
Responsabilidade da avaliação e decisão do teste	Laboratorista	Possibilidade de consulta a níveis superiores
Capacidade de registro, rastreabilidade e compartilhamento da visualização	Em fichas de preenchimento manual; Restrita e de baixa duração (dado se perde)	Registro digital com captura de imagens e vídeos; Pode ser arquivado e ou compartilhado por meios digitais por tempo indeterminado
Capacidade de uso como ferramenta de desenvolvimento de novos produtos ou dosagens de sais	Reduzida	Alta capacidade de desenvolvimento devido a maior magnitude da observação e à possibilidade de comparação com o banco de imagens.

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos resultados da pesquisa (2016).

Em seguida uma seleção de imagens em forma de coleção fotográfica dos dados coletados para os controles sem adição de álcool, e para os testes do álcool aplicados nos quatro tratamentos de ajuste salino.

6.6.1 Imagens dos leites antes do teste do álcool – Controle

As imagens da Figura 10 abaixo mostram as microestruturas do leite antes de se iniciar o teste do álcool. Visualiza-se um fundo homogêneo com aspecto de rugosidade, típico do que é a referência de microestruturas do leite na magnitude de 200x capturadas pelo microscópio ótico digital e nas quatro versões de sais.

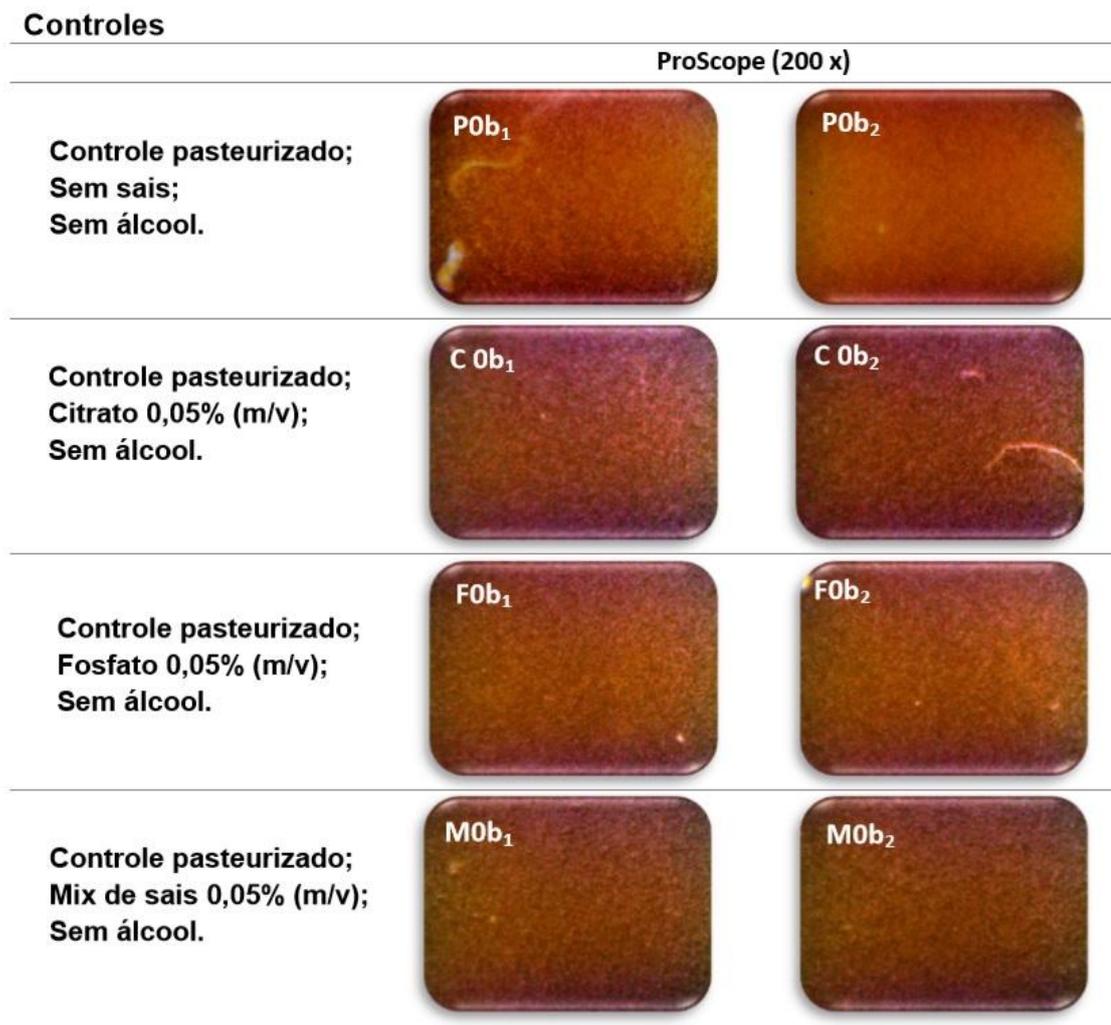


Figura 10: Imagens da visualização do leite pasteurizado sem adição de álcool, nas versões pasteurizado sem adições (P), com adição de citrato de sódio (C), com fosfato dissódico (F) e com mix de sais (M): *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂).

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

6.6.2 *Teste do álcool no leite sem adição de sais*

O primeiro tratamento submetido ao teste do álcool foi o leite pasteurizado sem adição de sais estabilizadores. A Figura 11a e 11b na página seguinte mostram os resultados dos dois métodos qualitativos: ótico direto em placas de Petri e microscopia ótica digital com aumento ótico de duzentas vezes.

Enquanto a visualização ótica direta constatou a coagulação ao teste do álcool na graduação 82%(v/v), a microscopia ótica digital antecipou a visualização da formação dos primeiros coágulos para a graduação alcoólica de 76%(v/v).

Nota-se nas imagens da microscopia ótica digital um aumento na rugosidade do fundo das imagens e o aparecimento de pequenos aglomerados branco amarelados que surgem a partir do álcool 76%(v/v) e crescem conforme aumenta-se a graduação alcoólica.

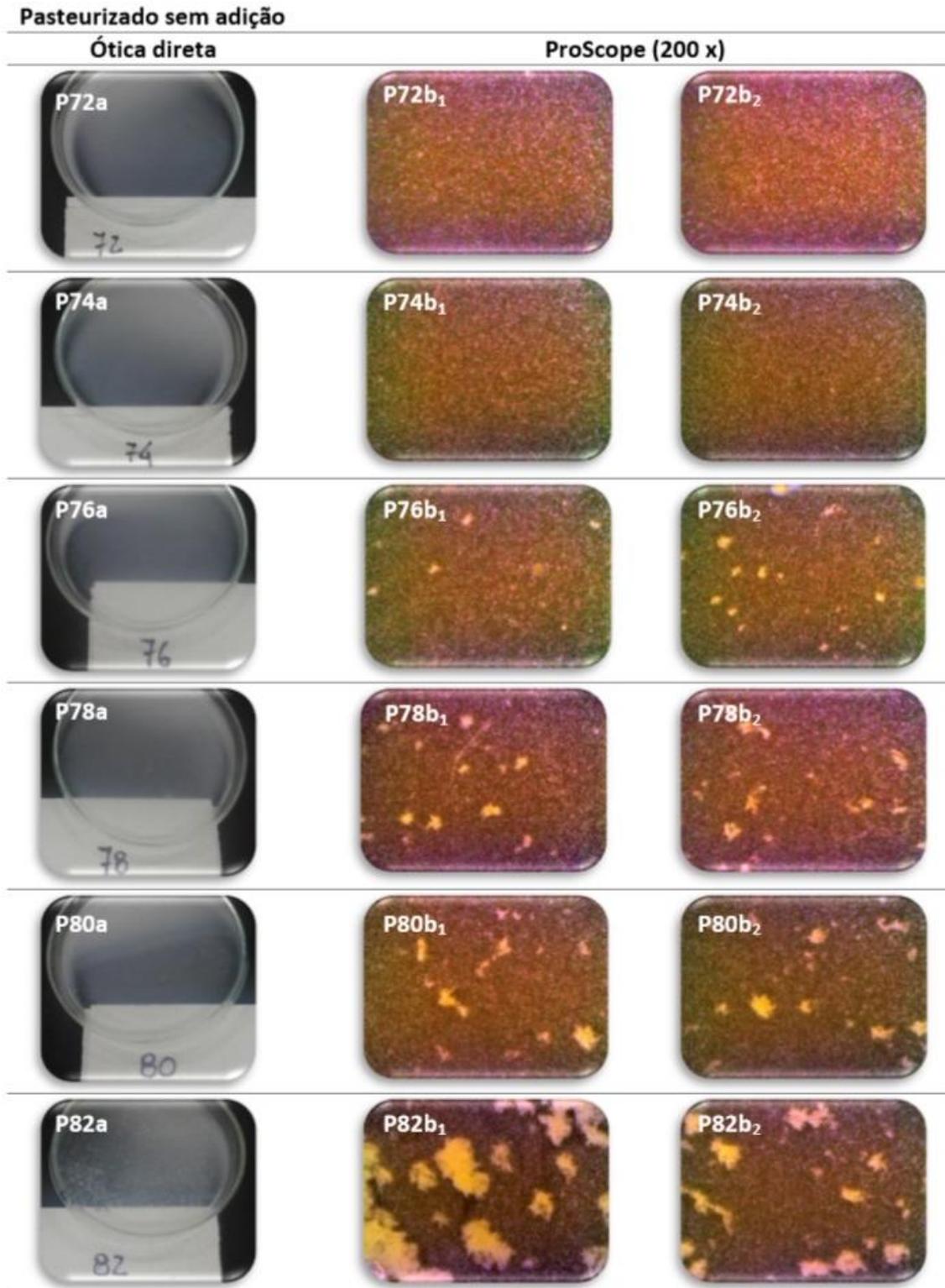


Figura 11a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado sem adições de sais (P) em concentrações de álcool variando entre 72%(v/v) a 90%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂).

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

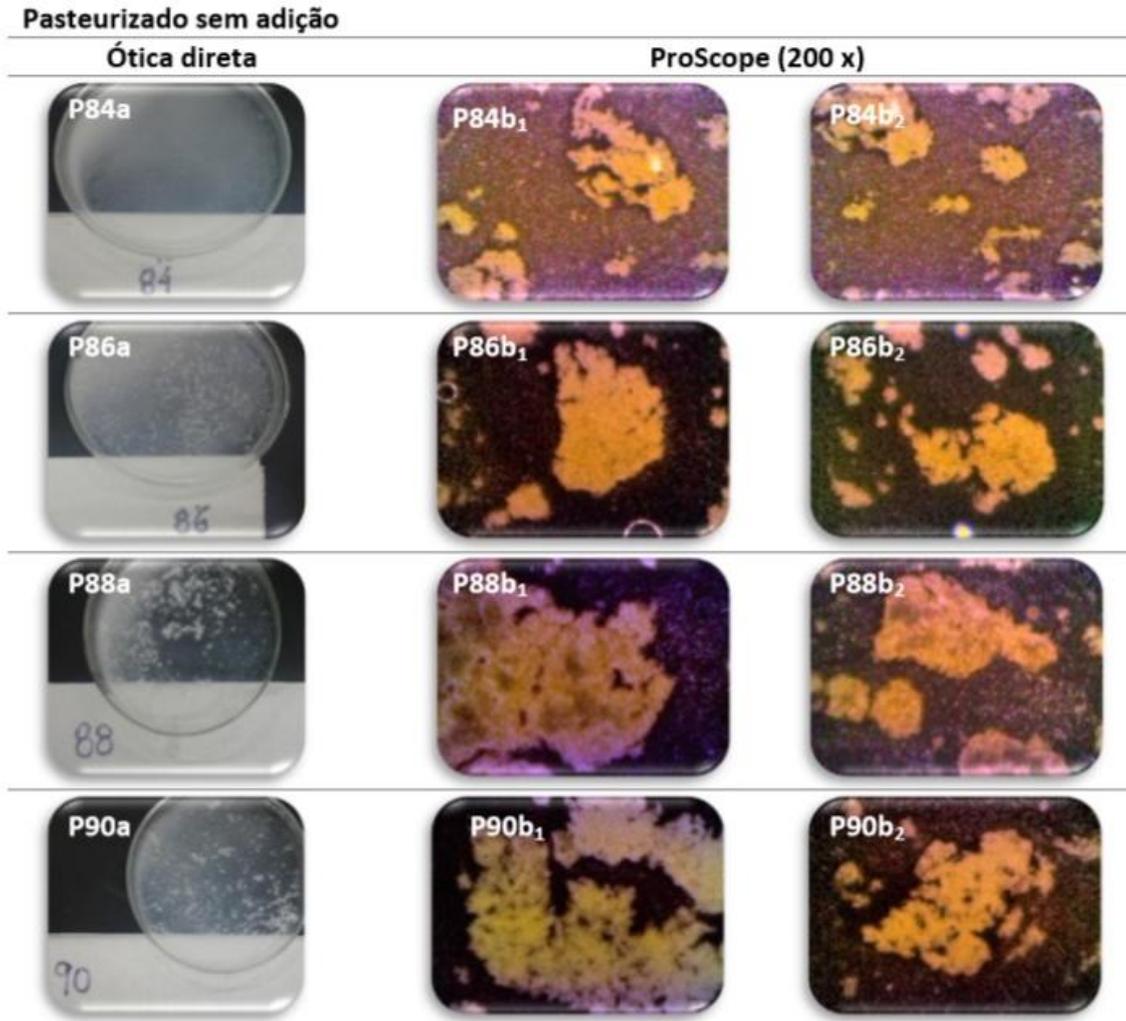


Figura 11b: Continuação da análise das imagens.

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

6.6.3 Teste do álcool no leite com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v)

O segundo tratamento submetido ao teste do álcool foi o leite pasteurizado adicionado de citrato de sódio 0,05%(m/v). A Figura 12a e 12b nas páginas seguintes mostram os resultados dos dois métodos qualitativos: ótico direto em placas de Petri e microscopia ótica digital com aumento ótico de duzentas vezes.

