

Universidade Federal de Juiz de Fora
Faculdade de Farmácia e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do
Leite e Derivados

Luiz Paulo Magri

**QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL E pH UTILIZANDO
TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA COMO INDICADOR DE QUALIDADE
DO LEITE BOVINO**

Juiz de Fora

2015

Luiz Paulo Magri

QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL E pH UTILIZANDO
TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA COMO INDICADOR DE QUALIDADE
DO LEITE BOVINO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Juiz de Fora como parte das exigências para obtenção do título de *Mestre em Ciência e Tecnologia em Leite e Derivados*.

Orientador: Prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientador: Dr. Roney Alves da Rocha

Juiz de Fora

2015

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

Magri, Luiz Paulo.

QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL E pH UTILIZANDO TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE BOVINO / Luiz Paulo Magri. -- 2015.
78 f. : il.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Coorientador: Roney Alves da Rocha

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, 2015.

1. Acidez. 2. analisador automático. 3. qualidade. 4. alizarol. I. Anjos, Virgílio de Carvalho dos, orient. II. Rocha, Roney Alves da, coorient. III. Título.

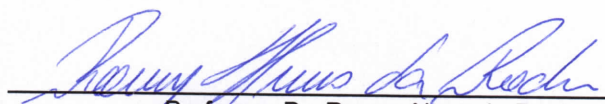
**QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL E pH UTILIZANDO TÉCNICA
POTENCIOMÉTRICA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE BOVINO**

Luiz Paulo Magri

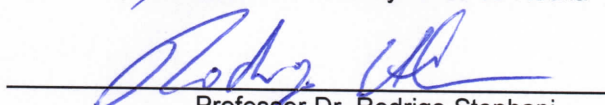
ORIENTADOR (A): Professor Dr. Virgilio de Carvalho dos Anjos

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

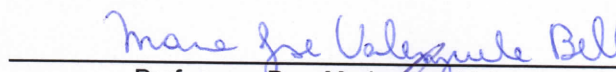
Aprovada em 30/07/2015



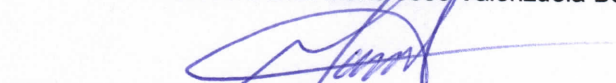
Professor Dr. Roney Alves da Rocha



Professor Dr. Rodrigo Stephani



Professora Dra. Maria José Valenzuela Bell



Professor Dr. Marco Antônio Moreira Furtado



Professor Dr. Virgilio de Carvalho dos Anjos

Dedico este trabalho à minha esposa, Vera Lucia, e às minhas filhas, Júlia e Luiza.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Departamento de Física e ao Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) pela oportunidade de fazer o curso de pós-graduação no programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia em Leite e Derivados.

À *FAPEMIG* pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, prof. Dr. Virgílio de Carvalho dos Anjos pelo incentivo, suporte e compreensão no pouco tempo que lhe coube.

Ao meu coorientador, Dr. Roney Alves da Rocha, pelas ideias, pelo desprendimento e paciência. Ao Geraldo Henriques e Mariana Brandão pela inestimável ajuda. Aos amigos do LEM.

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar possibilidades para sua produção ou sua construção. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.

Paulo Freire

RESUMO

Neste trabalho desenvolveu-se uma metodologia capaz de medir a acidez titulável do leite de vaca de modo preciso e prático. Dentre as características do método proposto e do circuito eletrônico associado a este, está a rapidez da análise, baixo consumo de energia, precisão numérica dos resultados, portabilidade, robustez para trabalho em campo e capacidade de armazenamento de dados (memória interna). Por meio de uma conexão USB, o equipamento proposto é capaz de medir, exportar dados e exibir simultaneamente os valores de acidez titulável (em °D), pH, temperatura, data e hora da análise, podendo ser considerado um importante instrumento analítico para monitoramento da qualidade do leite no momento de sua coleta na propriedade rural. Em termos comparativos, o equipamento proposto se diferencia do tradicional teste de alizarol pelo fato de fornecer um resultado numérico comparável aos resultados obtidos com a metodologia analítica de referência, que é a análise de acidez titulável em °D, feita em laboratório e com vidraria apropriada.

Palavras-chave: Acidez, analisador automático, qualidade, alizarol.

ABSTRACT

In this work we developed a methodology capable of measuring the acidity of cow's milk in an accurate and practical way. Among the features of the proposed method and of the electronic circuit associated with it is the speed of analysis, low consumption energy, numerical precision of the results, portability, robustness at fieldwork and data storage capacity (internal memory). By means of an USB connection, the proposed equipment is capable of measuring the acidity values (in oD), pH, temperature, date and time of the analysis. In this way, it can be considered an important analytical instrument for monitoring the quality of milk at the time of collection on the farm. The proposed equipment is different from the traditional alizarol test by the fact that it provides a numeric result comparable to analytical measurements obtained with the reference method, which is the titratable acidity analysis in oD, made in the laboratory and with proper glassware.