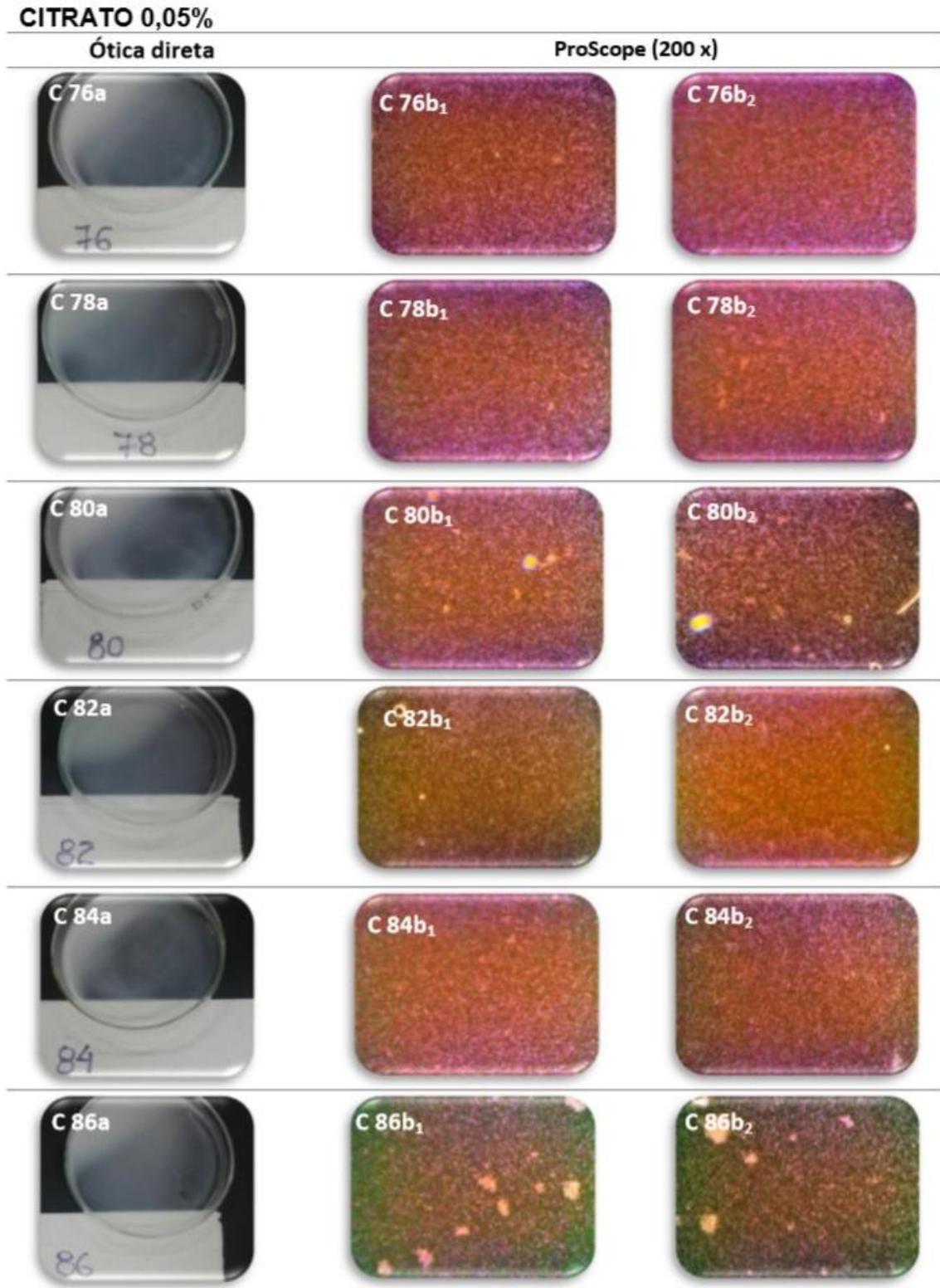


Figura 12a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v) (C) em concentrações de álcool variando entre 76%(v/v) à 92%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂).

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

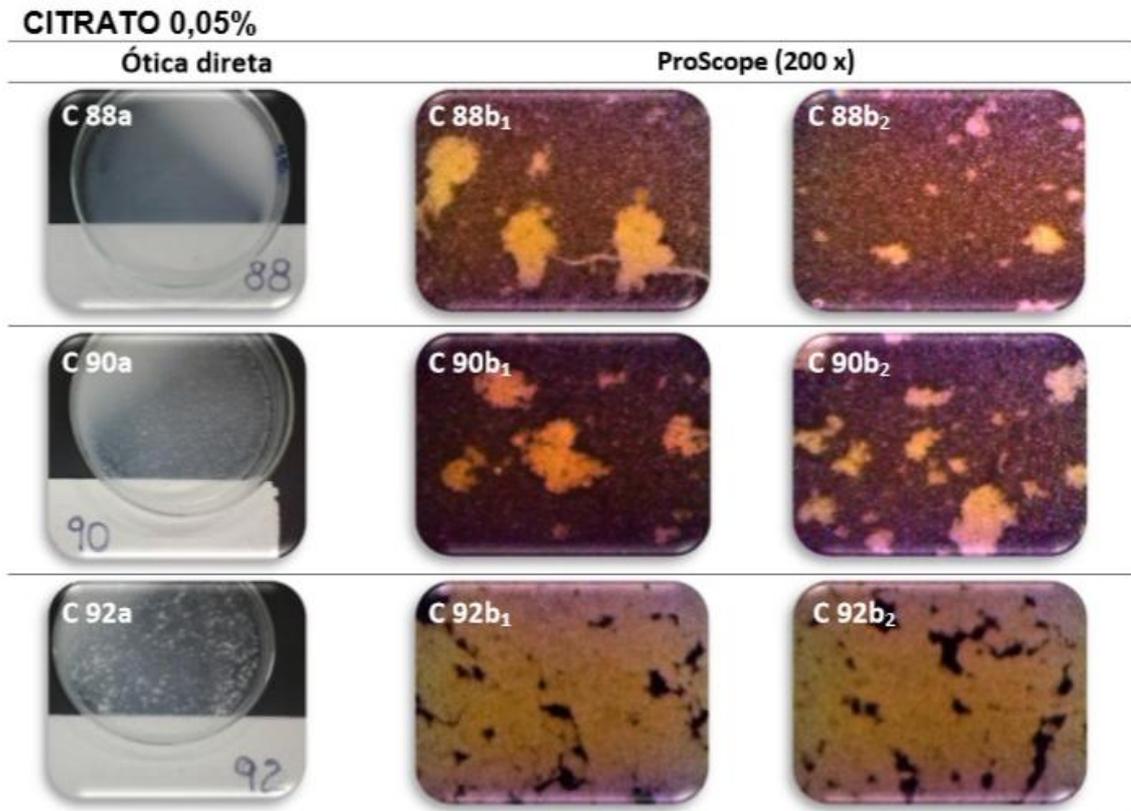


Figura 12b: Continuação da análise das imagens.

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

Enquanto a visualização ótica direta constatou a coagulação do tratamento com citrato de sódio ao teste do álcool na graduação 88%(v/v), a microscopia ótica digital antecipou a visualização da formação dos primeiros coágulos para a graduação alcoólica de 86%(v/v).

6.6.4 Teste do álcool no leite com adição de fosfato dissódico 0,05%(m/v)

O terceiro tratamento submetido ao teste do álcool foi o leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico 0,05%(m/v). A Figura 13a e 13b mostram os resultados dos dois métodos qualitativos: ótico direto em placas de Petri e microscopia ótica digital com aumento ótico de duzentas vezes.

FOSFATO DISSÓDICO 0,05%

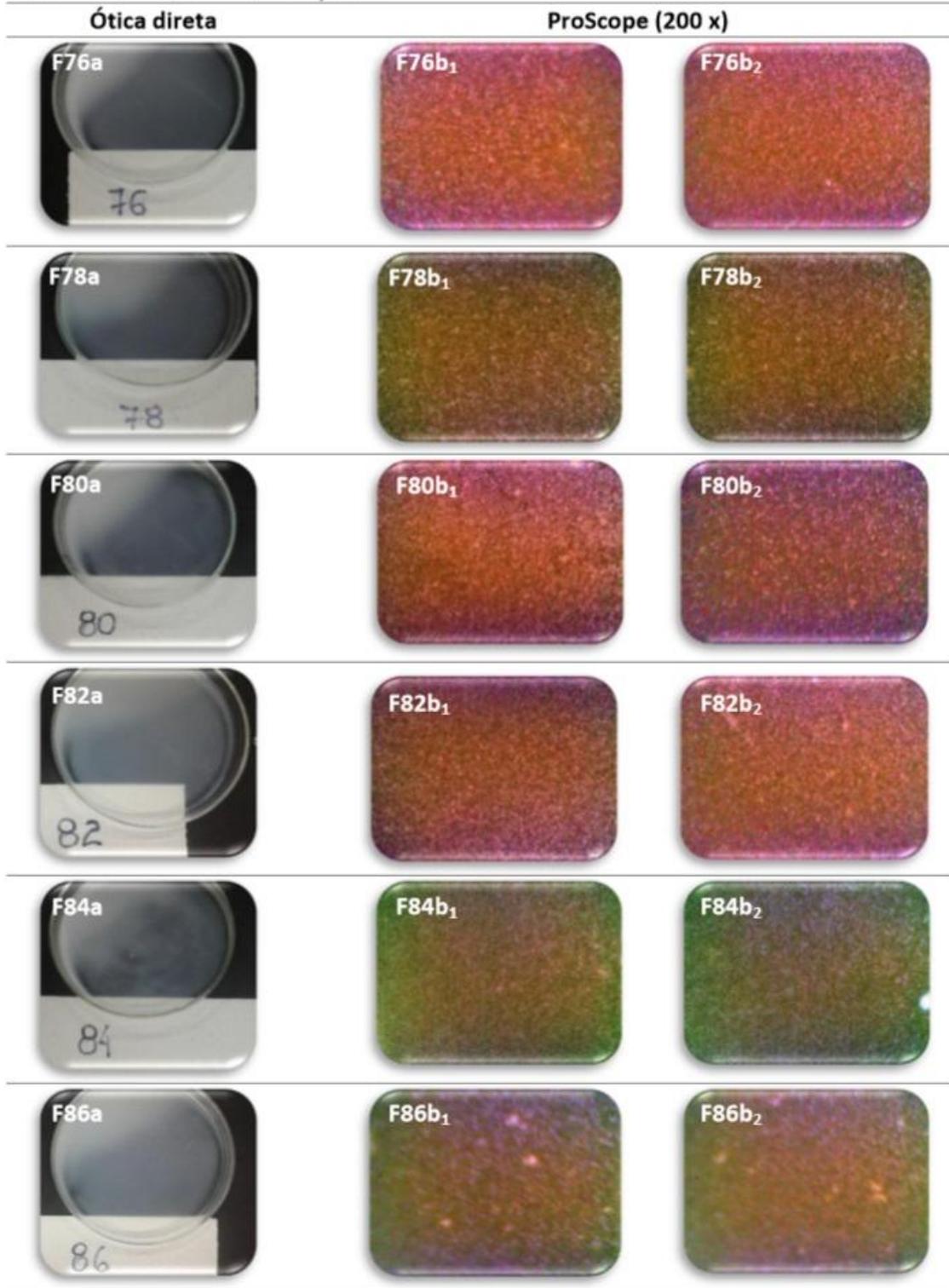


Figura 13a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de fosfato dissódico (F) em concentrações de álcool variando entre 76%(v/v) a 94%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂).

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

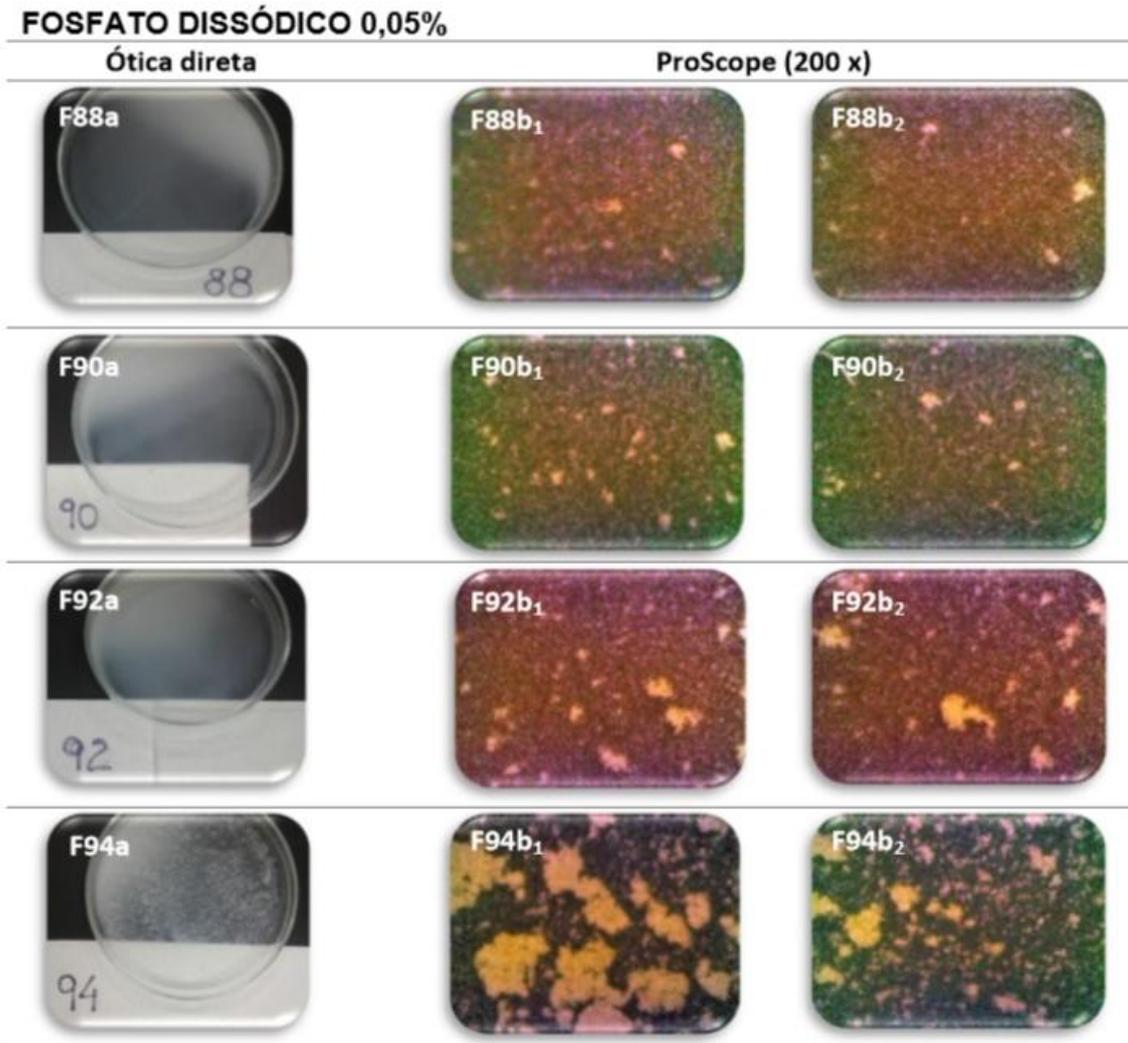


Figura 13b: Continuação da análise das imagens.

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

Enquanto a visualização ótica direta constatou a coagulação do tratamento com fosfato dissódico ao teste do álcool na graduação 92%(v/v), a microscopia ótica digital antecipou a visualização da formação dos primeiros coágulos para a graduação alcoólica de 88%(v/v).

6.6.5 Teste do álcool no leite com adição de LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)

O quarto tratamento submetido ao teste do álcool foi o leite pasteurizado adicionado de uma mistura de sais LAC 8074-7 a 0,05%(m/v). A Figura 14a e 14b a

seguir mostram os resultados dos dois métodos qualitativos: ótico direto em placas de Petri e microscopia ótica digital com aumento ótico de duzentas vezes.

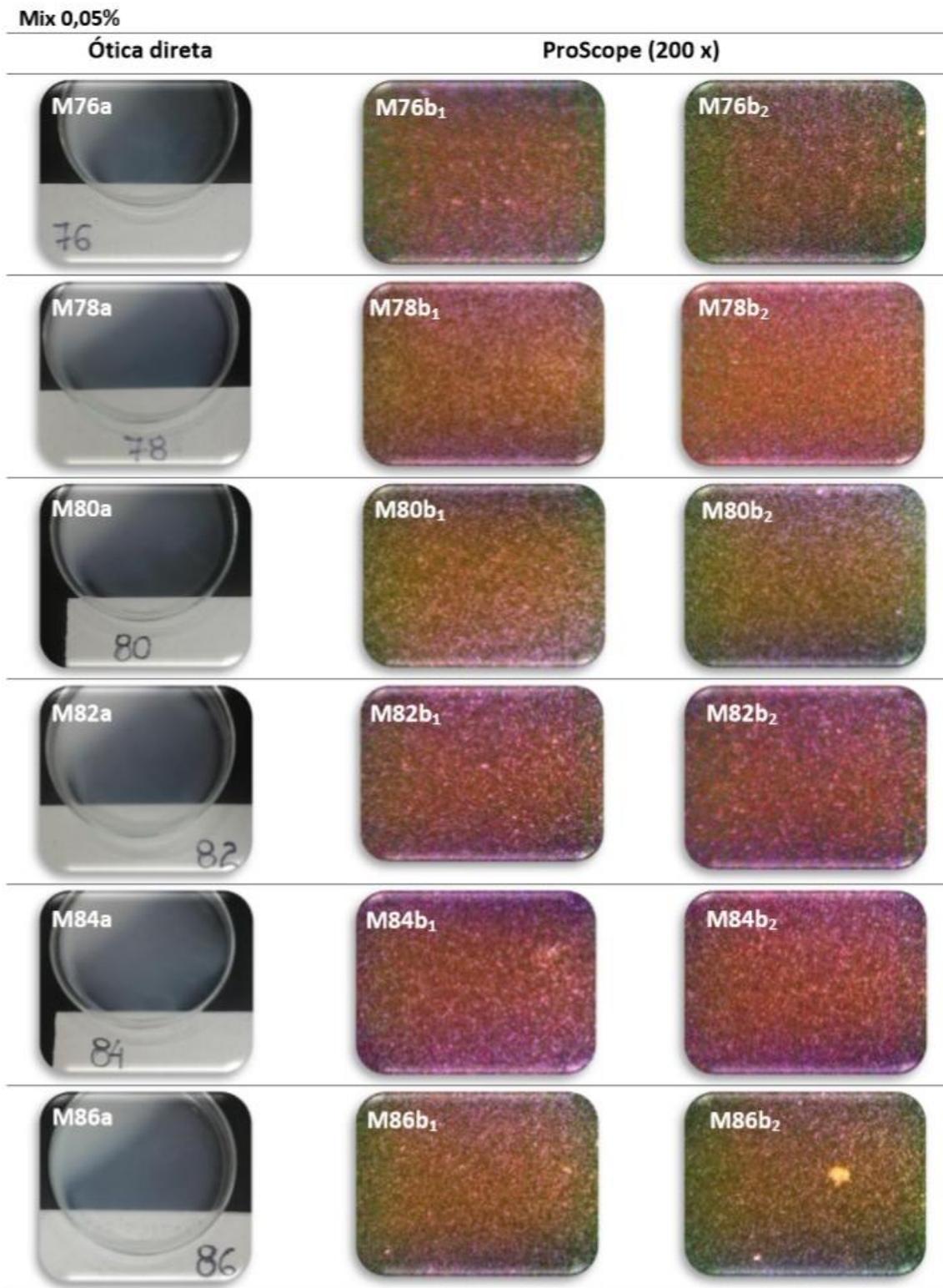


Figura 14a: Imagens comparativas da visualização do teste do álcool para o leite pasteurizado com adição de Mix de sais Lac 8074-7 (M) em concentrações de álcool variando entre 76%(v/v) a 96%(v/v) (o número indica o grau alcoólico): ótica direta (a), *ProScope* 200x campo 1 (b₁) e *ProScope* 200X campo 2 (b₂).

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

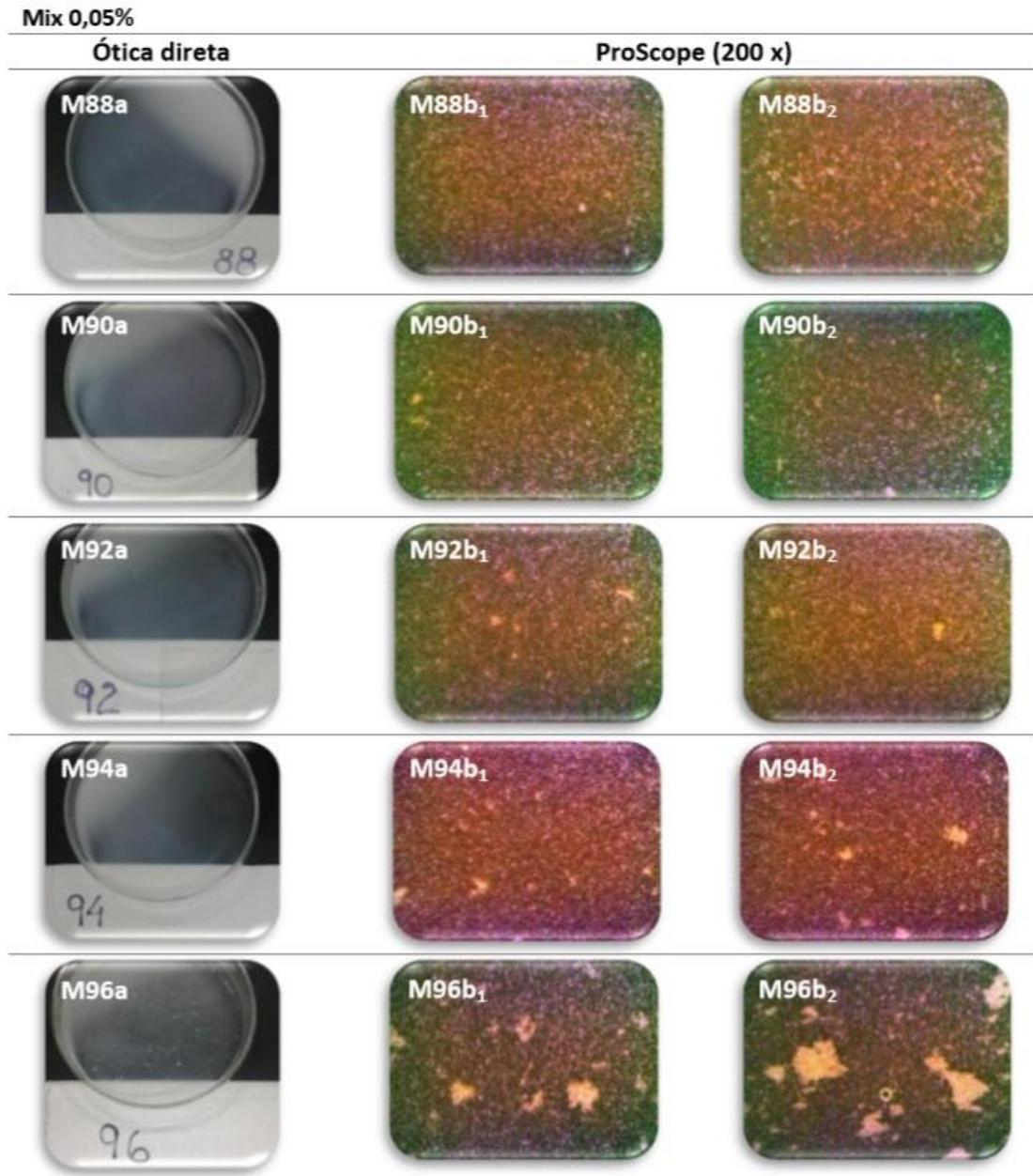


Figura 14b: Continuação da análise das imagens.

Fonte: Adaptado pelo autor, do programa de imagens do *ProScope* (2016).

Enquanto a visualização ótica direta constatou a coagulação do tratamento com Mix de sais LAC 8074-7 ao teste do álcool na graduação 96%(v/v), a microscopia ótica digital antecipou a visualização da formação dos primeiros coágulos para a graduação alcoólica de 94%(v/v).

Evidenciou-se um grau de estabilidade do leite ao álcool muito superior proporcionado pelo Mix de sais LAC 8074-7, em comparação com os demais tratamentos.

6.6.6 Procedimento analítico padrão (*ProScope*) - Teste de Performance ao Etanol

Ao se observar a desestabilização do leite no teste do álcool com maior acuidade, pôde-se constatar que a coagulação não ocorre de maneira repentina, o que levou ao entendimento de que o processo de coagulação ao álcool é gradual e paulatino. Assim sendo no caso de uso do teste do álcool como ferramenta de ajuste de balanço salino e liberação de lotes de leite para tratamento UHT, sugere-se o uso do termo Teste de Performance ao Etanol.

Como produto do presente trabalho elaborou-se um modelo de PROCEDIMENTO ANALÍTICO PADÃO para a realização do Teste de Performance ao Etanol com auxílio do microscópio ótico digital (*ProScope*) nos laboratórios das indústrias que operam com leite UHT (APENDICE – A).

O objetivo é auxiliar a indústria, por meio do Teste de Performance ao Etanol, a buscar o ponto de maior estabilidade térmica de determinado lote de leite, fundamentado na relação que existe entre a estabilidade ao etanol e a ETL.

O equipamento *ProScope*, com baixo custo e simplicidade, promove o aumento de 200x na capacidade de visualização dos grumos resultantes do teste do álcool, e deverá ser utilizado como ferramenta mais acurada para a definição dos ajustes salinos a cada liberação de lote de leite para o processamento UHT.

6.7 Analisador de partículas – LS

O leite muda seu perfil de microestruturas diante da ação do álcool. O analisador de partículas – LS demonstrou que a desestabilização pelo efeito do álcool é gradual e não ocorre de maneira súbita. A cada concentração alcoólica pôde-se observar mínimas variações volumétricas representadas pela movimentação dos percentuais de volumes (%) das regiões nanométricas para as regiões micrométricas.

O leite pasteurizado 3%(v/v) de gordura sem adição de sais e sem adição de álcool foi a matriz escolhida para a formação da base de dados como controle.

O gráfico, que representa a distribuição volume (%) para cada posição de tamanho de partículas entre 0,04 e 2000 micrômetros (μm) gerada pelo *software* do LS, permitiu a visualização refinada da formação paulatina de micropartículas maiores a cada uma das graduações crescentes de álcool. Observou-se uma modificação na distribuição do volume (%) inicial (controle) com o deslocamento das partículas da zona das micelas de caseína (40 - 500nm) para regiões de agregados maiores que $10\mu\text{m}$ e, chegando a tamanhos maiores que $50\mu\text{m}$ para as mais altas concentrações alcoólicas.

Por trabalhar com uma grande quantidade de dados e ser de grande acurácia na mensuração das micropartículas, o *software* do LS gera relatórios estatísticos da distribuição de partículas, permitindo um entendimento mais aprofundado da desestabilização pelo teste do álcool quando comparado com a observação ótica direta e por microscopia ótica digital.

Os resultados das leituras do LS acompanharam e confirmaram os fenômenos visualizados no teste do álcool. Vislumbrou-se um grande potencial de uso desta ferramenta tanto para aprofundar os estudos das micropartículas do leite quanto para o desenvolvimento de novas combinações de sais estabilizadores.

Como não se encontrou referências do uso do LS para a análise de partículas do leite submetido ao teste do álcool, foi necessário criar um ponto de partida para balizar a análise de todos os quatro tratamentos. Chamou-se de controle os resultados do LS para os quatro tratamentos salinos antes da aplicação do teste do álcool.

6.7.1 Resultados dos leites antes do teste do álcool – Controle

Previamente à análise pelo LS dos tratamentos submetidos ao teste do álcool avaliaram-se os quatro tratamentos na sua forma natural, para formação de um comportamento controle. Mediu-se o volume (%) ocupado pelas partículas em cada posição de tamanho na escala entre $0,04\mu\text{m}$ e $2.000\mu\text{m}$. Constatou-se que tanto o

leite pasteurizado sem adição quanto o leite adicionado das três variações de sais apresentaram curvas semelhantes indicando que a simples presença dos sais não foi responsável pela formação de novas partículas na região observada, conforme a Figura 15.

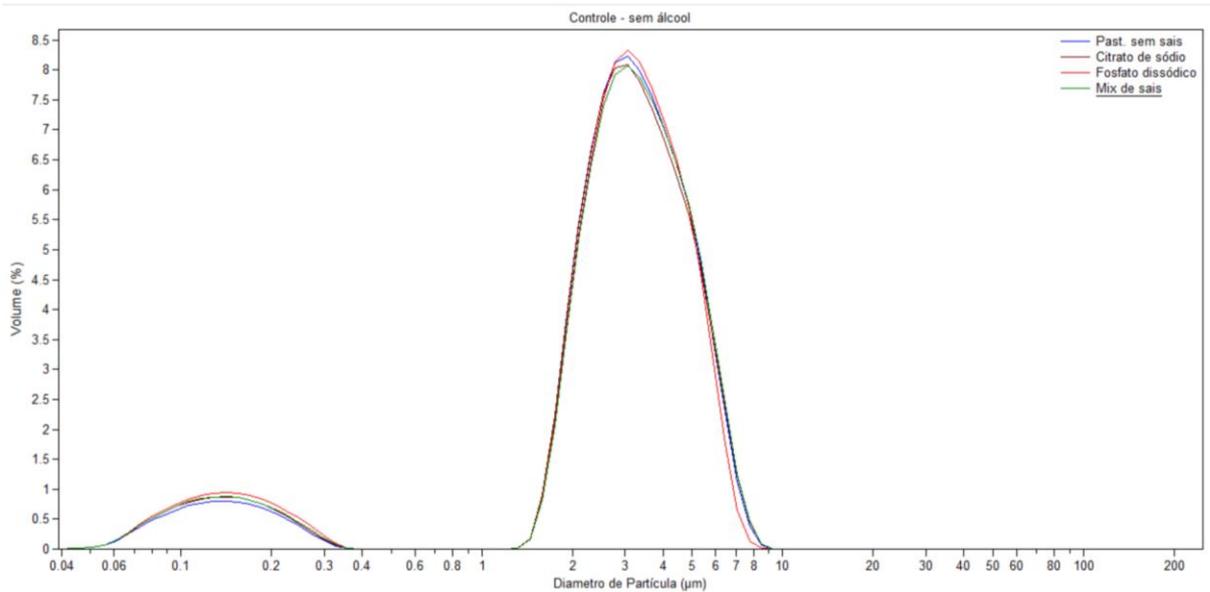


Figura 15: Curvas representando a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado com e sem adição de sais e não submetido ao teste do álcool.

Fonte: Curvas geradas pelo software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER, 2016).

Evidenciou-se a distribuição das micropartículas do leite pasteurizado em duas regiões micrométricas distintas: região das micelas de caseína entre 0,04µm e 0,4µm e a região dos glóbulos de gordura entre 1,0µm e 10µm.

Walstra *et al.* (1999) citam 10µm como limite máximo para o tamanho dos glóbulos de gordura, valor que coincide com o encontrado pelo LS para o leite pasteurizado usado no experimento.

Com auxílio do software do LS elaborou-se relatórios com a distribuição das partículas em volumes (%) por região de tamanho (µm). A Tabela 5 abaixo indica, para os quatro tratamentos de sais, que não haviam partículas na região acima de 10µm antes da exposição das amostras ao teste do álcool, estando a totalidade das partículas do leite compreendidas nas regiões micrométricas abaixo de 10µm. Tem-se ainda, na região das micelas de caseína (<0,5µm), a indicação de que, em

volume (%) ocupado, as micelas de caseína representam aproximadamente 10% do volume total de partículas do leite.

Tabela 5: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (<0,5 μ m e >10 μ m), no leite pasteurizado nos quatro tratamentos de sais e sem os efeitos do teste do álcool.

Tratamentos	Médias (μ m)	Desvio padrão (μ m)	Distribuição das partículas (volume %)	
			<0,5 μ m	>10 μ m
Controle sem sais	3,206	1,596	9,91	0%
Controle Cit 0,05	3,180	1,629	10,80	0%
Controle Fosf 0,05	3,095	1,575	11,90	0%
Controle Mix 0,05	3,207	1,643	11,00	0%

Fonte: *Software* do LS 13 320 (BECKMAN COULTER), modificado pelo autor (2016).

Os resultados estatísticos dos três tratamentos adicionados de sais mostraram médias e desvio padrão semelhantes ao Controle sem adição de sais, indicando que a simples presença dos sais sem a ação do teste do álcool não foi capaz de alterar a distribuição inicial das partículas do leite pasteurizado integral.

6.7.2 Considerações gerais - leitura dos efeitos do teste do álcool no LS

Os quatro tratamentos foram submetidos ao teste do álcool. A cada nova graduação alcoólica crescente de 2%(v/v) sobre a anterior, observou-se uma movimentação na distribuição das micropartículas com redução dos volumes (%), na primeira e na segunda região, surgindo gradativamente uma terceira região de estruturas acima de 10 μ m.

Este deslocamento das micropartículas para regiões de tamanhos maiores sugere que a dinâmica de desestabilização ao álcool é gradativa e não repentina até a formação de agregados maiores, compatíveis com o que se observou na coagulação das micelas de caseína como visualizados no teste do álcool. A sensibilidade do LS permitiu antecipar a percepção de mínimas alterações de

tamanho nas microestruturas que não eram possíveis nem na observação ótica direta, nem com o aumento de 200x da microscopia digital.

Na região nanométrica abaixo de $0,5\mu\text{m}$ (das micelas de caseína), percebeu-se patamares de resistência à desestabilização diante do aumento das graduações alcoólicas, antes da transferência total de matéria, ou coagulação, que ocorre nas concentrações mais altas de álcool.

Na região micrométrica entre $1\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$ (dos glóbulos de gordura), notou-se os mesmos escalonamentos de resistência ao aumento das graduações alcoólicas. A perda de volume de partículas na primeira e na segunda região ocorre de maneira simultânea, acompanhadas pela formação gradativa de uma terceira região com estruturas maiores que $10\mu\text{m}$, sugerindo que os glóbulos de gordura se comportam como pontos de aglomeração das micelas de caseínas, ou que são arrastados por aprisionamento físico na rede de coágulos.

A terceira região é constituída por partículas maiores que $10\mu\text{m}$, que não existiam no leite inicial. As grandes estruturas se formam também de maneira gradativa, conforme se aumenta as graduações alcoólicas. O gráfico apresenta de forma visual e quantificada as consequências do efeito da desestabilização provocada pelo teste do álcool.

As estruturas da terceira região obedeceram a uma dinâmica de formação de tamanhos semelhante para todos os quatro tratamentos, com um início de formação de um pico na posição de $20\mu\text{m}$ que persistiu crescente por diversas graduações alcoólicas, antes de sugerir um colapso e a subsequente desordem total do sistema.

6.7.2.1 Teste do álcool no leite pasteurizado sem adição de sais

Na Figura 16, na página seguinte, estão representadas as curvas com a dinâmica da evolução dos tamanhos das micropartículas do leite pasteurizado sem adição de sais estabilizadores e submetido ao teste do álcool nas graduações entre 72%(v/v) e 90%(v/v) em intervalos de duas unidades percentuais. A curva “Controle” se refere ao leite pasteurizado sem adição de sais e, sem efeito de álcool.

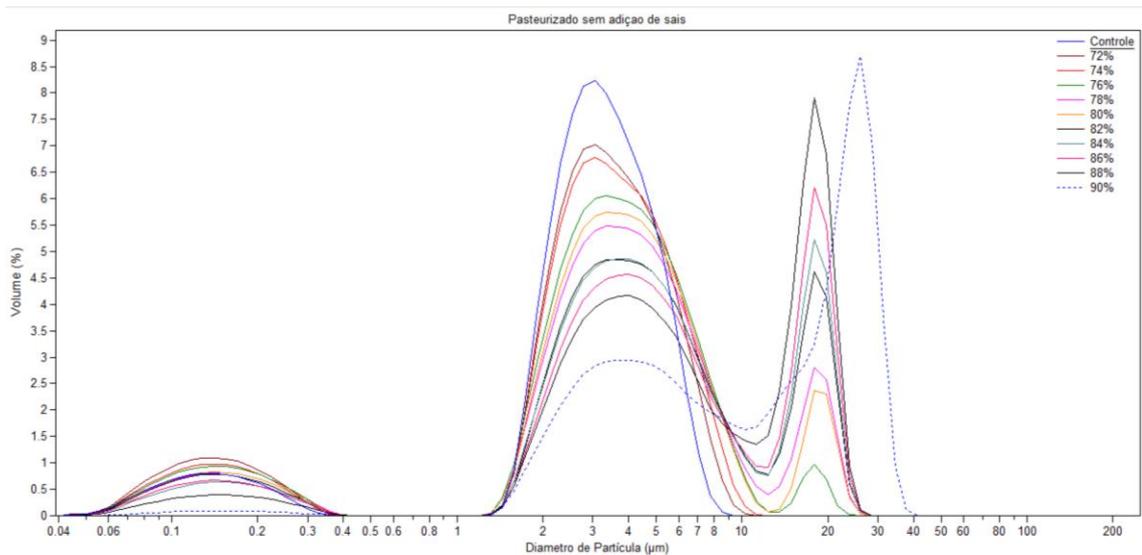


Figura 16: Curvas representando a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre $0,04\mu\text{m}$ e $200\mu\text{m}$) para leite pasteurizado sem adição de sais e submetido ao teste do álcool (72%(v/v) a 90%(v/v)).

Fonte: Curvas geradas pelo software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER, 2016).

Houve o início da formação de um pico na região de $16,40\mu\text{m}$ desde o álcool 76%(v/v), registrando uma formação sutil de micropartículas que não foi perceptível pelo método ótico direto nem pelo microscópico digital.

No registro da observação visual do teste do álcool apareceram sinais fracos de desestabilização nos álcoois 78%(v/v) e 80%(v/v), só vindo a apresentar grumos visíveis no álcool 82%(v/v), evidenciando a dificuldade da definição visual do ponto exato da coagulação pelo álcool pelo método ótico convencional.

A Tabela 6, na página seguinte, apresenta os resultados estatísticos do LS com as análises da distribuição das partículas em volume (%) por tamanho (μm).

Tabela 6: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho ($< 0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$), no leite pasteurizado sem adição de sais (Past) e submetido ao teste do álcool nas concentrações de 72%(v/v) a 90%(v/v).

Tratamentos	Médias (μm)	Desvio padrão (μm)	Distribuição das partículas (volume %)	
			$<0,5\mu\text{m}$	$>10\mu\text{m}$
Controle	3,206	1,596	9,91	0,00
Past 72	3,306	1,922	13,90	0,03
Past 74	3,506	2,038	12,40	0,16
Past 76	4,134	3,299	12,30	3,83
Past 78	5,448	5,131	10,80	12,60
Past 80	5,057	4,772	10,80	9,35
Past 82	6,648	6,072	10,20	21,00
Past 84	7,001	6,231	8,43	23,10
Past 86	7,595	6,580	8,75	27,40
Past 88	8,841	6,876	5,32	36,30
Past 90	14,130	10,070	1,27	54,20

Fonte: Software do LS 13 320 (Beckman Coulter), modificado pelo autor (2016).

As médias se referem ao diâmetro hidrodinâmico médio do total de partículas do leite em cada graduação alcoólica que aumenta gradualmente, indicando uma movimentação em direção à coagulação. O desvio padrão crescente também aponta para um aumento da desorganização do sistema, terminando no colapso total das forças de repulsão formando grandes estruturas.

A análise da distribuição das partículas em duas regiões extremas ($<0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$) mostra a movimentação gradual dos percentuais de volumes (%) migrando das regiões nanométricas para as regiões micrométricas. Os primeiros sinais de aglomeração no LS ocorreram no álcool 76%(v/v), coincidindo com os primeiros sinais de coagulação observada pela microscopia ótica digital, enquanto que a coagulação observada pela ótica direta ocorreu no álcool 82%(v/v).

Apesar de não se perceber movimentação significativa na região dos glóbulos de gordura ($>10\mu\text{m}$) para as duas primeiras graduações alcoólicas (72%v/v e 74%v/v), pode-se perceber um aumento do volume (%) ocupado pelas partículas na primeira região ($<0,5\mu\text{m}$) sugerindo que o contato com o álcool provoca um aumento de volume na região das micelas antes do início da desestabilização.

6.7.2.2 Teste do álcool no leite com adição de citrato de sódio 0,05%(m/v)

Na Figura 17, estão representadas as curvas com a dinâmica da evolução dos tamanhos das partículas do leite pasteurizado adicionado de 0,05%(m/v) de citrato de sódio e submetido ao teste do álcool, nas graduações entre 76%(v/v) e 92%(v/v), em intervalos de duas unidades percentuais. A curva “Controle” se refere ao leite pasteurizado sem adição de sais e sem efeito de álcool. A curva “Cit 0%” se refere ao tratamento pasteurizado, adicionado de citrato de sódio e, antes dos efeitos do álcool.

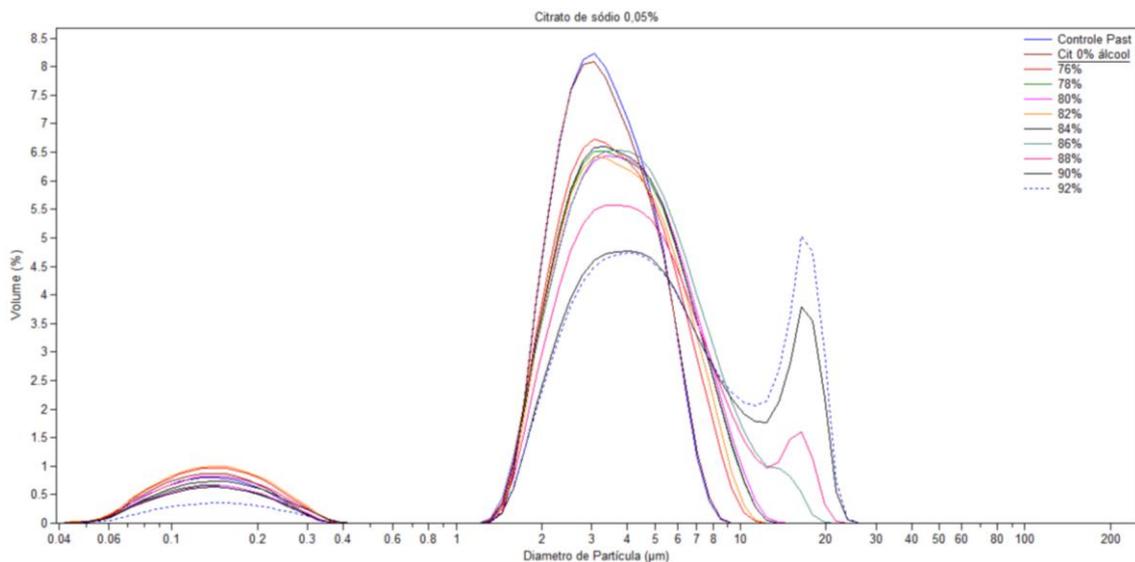


Figura 17: Curvas com a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre 0,04µm e 200µm) para leite pasteurizado adicionado de citrato de sódio 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 92%(v/v)].

Fonte: Software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER), modificado pelo autor (2016).

A formação de acúmulo de partículas no pico de 18µm na terceira região se iniciou entre as curvas dos álcoois 86%(v/v) e 88%(v/v). Neste caso a avaliação ótica direta acusou coagulação no álcool 88%(v/v) e o microscópio digital (*ProScope*) antecipou a visualização da coagulação para o álcool 86%(v/v).

Desde o álcool 76%(v/v) a segunda região de partículas diminuiu a altura e alargou a base, ultrapassando o limite de 10µm, na direção da terceira região, mantendo um comportamento pré colapso semelhante para todas as graduações até o álcool 86%(v/v). O tratamento com leite pasteurizado adicionado de citrato de

sódio revelou uma maior resistência na formação da terceira região e consequentemente da coagulação.

Os resultados quantitativos no eixo Y sugerem que exista um nível crítico de volume (%) de partículas acumuladas na região 18 μ m que corresponde, no LS, ao ponto de coagulação visível do *ProScope*. O nível crítico de coagulação se situou entre 1,2% e 1,5% de volume acumulado para o tratamento com adição de citrato de sódio.

Na Tabela 7 têm-se os resultados estatísticos do LS com as análises da distribuição das micropartículas em volume (%) por tamanho (μ m).

Tabela 7: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5 μ m e >10 μ m), no leite pasteurizado adicionado de citrato de sódio (Cit) 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 92%(v/v)]

Tratamentos	Médias (μ m)	Desvio padrão (μ m)	Distribuição das partículas (volume %)	
			<0,5 μ m	>10 μ m
Controle	3,206	1,596	9,91	0,00
Cit 0	3,180	1,629	10,80	0,00
Cit 76	3,489	2,038	12,40	0,18
Cit 78	3,884	2,189	8,37	0,94
Cit 80	3,952	2,245	8,32	1,23
Cit 82	3,596	2,145	12,90	0,31
Cit 84	3,897	2,166	7,89	0,90
Cit 86	4,096	2,741	12,10	3,41
Cit 88	4,786	3,770	10,60	8,89
Cit 90	6,289	5,252	9,56	20,10
Cit 92	7,189	5,556	4,62	25,80

Fonte: Software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER), modificado pelo autor (2016).

Observa-se uma maior homogeneidade tanto das médias quanto dos desvios padrão, até o álcool 86%(v/v). A partir deste momento tanto as médias quanto o desvio padrão crescem sugerindo aumento da desorganização do sistema, terminando no colapso das forças de repulsão, sugerindo a formação das grandes estruturas de coagulado da terceira região (>10 μ m).

Comparando-se os resultados do LS com os momentos da coagulação pelos dois métodos de observação ótica, pode-se inferir que o LS aponta os primeiros sinais de aglomeração, de forma similar ao *ProScope*, e antes da ótica direta. O sistema leite/citrato resistiu à desestabilização ao álcool por 10 pontos percentuais

na graduação alcoólica, pois não houve movimentação significativa de partículas para a terceira região ($>10\mu\text{m}$) até o álcool 86%(v/v).

6.7.2.3 Teste do álcool no leite com adição de fosfato dissódico 0,05%(m/v)

Na Figura 18 estão representadas as curvas com a dinâmica da evolução dos tamanhos das micropartículas do leite pasteurizado, adicionado de 0,05%(m/v) de fosfato dissódico e submetido ao teste do álcool nas graduações entre 76%(v/v) e 96%(v/v) em intervalos de duas unidades percentuais.

A curva “Controle” se refere ao leite pasteurizado sem adição de sais e sem efeito de álcool. A curva “Fosf 0%” se refere ao tratamento pasteurizado, adicionado de fosfato dissódico e, antes dos efeitos do álcool.

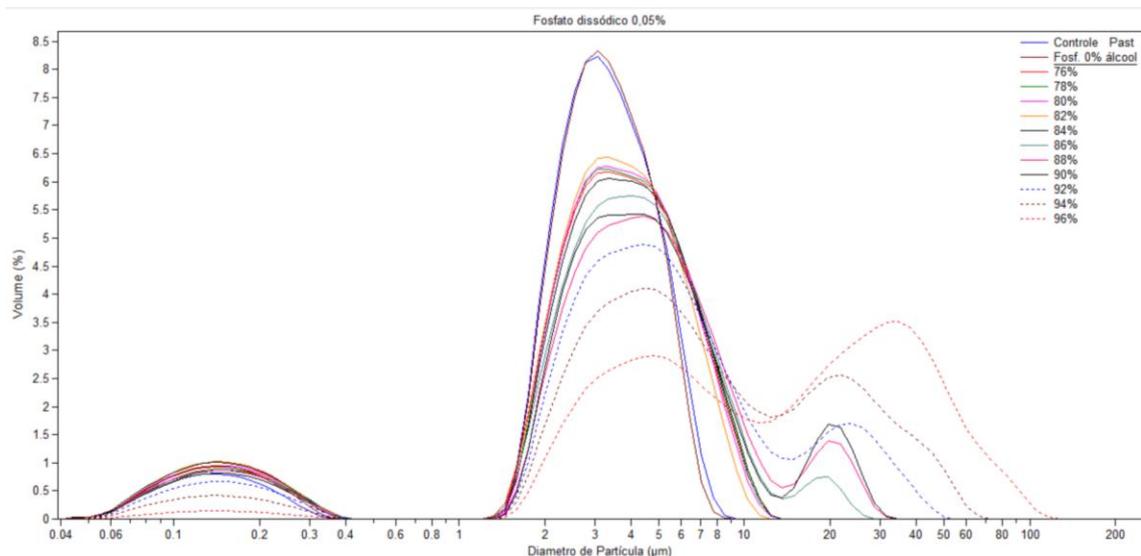


Figura 18: Variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre $0,04\mu\text{m}$ e $200\mu\text{m}$) para leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 96%(v/v)].

Fonte: Curvas geradas pelo software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER, 2016).

Devido ao fato de a coagulação ter ocorrido em graduação alcoólica mais alta (92%(v/v)), continuou-se o teste do álcool até mais duas graduações [94%(v/v) e 96%(v/v)] para a confirmação das ocorrências dos tratamentos anteriores.

A formação de acúmulo de partículas no pico de $19,76\mu\text{m}$, na terceira região, se iniciou na curva do álcool 86%(v/v). Observou-se que a desestabilização foi

retardada para as duas metodologias de observação: a avaliação ótica direta acusou coagulação no álcool 92%(v/v) e o microscópio digital (*ProScope*) acusou no álcool 88%(v/v).

Os resultados quantitativos no eixo Y sugeriram que existe um nível crítico de volume (%) de partículas acumuladas na posição 19,76 μ m que corresponde, no LS, ao ponto de aglomeração visível do *ProScope*. O nível crítico do tratamento com fosfato dissódico se situou entre 1,2% e 1,5% do volume (%) de partículas acumulado na posição 19,76 μ m.

Assim como no tratamento anterior (Citrato), desde o álcool 76%(v/v) a curva da segunda região de micropartículas diminuiu sua altura e alargou a base, ultrapassando o limite de 10 μ m, na direção da terceira região, mantendo um comportamento pré colapso semelhante durante 10 graduações alcoólicas, até o álcool 86%(v/v). O tratamento com leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico revelou uma alta resistência na formação da terceira região e conseqüentemente da desestabilização. Pode-se observar também, que a primeira região (micelas de caseína) se esvaziou após o colapso do sistema, no álcool 96%(v/v).

Na Tabela 8, têm-se os resultados estatísticos do LS com as análises da distribuição das micropartículas em volume (%) por tamanho (μ m).

Tabela 8: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho (< 0,5 μ m e >10 μ m), no leite pasteurizado adicionado de fosfato dissódico (Fosf) 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool.

Tratamentos	Médias (μ m)	Desvio padrão (μ m)	Distribuição das partículas (volume %)	
			<0,5 μ m	>10 μ m
Controle	3,206	1,596	9,91	0,00
Fosf 0	3,095	1,575	11,90	0,00
Fosf 76	3,781	2,303	12,20	1,01
Fosf 78	3,829	2,297	11,70	1,01
Fosf 80	3,760	2,268	12,50	0,84
Fosf 82	3,590	2,156	13,40	0,35
Fosf 84	3,814	2,362	13,20	1,14
Fosf 86	4,565	3,722	11,50	5,93
Fosf 88	5,414	5,059	11,40	10,70
Fosf 90	5,521	5,355	10,70	11,00
Fosf 92	7,594	8,215	8,74	20,10
Fosf 94	11,340	11,850	5,44	34,90
Fosf 96	20,640	19,950	1,89	55,70

Fonte: Software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER), modificado pelo autor (2016).

Observa-se uma maior homogeneidade tanto das médias quanto dos desvios padrão, até o álcool 84%(v/v). Após um sinal de início de desestabilização, ocorreu a formação de um segundo patamar de resistência à coagulação entre as graduações alcoólicas 86%(v/v) e 90%(v/v).

A partir do álcool 92%(v/v), tanto as médias quanto os desvios padrão crescem sugerindo aumento da desorganização do sistema, terminando no colapso das forças de repulsão formando as grandes estruturas de coagulado qualificadas no *ProScope* e quantificadas na terceira região (>10µm) pelo LS.

A análise da distribuição das partículas em duas regiões extremas (<0,5µm e >10µm) mostra uma alta estabilidade do tratamento leite/fosfato ao teste do álcool.

O primeiro sinal de movimentação consistente de partículas para a terceira região (>10µm) ocorreu no álcool 86%(v/v), 2 graus alcoólicos mais cedo que a microscopia ótica digital (*ProScope*) e 6 graus alcoólicos mais cedo que o método ótico direto.

6.7.2.4 Teste do álcool no leite com adição de LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)

Na Figura 19 estão representadas as curvas com a dinâmica da evolução dos tamanhos das micropartículas do leite pasteurizado, adicionado de 0,05%(m/v) de Mistura de sais LAC 8074-7 e submetido ao teste do álcool nas graduações entre 76%(v/v) e 96%(v/v) em intervalos de duas unidades percentuais.

A curva “Controle” se refere ao leite pasteurizado sem adição de sais e sem efeito de álcool. A curva “Mix 0%” se refere a este tratamento sem os efeitos do teste do álcool.

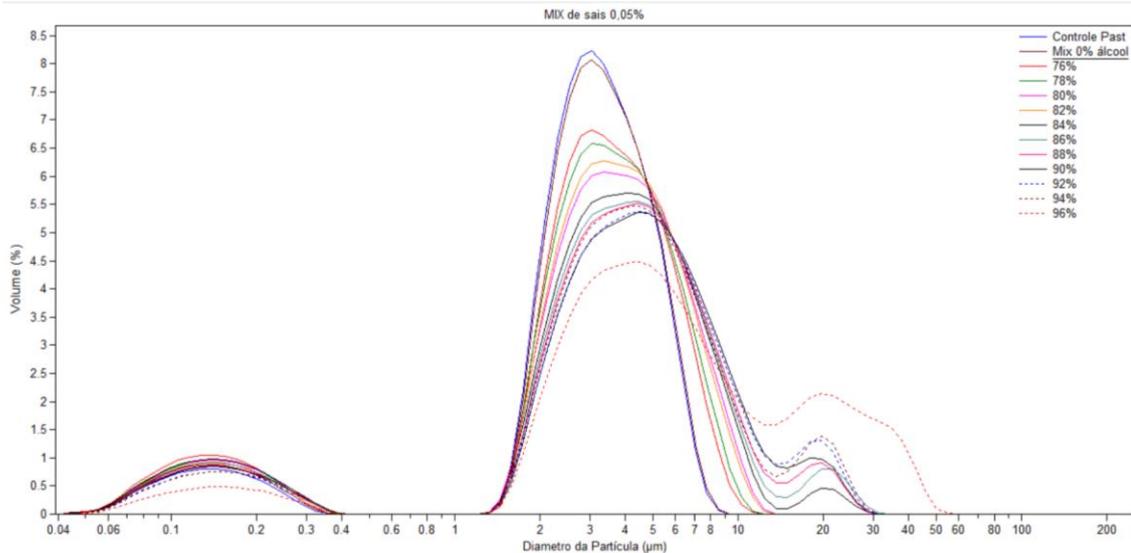


Figura 19: Curvas com a variação da distribuição das partículas por volume (%) em cada posição de tamanho (entre $0,04\mu\text{m}$ e $200\mu\text{m}$) para leite pasteurizado adicionado de Mix de sais LAC 8074-7 a $0,05\%$ (m/v) e submetido ao teste do álcool [76%(v/v) a 96%(v/v)].

Fonte: Curvas geradas pelo software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER, 2016).

Para o tratamento com Mix de sais LAC 8074-7, observou-se uma grande resistência à formação dos picos de acúmulo de partículas na região de $20\mu\text{m}$. A formação da terceira região só veio a surgir no álcool 84%(v/v), após uma série de 12 graus alcoólicos. Mais uma vez a coagulação pelas duas metodologias óticas só ocorreram após a formação da zona do pico de $19,76\mu\text{m}$.

A avaliação ótica direta acusou coagulação no álcool 96%(v/v) e o microscópio digital (*ProScope*) antecipou a visualização da coagulação para o álcool 94%(v/v). Mesmo após a submissão ao álcool 96%(v/v) a primeira região correspondente às micelas de caseína, não se esvaziou por completo.

Os resultados quantitativos no eixo Y do gráfico das curvas reforçam a suspeita de que existe um nível crítico de volume (%) de partículas acumuladas na posição próxima aos $20\mu\text{m}$ ($19,76\mu\text{m}$) que corresponde, no LS, ao ponto de coagulação visível do *ProScope*. O ponto crítico se situou, mais uma vez, entre 1,2% e 1,5% de volume (%) acumulado na posição de $19,76\mu\text{m}$.

O tratamento com leite pasteurizado adicionado do Mix LAC 8074-7 foi o que ofereceu a maior resistência à desestabilização ao teste do álcool e, conseqüentemente, foi o que revelou a mais alta resistência dentre os quatro tratamentos de sais na formação da terceira região, conforme pode-se observar na Tabela 9.

Tabela 9: Dados estatísticos e distribuição das micropartículas por volume (%) para duas faixas de tamanho ($< 0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$), no leite pasteurizado adicionado de mistura (Mix) de sais citrato/fosfato (LAC 8074-7) a 0,05%(m/v) e submetido ao teste do álcool.

Tratamentos	Médias (μm)	Desvio padrão (μm)	Distribuição das partículas (volume %)	
			$<0,5\mu\text{m}$	$>10\mu$
Controle	3,206	1,596	9,91	0,00
Mix 0	3,207	1,643	11,00	0,00
Mix 76	3,473	2,029	13,10	0,16
Mix 78	3,589	2,113	12,50	0,30
Mix 80	3,840	2,357	12,50	1,19
Mix 82	3,809	2,284	11,80	0,97
Mix 84	4,339	3,440	12,60	4,18
Mix 86	4,829	4,222	11,70	6,98
Mix 88	4,960	4,184	11,20	8,25
Mix 90	5,251	4,399	11,00	10,30
Mix 92	5,486	4,703	9,95	11,60
Mix 94	5,395	4,794	9,98	10,80
Mix 96	9,235	9,640	6,41	27,80

Fonte: Software do LS 13 320 (BECKMAN COULTER), modificado pelo autor (2016).

As alterações tanto das médias quanto dos desvios padrão ocorreram de maneira suave, refletindo uma maior resistência do sistema à desorganização. Até o álcool 94%(v/v) os registros da zona das micelas ($<0,5\mu\text{m}$) sugeriu não ter havido perda de volume (%) de micropartículas.

No tratamento mix de sais LAC 8074-7, a desorganização do sistema só veio a ocorrer no álcool 96%(v/v), sugerindo uma alta resistência ao colapso das forças de repulsão e consequente formação das estruturas de coagulado conforme observadas no *ProScope* e quantificadas pelo LS.

A análise da migração das partículas entre as duas regiões extremas ($<0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$) indica, para o tratamento mistura de sais LAC 8074-7, uma estabilidade maior do que os demais tratamentos.

Nos quatro tratamentos o LS foi fundamental para mostrar as diferenças de ação de cada combinação salina na estabilização do leite ao teste do álcool. Vislumbrou-se um grande potencial do método sugerido por este trabalho, para o desenvolvimento e seleção de sistemas de sais estabilizadores para a indústria do leite UHT.

Considerando que as dosagens das três combinações salinas foram idênticas (0,05%(m/v)), os dados extraídos do LS indicam que houve diferença na capacidade

de estabilização ao teste do álcool de cada sal ou combinação de sais. O sistema de sais LAC 8074-7 foi o tratamento que promoveu a maior estabilidade ao teste do álcool.

6.8 Análise de Correlação

Para a comparação dos dois testes qualitativos de visualização dos efeitos do teste do álcool, ótico direto e microscopia ótica digital, utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Pearson.

Comprovou-se haver coeficiente de correlação significativo (coeficiente 0,985 e $p < 0,01$) entre os resultados fornecidos pelos dois métodos de observação do teste do álcool, ótica direta e microscopia ótica digital (*ProScope*).

Os resultados obtidos pelo novo método (*ProScope*), com aumento de magnitude das visualizações em 200 vezes, apresentaram alta associação com a visualização da prova do álcool por ótica direta, para todos os quatro tratamentos.

6.9 Discussão consolidada das três metodologias

Com o objetivo de facilitar a comparação dos resultados obtidos nas três metodologias empregadas na visualização da desestabilização ao teste do álcool, na Figura 20, confrontou-se lado a lado os dois métodos qualitativos de visualização, ótica direta e microscopia ótica digital com objetiva de 200x (*ProScope*).

Os dados quantitativos coletados no medidor de partículas LS foram apresentados em paralelo para ilustrar as movimentações volumétricas entre cada concentração alcoólica nas regiões de partículas abaixo de $0,5\mu\text{m}$ e acima de $10\mu\text{m}$ (terceira região).

Os dados da avaliação da desestabilização do leite ao álcool para os quatro tratamentos e avaliados pelos três métodos propostos foram agrupados com o objetivo de facilitar a interpretação das paridades entre os métodos, na Figura 20.

A ação dos três sistemas de sais na estabilização ao teste do álcool ficou evidenciada, assim como a eficiência diferenciada de cada sistema salino em retardar a desestabilização.

O analisador de partículas LS quantificou os fenômenos dando o embasamento matemático necessário às conclusões relativas às observações visuais.

Grau Álcool	Leite Pasteurizado Sem adição de sais				Leite Pasteurizado Citrato de sódio 0,05% (v/v)				Leite Pasteurizado Fosfato dissódico 0,05% (v/v)				Leite Pasteurizado LAC 8074-7 mistura de sais 0,05% (v/v)			
	Visualização		LS		Visualização		LS		Visualização		LS		Visualização		LS	
	Ótica Direta	ProScope 200x	% de Volume < 0,5µm > 10µm		Ótica Direta	ProScope 200x	% de Volume < 0,5µm > 10µm		Ótica Direta	ProScope 200x	% de Volume < 0,5µm > 10µm		Ótica Direta	ProScope 200x	% de Volume < 0,5µm > 10µm	
Controle	-	-	9,91%	0,00%	-	-	10,80%	0,00%	-	-	11,90%	0,00%	-	-	11%	0,00%
72	-	-	13,90	0,03	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
74	-	-	12,40	0,16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
76	-	1	12,30	3,83	-	-	12,40	0,18	-	-	12,20	1,01	-	-	13,10	0,16
78	1-	1	10,80	12,60	-	-	8,37	0,94	-	-	11,70	1,01	-	-	12,50	0,30
80	1-	1	10,80	9,35	-	-	8,32	1,23	-	-	12,50	0,84	-	-	12,50	1,19
82	1	1+	10,20	21,00	-	-	12,90	0,31	-	-	13,40	0,35	-	-	11,80	0,97
84	1+	1+	8,43	23,10	-	-	7,89	0,90	-	-	13,20	1,14	-	-	12,60	4,18
86	1+	1++	8,75	27,40	-	1	12,10	3,41	-	-	11,50	5,93	-	-	11,70	6,98
88	1++	1+++	5,32	36,30	1	1+	10,60	8,89	-	1	11,40	10,70	-	-	11,20	8,25
90	1+++	1+++	1,27	54,20	1++	1++	9,56	20,10	-	1	10,70	11,00	-	-	11,00	10,30
92	x	x	x	x	1+++	1+++	4,62	25,80	1	1++	8,74	20,10	-	-	9,95	11,60
94	x	x	x	x	x	x	x	x	1+	1+++	1,89	55,70	-	1	9,98	10,80
96	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1	1+	6,41	27,80
99	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1++	1++	0,00	59,80

Figura 20: Registro de dados do teste do álcool aplicado aos quatro tratamentos de sais e avaliados por três diferentes métodos: visualização ótica direta, microscopia ótica digital (*ProScope*) com objetiva 200x e analisador de partículas LS avaliando volume (%) de partículas nas regiões <0,5µm e >10µm. Sendo que (x) significa não realizado, (-) significa realizado sem desestabilização aparente, (1-) significa dúvida, (1) significa ponto de coagulação e (1+, 1++, 1+++) significam visualizações crescentes e confirmativas da coagulação. No LS (Volume% >10µm), os valores em vermelho indicam a zona de resistência à desestabilização.

Fonte: Elaborado pelo autor, com base nos dados do experimento (2016).

Observou-se um aumento na amplitude da zona de resistência à desestabilização em ordem crescente citrato, fosfato, mix de sais. Este comportamento indicou melhora no processo de estabilização do leite para o processamento UHT.

Os gráficos da Figura 21 mostram o deslocamento das micropartículas do leite avaliados em duas zonas micrométricas ($<0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$) e quantificado pelo analisador de partículas - LS, em cada um dos quatro tratamentos salinos quando submetidos ao teste do álcool.

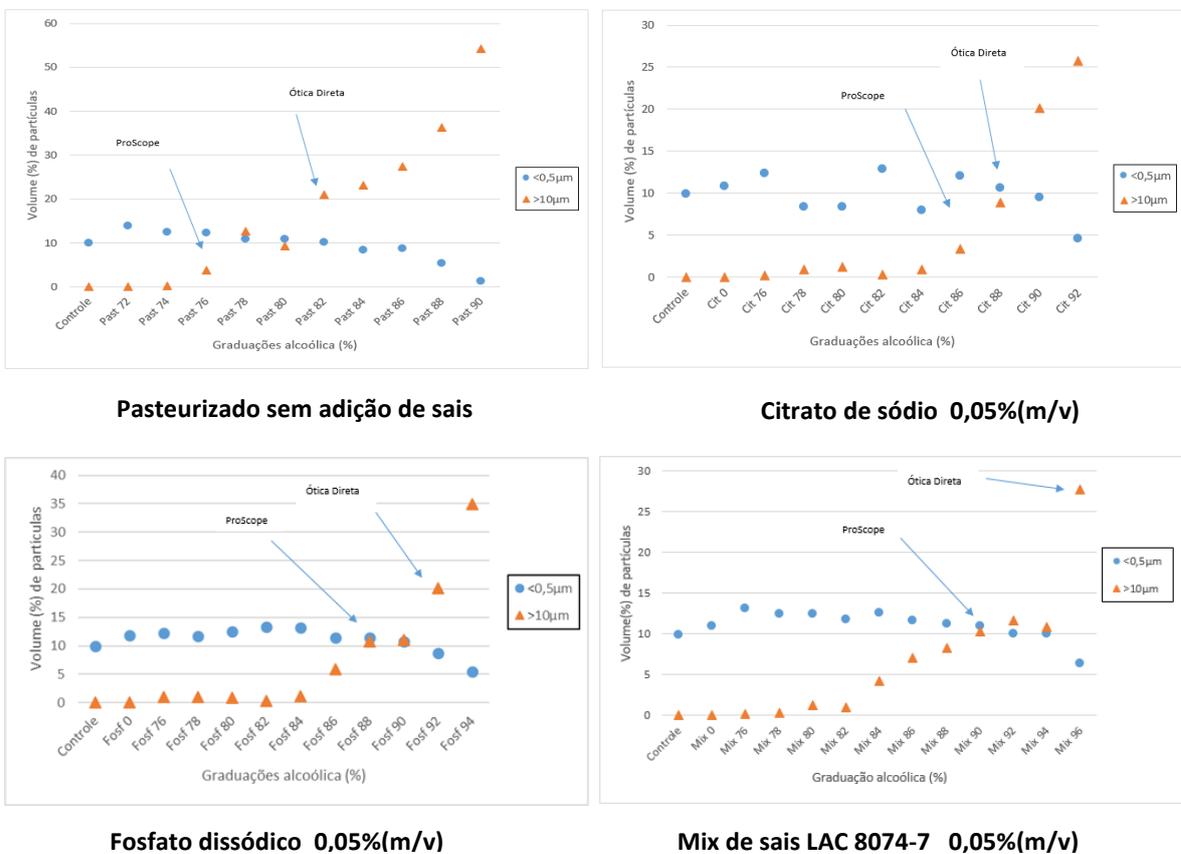


Figura 21: Dinâmica da evolução das micropartículas do leite pasteurizado quando submetido ao teste do álcool, em quatro condições salinas (sem adição de sais, com citrato de sódio 0,05%(m/v), com fosfato dissídico 0,05%(m/v) e com Mix de sais LAC 8074-7 a 0,05%(m/v)), avaliados em duas zonas micrométricas ($<0,5\mu\text{m}$ e $>10\mu\text{m}$) e quantificado pelo analisador de partículas - LS.

Fonte: Elaborado pelo autor, com base nos dados da pesquisa (2016).

Observou-se que, conforme cresce a graduação alcoólica, a região das micelas de caseína ($<0,5\mu\text{m}$) perde volume de partículas e a terceira região ($>10\mu\text{m}$), situada logo após a região dos glóbulos de gordura, inicialmente vazia,

ganha volume de partículas. O comportamento encontrado sugere movimentação característica da desestabilização ao álcool para cada tratamento salino. As marcações indicam as graduações alcoólicas aonde ocorreu coagulação tanto para os métodos de visualização por ótica direta quanto pela microscopia ótica digital (*ProScope*).

A fragilidade do leite pasteurizado sem adição de sais ao teste do álcool, ficou evidenciada pela baixa graduação alcoólica em que se deu a visualização do *ProScope* (76%(v/v)). A superioridade de sensibilidade de leitura da microscopia ótica digital se evidenciou quando comparada com a leitura da ótica direta que só ocorreu no álcool 82%(v/v). Já no medidor de partículas (LS), o deslocamento de volume (%) de micropartículas se deu de maneira inversa entre as duas regiões medidas, com esvaziamento gradativo da primeira região (micelas $<0,5\mu\text{m}$) e fortes ganhos de volume na terceira região (agregados $>10\mu\text{m}$). Notou-se que a coagulação visualizada nos testes óticos coincidiu com a zona de cruzamento entre as duas curvas do LS.

O comportamento do tratamento com citrato de sódio pareceu indicar uma maior resistência, apesar de irregular, à desestabilização diante das diferentes graduações do teste do álcool do que o “leite pasteurizado sem adição de sais”. A maior resistência ficou evidenciada pela graduação alcoólica mais alta em que se deu a visualização do *ProScope* (86%(v/v)) e pela leitura da ótica direta que ocorreu no álcool 88%(v/v). A análise do deslocamento de volume (%) de micropartículas pelo LS mostrou que o esvaziamento da primeira região ($<0,5\mu\text{m}$) só se definiu após o álcool 88%(v/v). Notou-se que, mais uma vez, a coagulação ocorreu na zona de cruzamento das duas curvas.

O comportamento do tratamento com fosfato dissódico indicou alta resistência ao teste do álcool e maior regularidade nas primeiras graduações alcoólicas até o álcool 86%(v/v). A maior resistência sobre os tratamentos anteriores ficou evidenciada pela graduação alcoólica em que se deu a visualização do *ProScope* (88%(v/v)) e pela leitura da visualização ótica direta que só ocorreu no álcool 92%(v/v). A análise do deslocamento de volume (%) de micropartículas pelo LS mostrou que o esvaziamento da primeira região ($<0,5\mu\text{m}$) só se definiu após o álcool 90%(v/v). Mais uma vez, a coagulação visualizada pelos testes óticos coincidiu com a zona de cruzamento das duas curvas.

O tratamento com a associação de sais citrato/fosfatos (LAC 8074-7) apresentou comportamento similar ao fosfato dissódico até o álcool 82%(v/v). Entre as graduações alcoólicas 84%(v/v) e 88%(v/v) observou-se surgimento de volume (%) de partículas crescente, gradual e ordenado na terceira região ($>10\mu\text{m}$), sem que se evidenciassem perdas de volumes na primeira região ($<0,5\mu\text{m}$). A maior resistência sobre os tratamentos anteriores ficou evidenciada pela alta graduação alcoólica em que se deu a visualização do *ProScope*, 94%(v/v) e, pela leitura da visualização ótica direta que só veio a ocorrer no álcool 96%(v/v). Observou-se a formação de um patamar de estabilidade entre as graduações alcoólicas 90%(v/v) e 94%(v/v) antecedendo ao colapso total no álcool 96%(v/v). A análise do deslocamento de volume (%) de micropartículas pelo LS mostrou que o esvaziamento da primeira região ($<0,5\mu\text{m}$) só se definiu no álcool 96%(v/v). Mais uma vez observou-se que as coagulações visualizadas pelos dois testes óticos coincidiram com a zona de cruzamento das duas curvas do LS.

O tratamento com a mistura de sais LAC 8074-7 foi o que conferiu ao leite pasteurizado integral a maior resistência à desestabilização ao teste do álcool.

7 CONCLUSÃO

Com base nas condições utilizadas neste trabalho e nos resultados obtidos, tem-se as conclusões apresentadas abaixo.

Diante do comportamento observado no teste do álcool, pôde-se constatar que a coagulação não ocorre de maneira abrupta e imediata, o que levou ao entendimento de que o processo de coagulação ao álcool ocorre de maneira paulatina. Assim sendo no caso de uso do teste do álcool como ferramenta de ajuste de balanço salino e liberação de lotes de leite para tratamento UHT, sugere-se o uso do termo Teste de Performance ao Etanol.

O *ProScope*, trouxe uma colaboração inédita para que o teste do álcool ou, teste de performance ao etanol, mantendo a sua simplicidade, seja capaz de ajudar na tomada de decisões de fábrica com melhor definição, segurança e registro.

Concluiu-se que o microscópio ótico digital *ProScope*, é um equipamento útil para a indústria de leite *UHT* com o objetivo de melhorar a capacidade de leitura das micropartículas do leite pasteurizado resultantes do teste de performance ao etanol. O experimento permitiu estabelecer alta correlação entre os dois métodos óticos avaliados, assim como inferir sobre o efeito da adição de sais no aumento da estabilidade ao álcool.

O *ProScope*, dotado de objetiva de 200x, permitiu atingir o objetivo de melhorar consideravelmente a capacidade de visualização e interpretação dos resultados do teste de performance ao etanol em amostras de leite pasteurizado destinado ao tratamento UHT. O novo método não só reduziu a subjetividade das leituras, mas gerou imagens de alta resolução das micropartículas o que permitirá a confecção de um padrão de imagem específico para cada tipo de produto final.

Considerando que se partiu de um tratamento controle, sem adição de sais, e que se utilizou uma dosagem fixa de 0,05%(m/v) de cada um dos sais nos outros três tratamentos, pode-se concluir que os resultados confirmaram o efeito e a especificidade de cada um dos sais na estabilidade do leite ao teste de performance ao etanol. E que, a mistura de sais estabilizadores citrato/fosfatos (LAC 8074-7) foi a que conferiu o maior grau de estabilidade ao leite pasteurizado diante do teste de performance ao etanol dentre os quatro tratamentos estudados.

Os resultados do LS não só acompanharam os efeitos dos outros dois métodos como quantificou e gerou gráficos explicativos que mostram as mínimas movimentações das partículas conforme se aumenta a graduação alcoólica.

A aplicação do *ProScope* na indústria, e o uso do LS na pesquisa acadêmica ou aplicada, mostraram-se adequados como metodologias para a tomada de decisão de ajustes finos na escolha e dosimetria de sais estabilizadores para a produção de leite UHT.

O teste do álcool associado ao *ProScope* e ao LS são ferramentas de primeira escolha para o desenvolvimento sistemático de novas combinações de sais estabilizadores.

8 INDICAÇÕES PARA FUTUROS ESFORÇOS

A praticidade e a acurácia do *ProScope* sugerem a criação de um padrão de imagem fixa para auxiliar os operadores de laboratório na decisão de liberação do leite destinado ao processamento UHT.

Criação de um protocolo de validação do *ProScope* para a utilização nas indústrias de leite UHT como metodologia oficial de leitura do teste de performance ao etanol com intuito de se identificar, com maior acuidade, o ponto de melhor ETL.

Como a acurácia de mensuração da desestabilização pelo álcool, pelo LS é muito grande, propõe-se, o estudo mais detalhado da movimentação de partículas nas quatro regiões, a saber:

- Primeira região (entre $0,04\mu\text{m}$ e $0,5\mu\text{m}$): registrou-se, para os quatro tratamentos, um aumento de volume ocupado pelas partículas da primeira região (micelas de caseína) logo após a adição das primeiras graduações alcoólicas. Ao se avançar nas graduações alcoólicas, o volume (%) das partículas desta região voltam a cair lentamente até que ocorra uma ruptura mais brusca que coincide com a visualização ótica direta da coagulação. Mesmo sabendo-se que se trata de uma distribuição percentual e que uma redução no volume (%) das partículas na região da gordura pode ocasionar um aumento de volume (%) numa outra região, cabe investigar a que se deve o incremento de volume na região das caseínas ao primeiro contato das micelas com o álcool.

- Região intermediária (entre $0,5\mu\text{m}$ e $1,5\mu\text{m}$): resta inexplicada a não formação de estruturas intermediárias entre as regiões das micelas e dos glóbulos de gordura. O fato parece indicar que as micelas não se associam em pequenos grupos, passando diretamente para agrupamentos 100 vezes maiores ($>10\mu\text{m}$).

- Segunda região (entre $1,5\mu\text{m}$ e $9,5\mu\text{m}$): Estudar o fenômeno que explica a perda de volume gradativo na região dos glóbulos de gordura diante do contato com as diversas concentrações alcoólicas. Ao contato com o álcool (solvente), os glóbulos poderiam se romper e coalescer formando estruturas maiores. Alternativamente, os glóbulos poderiam atuar como núcleos de desestabilização e serem carregados para a região de estruturas $>10\mu\text{m}$, pela formação de complexos gordura/proteínas. Em uma terceira hipótese os glóbulos poderiam simplesmente ser

carreados na malha formada pelas associações entre micelas. Cabe investigar a que se deve este surgimento de partículas de maior volume expressado pelo aumento na base da região da gordura ($>10\mu\text{m}$), desde o primeiro contato dos glóbulos de gordura com o álcool.

- Terceira região ($> 10\mu\text{m}$): A princípio se caracterizou como a região de agregados completamente desordenados gerados por aglutinação durante o processo de desestabilização ao álcool. No entanto, ficou inexplicado o porquê da formação, na terceira região, antes do colapso total das micropartículas ao álcool, de uma aparente organização em torno do tamanho $20\mu\text{m}$ (mais exatamente entre $16,40\mu\text{m}$ e $19,76\mu\text{m}$) para todos os tratamentos.

Apesar dos comportamentos bem diferentes em termos de estabilidade ao álcool, em todos os quatro tratamentos salinos, o ponto da desestabilização propriamente dito foi marcado pelo encontro de duas coordenadas no gráfico das curvas: no eixo Y (Volume (%)) a posição entre 1,2% e 1,5%; e no eixo X (diâmetro das partículas (μm)) a posição entre $16,40\mu\text{m}$ e $19,76\mu\text{m}$. Isso levanta a hipótese de que a desestabilização ao teste do álcool ocorre para todos os tratamentos, quando o volume acumulado de partículas de $20\mu\text{m}$ atinge um valor próximo de 1,5%.

O estudo mais aprofundado destas coordenadas pode ajudar a gerar no LS o conhecimento do ponto exato da coagulação observada visualmente nos testes óticos, melhorando ainda mais a acurácia do LS como ferramenta de estudo da ETL por meio do teste de performance ao etanol.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. **Influência da refrigeração sobre a qualidade físico-química e a aptidão do leite para processamento**: diagnóstico da qualidade do leite. Impacto para a indústria e a questão dos antibióticos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, Epamig/CT/ILCT, 2003.

ALLEN, T. **Particle Size Measurement**. 4th edition, London: Chapman and Hall, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA (ABLV). **Saúde e bem estar**. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/listcontentint.aspx?id=821&area=leibem&from=hom>>. Acesso em: 12 mai. 2016.

BARROS, L. Problemas de calidad de leche asociados a la alimentación. Estabilidad de la leche. Em: **Jornadas de la lechería**, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Uruguay, p 58-68, 2002.

BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Prácticas Veterinárias**, v. 9, p. 315-318, 1999.

BECKMAN COULTER Manual, **Coulter LS Series**, 2011, Softer Version 2.01, Miami, FL, EUA. Disponível em: <<http://www.beckmancoulter.com>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **RIISPOA Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Decreto no 30.691, de 29 de março de 1952. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.

_____. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). **DIÁRIO OFICIAL [DA] REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**. Brasília: Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.370, de 4 de setembro de 1997, 1997.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru e refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2002.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 de dezembro de 2006. Seção 1, p. 8.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.1-24.

BUENO, V. F. F. et al. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e o período do ano no Estado do Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. V. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

CHAVEZ, M. S., NEGRI, L. M., TAVERNA, M. A.; CUATRÍN, A. Bovine Milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, n. 71, p.201-206, 2004.

CHELINI, D.; COSTA, L.C.G. Implementação de métodos para estimativa de desnaturação de soro-proteínas em controle de qualidade de produtos lácteos. **Milkbizz Tecnologia**. Ano I. Número 1. Março – Abril, 2002.

DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; BELYAKOVA, L.E.; ANTIPOVA, A. S. Analyses of light scattering data on the calcium ion sensitive of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsions flocculation. **J. Colloid Interface Sci.**, San Diego, v. 239, n. 1, p. 87-97, 2001.

DONATELE, D. M.; VIEIRA, L. F. P.; FOLLY, M. M. Relação do teste de Alizarol a 72%(v/v) em leite “in natura” de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 7, n. 110, 2003.

FERRON-BAUMY, B.C; MAUBOIS, J.L; GARRIC, G; QUIBLIER, J.P. Coagulation présure du lait et des retentats d’ultrafiltration. **Effets des divers traitements thermiques**. Lait 71: 423-434. 1991.

FISCHER, V. et al., Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Rev. Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v.13, n.3, p.838-849 jul./set., 2012.

FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry: lactose, water, salts and vitamins**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1997, 536p.

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

FOX, P. F. **Food Chemistry**. Part. III. Cork University College, 201p, 1991.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. 1st ed. London: Thomson Science, 1998.

FOX, P.F.; MORRISSEY, P.A. Reviews of the progress of dairy science. The heat stability of milk. **J Dairy Res** 44: 627- 646, 1977.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reprod. Nutr. Dev.** V. 45, p. 473-483. 2005.

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.

HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 3613-3626, 1990.

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 273-284, 1981a.

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. II. The origin of the pH transition. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 285-291, 1981b.

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. IV. Effect of concentration. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 405-415, 1981c.

KRUIF, C.G. de; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. **Casein micelles and their internal structure**. *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172 (2012) 36–52. Available online 20 January 2012.

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.

MALVERN INSTRUMENTS. **Sample preparation and Physical Geology Laboratory**. Applying geosciences to Australia's most important challenges. Disponível em: <http://www.ga.gov.au/about/facilities/laboratories/palaeontology>>. Acesso em: 25 jun. 2016.

MANUAIS PROSCOPE HR. Disponível em: <<http://www.bodelin.com/proscope>>. Acesso em: 21 jul. 2016.

MATHIEV, J. Comportamiento físico-químico de la leche mantenida a baja temperatura. Española de Lactería, p. 33-37, jan/fev., 1985. In: SILVA, P. H. F; A

McMAHON, D. J. Letter to the editor. The dynamic casein supramolecule: A response to Horne (2010). **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 8, p. 3404, Aug. 2010. doi: 10.3168/jds.2010-3412

MILLER, P.G.; SOMMER, H.H. The coagulation temperature of milk as affected by pH, salts, evaporation and previous heat treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 23 p. 405-415, 1940.

MIMOUNI, A; DEETH, H. C; WHITAKER, A. K; GIDLEY, M. J; BHANDARI, B. R. (2009). Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. **Food Hydrocolloids**, 23(7), 1958-1965.

MOLINA, L. H. et al. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.2 2001.

NEGRI, L. M. **Estúdio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica**. 2002. 180f. Dissertação (Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos) – Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química. Rafaela, AR. 2002.

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

ORDOÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. v.1. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEREIRA, D. B. C., Efeito de dietas restritivas para bovinos sobre a composição e propriedades de processabilidade do leite. **Tese de Doutorado**, UFV. Viçosa: 2013.

PHILPOT, W.N; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Ed. Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002.

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

SAEG: sistema para análises estatísticas, versão 9.1. Viçosa: UFV, 2007.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p.111-119, 2004.

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

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade Térmica do Leite. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, 53 (304): 157 – 163,1998.

TOZZETTI, D. S. Prevenção, controle e tratamento das mastitis bovinas – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 10, 2008.

WALSTRA, P. et al. Dairy Technology: principles of Milk properties and processes. **Food Science and Technology**. Marcel Dekker, Inc. New York: Basel, 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984.

WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and Technology**. New York: 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – Especificação Técnica do citrato de sódio fornecido pela GLOBALFOOD



ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA

Produto	Cliente	Emissão	Revisão		Pág.
CITRATO DE SÓDIO		08/07/2016	nº	Data	1/2
Código do cliente: CITRATO DE SÓDIO			0	08/07/2016	

REGISTROS	
Ministério da Saúde / ANVISA	Isento de registro pela ANVISA, conforme Resolução nº 27 de 06.08.2010.
Ministério da Agricultura	Dispensado de AUP de acordo com a Instrução Normativa nº 49 de 14/09/2006.

CARACTERÍSTICAS GERAIS	
Descrição	Estabilizantes.
Aplicação	Produtos lácteos UHT*.
Composição	Estabilizante citrato de sódio.
Aspecto / Cor	Pó de cor branca, sendo que pequenas variações na cor podem ocorrer devido à origem das matérias primas utilizadas.
Solubilidade	Hidrata parcialmente em água fria e dissolve completamente acima de 65°C.

*Utilizar de acordo com os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade e com a Legislação vigentes.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Cinza	Mín. 95,0 %
Umidade	Máx. 5,0 %
Sódio	Máx. 25,0%

Status <i>GMO</i>	Não contém ingredientes transgênicos.
-------------------	---------------------------------------

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento. No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes da sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.



Produto	Cliente	Emissão	Revisão		Pág.
CITRATO DE SÓDIO		08/07/2016	nº	Data	1/2
Código do cliente: CITRATO DE SÓDIO			0	08/07/2016	

PRESENÇA DE ALERGÊNICOS*														
Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas	Crustáceos e derivados	Ovos e derivados	Peixes e derivados	Amendoim e derivados	Soja e derivados	Leite e derivados	Amêndoas e derivados	Avelãs e derivados	Castanhas, castanhas do Pará, castanhas de caju e derivados	Macadâmia e derivados	Pistaches e derivados	Nozes, Peças e derivados	Pinoli e derivados	Látex natural
não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não

* Resolução RDC nº 26 de 02/07/2015-ANVISA

PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS	
Análises	Valores
Contagem total	< 1,0 x 10 ⁴ UFC/g
Coliformes a 35°C	< 1,0 x 10 ² NMP/g
Coliformes a 45°C	< 3,0 NMP/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g
Bolores e Leveduras	< 2,0 x 10 ³ UFC/g

EMBALAGEM		Saco Kraft branco revestido com polietileno contendo 25 kg. <i>Nota: Ajude o meio ambiente. Destine a embalagem vazia à reciclagem.</i>
ARMAZENAGEM	Local seco e fresco.	
VALIDADE	06 (seis) meses na embalagem original fechada.	

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento. No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes da sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.

ANEXO B – Especificação Técnica do fosfato dissódico fornecido pela GLOBALFOOD



ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA

Produto	Cliente	Emissão	Revisão		Pág.
FOSFATO DISSÓDICO		08/07/2016	nº	Data	1/2
Código do cliente: FOSFATO DISSÓDICO			0	08/07/2016	

REGISTROS	
Ministério da Saúde / ANVISA	Isto de registro pela ANVISA, conforme Resolução nº 27 de 06.08.2010.
Ministério da Agricultura	Dispensado de AUP de acordo com a Instrução Normativa nº 49 de 14/09/2006.

CARACTERÍSTICAS GERAIS	
Descrição	Estabilizantes.
Aplicação	Produtos lácteos UHT*.
Composição	Estabilizante citrato de sódio.
Aspecto / Cor	Pó de cor branca, sendo que pequenas variações na cor podem ocorrer devido à origem das matérias primas utilizadas.
Solubilidade	Hidrata parcialmente em água fria e dissolve completamente acima de 65°C.

*Utilizar de acordo com os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade e com a Legislação vigentes.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Cinza	Mín. 95,0 %
Umidade	Máx. 5,0 %
P ₂ O ₅	Máx. 50,0%
Sódio	Máx. 34,0%

Status GMO	Não contém ingredientes transgênicos.
-------------------	---------------------------------------

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento. No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes da sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.



Produto	Cliente	Emissão	Revisão	Pág.
FOSFATO DISSÓDICO		08/07/2016	nº 0	Data 08/07/2016
Código do cliente: FOSFATO DISSÓDICO				1/2

PRESENÇA DE ALERGÊNICOS*														
Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas	Crustáceos e derivados	Ovos e derivados	Peixes e derivados	Amendoim e derivados	Soja e derivados	Leite e derivados	Amêndoas e derivados	Avelãs e derivados	Castanhas, castanhas do Pará, castanha s de caju e derivados.	Macedônia e derivados	Pistaches e derivados	Nozes, Pecãs e derivados	Pinoli e derivados	Látex natural
não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não

* Resolução RDC nº 26 de 02/07/2015-ANVISA

PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS	
Análises	Valores
Contagem total	< 1,0 x 10 ⁴ UFC/g
Coliformes a 35°C	< 1,0 x 10 ² NMP/g
Coliformes a 45°C	< 3,0 NMP/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g
Bolores e Leveduras	< 2,0 x 10 ³ UFC/g

EMBALAGEM	 Saco Kraft branco revestido com polietileno contendo 25 kg. <i>Nota: Ajude o meio ambiente. Destine a embalagem vazia à reciclagem.</i>
ARMAZENAGEM	Local seco e fresco.
VALIDADE	06 (seis) meses na embalagem original fechada.

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes da sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.

ANEXO C – Especificação Técnica do mix de sais LAC 8074-7 fornecido pela GLOBALFOOD



ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA

Produto	Cliente	Emissão	Revisão		Pág.
GLOBALSYSTEM LAC 8074		08/08/2011	nº	Data	1/2
Código do cliente: LAC 8074-7			14	08/07/2016	

REGISTROS	
Ministério da Saúde / ANVISA	Isento de registro pela ANVISA, conforme Resolução nº 27 de 06.08.2010.
Ministério da Agricultura	Dispensado de AUP de acordo com a Instrução Normativa nº 49 de 14/09/2006.

CARACTERÍSTICAS GERAIS	
Descrição	Mistura de estabilizantes.
Aplicação	Produtos lácteos UHT*.
Composição	Estabilizante fosfato trissódico, fosfato dissódico e citrato de sódio.
Aspecto / Cor	Pó de cor branca, sendo que pequenas variações na cor podem ocorrer devido à origem das matérias primas utilizadas.
Solubilidade	Hidrata parcialmente em água fria e dissolve completamente acima de 65°C.

*Utilizar de acordo com os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade e com a Legislação vigentes.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Cinza	Mín. 90,0 %
Umidade	Máx. 5,0 %
P ₂ O ₅	Máx. 43,0%
Sódio	Máx. 39,0%

Status GMO	Não contém ingredientes transgênicos.
-------------------	---------------------------------------

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento. No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes de sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.



Produto	Cliente	Emissão	Revisão	Pág.
GLOBALSYSTEM LAC 8074		08/08/2011	nº 14	Data 08/07/2016
Código do cliente: LAC 8074-7				2/2

PRESEÇA DE ALERGÊNICOS*															
Trigo, centeio, cevada, aveia e suas estirpes hibridizadas	Crustáceos e derivados	Ovos e derivados	Peixes e derivados	Amendoim e derivados	Soja e derivados	Leite e derivados	Amêndoas e derivados	Avelãs e derivados	Castanhas, castanhas do Pará, castanha s de caju e derivados.	Macadâmia e derivados	Pistaches e derivados	Nozes, Pecãs e derivados	Pinoli e derivados	Látex natural	
não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não	não

* Resolução RDC nº 26 de 02/07/2015-ANVISA

PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS	
Análises	Valores
Contagem total	< 1,0 x 10 ⁴ UFC/g
Coliformes a 35°C	< 1,0 x 10 ² NMP/g
Coliformes a 45°C	< 3,0 NMP/g
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25 g
Bolores e Leveduras	< 2,0 x 10 ³ UFC/g

EMBALAGEM		Saco Kraft branco revestido com polietileno contendo 25 kg. <i>Nota: Ajude o meio ambiente. Destine a embalagem vazia à reciclagem.</i>
ARMAZENAGEM	Local seco e fresco.	
VALIDADE	06 (seis) meses na embalagem original fechada.	

Todas as referências tecnológicas estão de acordo com nosso melhor conhecimento. No entanto é indispensável a elaboração de testes e a verificação das características de nossos produtos antes da sua efetiva utilização para determinar sua adaptação às condições tecnológicas individuais de cada empresa.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTO ANALÍTICO PADRÃO

Procedimento Analítico Padrão - Teste de Performance ao Etanol

COSTA, Claudio H. F. da. **Avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool visando processamento UHT**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

OBJETIVO

Apresentação dos procedimentos para uso do Microscópio Ótico Digital *ProScope* com a finalidade de realizar o teste de performance ao etanol aumentando a qualidade da visualização do ponto de coagulação do leite pasteurizado.

APLICAÇÃO

Metodologia auxiliar para aumentar a qualidade da decisão na liberação de lotes de leite para o processamento nas indústrias de leite UHT.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O leite deve ser pasteurizado (75°C/20s) e resfriado (entre 4°C e 6°C), podendo ser adicionado ou não de sais estabilizadores, segundo o padrão de estabilização adotado por cada indústria.

FUNDAMENTO DO MÉTODO

A prova do álcool mede a estabilidade do leite à coagulação quando misturado em partes iguais com diferentes graduações alcoólicas. O *ProScope* é um método auxiliar na visualização do teste do álcool em placas de Petri, como praticado hoje nas indústrias. Uma parcela do resultado do teste do álcool é submetida a uma análise aumentada de 200x com o microscópio ótico digital (*ProScope*). As imagens assim aumentadas são digitalizadas, capturadas (fotos e/ou vídeos) e armazenadas.

MATERIAL

Além dos materiais já utilizados pela metodologia de visualização ótica direta em placa de Petri como: diluições alcoólicas de 76%(v/v) a 84%(v/v); placas de Petri e pipetas graduadas; serão utilizados:

- ✓ Micropipetador e ponteiras (Volume de 10 μ L - microlitros),
- ✓ Conjunto lâmina/lamínulas de microscopia,
- ✓ Microscópio Ótico Digital (*ProScope*),
- ✓ Lente (200x),
- ✓ Base de fixação sobre a bancada.

As graduações alcoólicas devem ser calibradas com rigor uma vez que a sensibilidade do teste é muito alta.

MARCHA ANALÍTICA

Pipetar 2mL do leite a ser analisado na placa de Petri; pipetar 2mL do álcool 80%(v/v) (ou outra graduação que se queira analisar) sobre o leite e fazer o teste de performance ao etanol padrão. Imediatamente após, com auxílio do micropipetador e uma ponteira de 10 μ L, retirar uma fração de 10 μ L da solução resultante do teste de performance ao etanol e depositar na lâmina de microscopia; cobrir com a lamínula e levar diante da objetiva do *ProScope* fixado na base própria e, com a objetiva (200x) virada para cima.

Graças ao Software de digitalização do (*ProScope*), as imagens serão visualizadas diretamente na tela de um computador ou *tablet*, aumentadas em 200x. Mover lentamente o conjunto lâmina/lamínula com a amostra sobre a objetiva de maneira a explorar o campo de visão. Selecionar o campo e capturar as imagens.

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.

EXPRESSÃO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

A visualização, com ampliação de 200x, das micropartículas é muito nítida e não deixa dúvidas sobre o grau de estabilidade das amostras. As imagens são capturadas e armazenadas num arquivo específico conforme os procedimentos de qualidade adotados pela empresa. Sugere-se a geração de um banco de imagens próprio que sirva de base de decisão para os ajustes salinos e para a decisão de liberação de cada lote para o processamento UHT. A Figura 1 abaixo, ilustra em imagens os resultados do *ProScope* para três situações de estabilidade do leite pasteurizado ao álcool.

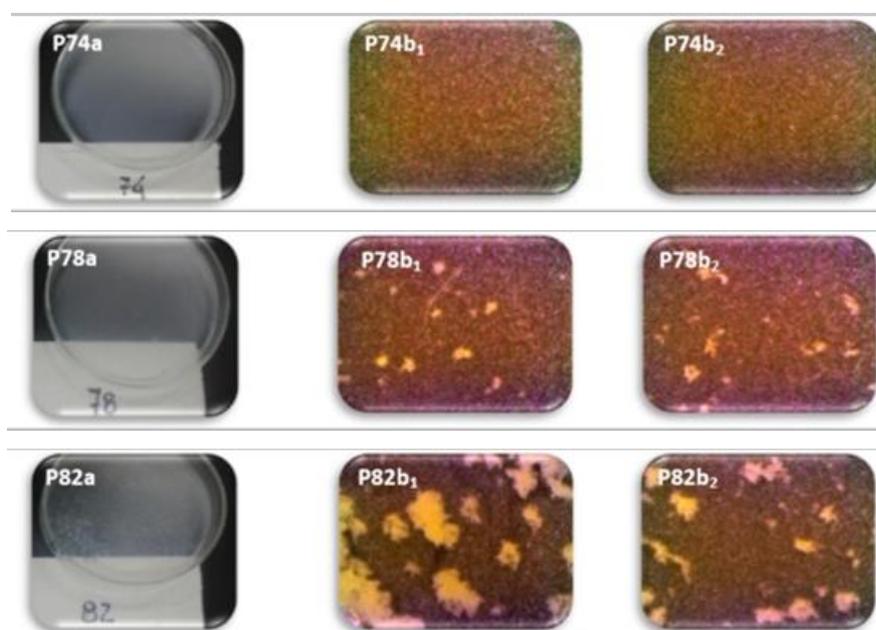


Figura 1: Aspectos das imagens do leite pasteurizado em três momentos: antes da coagulação ao álcool (74%(v/v)), nos primeiros sinais de coagulação (78%(v/v)) e coagulado no álcool 82%(v/v).

Fonte: Adaptado pelo autor do programa de imagens do *ProScope* (2016).

A alta sensibilidade do *ProScope* permite visualizar a frio, antes da decisão de liberação dos lotes para o processamento UHT, os efeitos de mínimos ajustes salinos sobre a estabilidade do leite ao álcool.