Keywords: Acidity, Automatic analyzer, Quality control, Alizarol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vistas em corte de um úbere bovino	23
Figura 2 – Concentração de álcool no alizarol	33
Figura 3 – Escala de pH	38
Figura 4 – Diagrama esquemático de uma célula eletrolítica.	39
Figura 5 – Diagrama esquemático de uma célula galvânica.	40
Figura 6 – Diagrama esquemático de um eletrodo de hidrogênio.	43
Figura 7 – Diagrama esquemático de um eletrodo de calomelano.	44
Figura 8 – Diagrama do método clássico do circuito com potenciômetro	45
Figura 9 – Curva de titulação	46
Figura 10 – Primeira derivada	47
Figura 11 – Eletrodo de vidro	48
Figura 12 – Eletrodo combinado de pH	49
Figura 13 – (a) Eletrodo íon seletivo, (b) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de primeira ordem, (c) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de segunda ordem e (d) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de terceira ordem.	51
Figura 14 – Amplificador com fonte	55
Figura 15 – Diagrama esquemático mostrando as grandezas físicas avaliadas nos experimentos exploratórios na busca de um modelo capaz de prever o pH e a acidez do leite.	57
Figura 16 – Montagem para titulação.	58
Figura 17 – Padrões de dispersão	61
Figura 18 – Acidez titulável (Dornic) x Quantidade de ácido láctico (uL)	64
Figura 19 – Diagrama elétrico do circuito amplificador.	65
Figura 20 – Gráfico de regressão entre as variáveis Tensão em mV e quantidade de ácido láctico	66
Figura 21 – Becker	67
Figura 22 – Gráfico de regressão entre as variáveis pH e quantidade ácido láctico (uL)	67
Figura 23 – Gráfico de regressão entre as variáveis acidez titulável (Dornic) x pH	69
Figura 24 – Gráfico de regressão entre as variáveis acidez e temperatura	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição média do leite de vaca	24
Tabela 2 – Alterações do leite ocasionadas por micro-organismos	30
Tabela 3 – Valores maximos de CTB e CCS e datas limites adotadas pela IN62.	31
Tabela 4 – Relação entre percentual de etanol e incidência de LINA	33
Tabela 5 – Tabela de adulterantes e componentes químicos reportados na literatura como sendo frequentemente adicionados ao leite para promover a sua fraude econômica.	34
Tabela 6 – Potencial do eletrodo padrão com pH 7.0.	42
Tabela 7 – Tabela eletrodo íon-seletivo	50
Tabela 8 – Resultado das medidas de gordura, proteína, lactose e sólidos totais para o leite utilizado nos experimentos.	58
Tabela 9 – Tabela de correlação entre pH e acidez titulável	63
Tabela 10 – Volume de ácido láctico adicionado aos béquers no experimento realizado para avaliar a correlação entre tensão (em milivolts) no eletrodo de pH e diferentes quantidades de ácido láctico adicionadas ao leite.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
LINA	Leite instável não ácido
LIA	Leite instável ácido
SILA	Síndrome do leite anormal
mV	Tensão elétrica em milivolts
pH	Potencial de íons de hidrogênio em solução
mA	Corrente elétrica, em miliampères
AmpOp	Amplificador operacional
G	Ganho do amplificador operacional
USB	Barramento Universal Serial
ml	Unidade de volume em mililitros
μL	Unidade de volume em microlitros
ANOVA	Análise de variância
CCS	Contagem de células somáticas
CTB	Contagem total de bactérias
CPU	Unidade central de processamento
I/O	Entrada / Saída
LCD	Visor de cristal líquido
kPa	Quilo pascal
log	Operador da função logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria e Qualidade do Leite
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle e Qualidade do Leite

SIF	Serviço de Inspeção Federal
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
P.A.	Pró-análise
PC	Computador pessoal
RISC	Conjunto de Instruções reduzidas
CISC	Conjunto Complexo de Instruções
ALU	Unidade lógica e Aritmética
SRAM	Memória Estática de Acesso Randômico
EEPROM	Memória Apenas de Leitura Programável e Apagável Eletricamente
PWM	Modulação por Largura de Pulso
ADC	Conversor Analógico Digital
UART	Transmissor/Receptor Universal Síncrono e Assíncrono
TWI	Interface a Dois Fios
SPI	Interface Periférica Serial
CCP	Carbonato de Cálcio Precipitado
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CBCL	Confederação Brasileira de Cooperativas de Laticínios
OCB	Organização das Cooperativas Brasileiras
BNC	Bayonet Neil Concelman
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

LISTA DE SÍMBOLOS

Ω	Valor nominal da resistência elétrica, em ohms
r^2	Coefficiente de determinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	O LEITE	18
3.1.1	Aspectos gerais	18
3.1.2	Legislação e mercado	20
3.1.3	Composição, características nutricionais e tecnológicas	22
3.1.3.1	<i>Importância nutricional</i>	22
3.1.3.2	<i>Composição</i>	23
3.1.3.3	<i>Contaminação microbiana e a acidez do leite.</i>	29
3.1.3.4	<i>Mastite</i>	31
3.1.3.5	<i>Efeito do etanol sobre a estabilidade do leite</i>	32
3.1.4	A fraude econômica do leite	34
3.2	A ACIDEZ DO LEITE	35
3.3	MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS E O ELETRODO DE pH	37
3.3.1	O pH	37
3.3.2	Medida de pH	38
3.3.3	Métodos eletro analíticos	39
3.3.4	Medição do pH	47
3.3.5	Eletrodos de íons seletivos	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	MATERIAIS	53
4.1.1	Matéria-prima (leite)	53
4.1.2	Vidrarias	53
4.1.3	Reagentes	53
4.1.4	Equipamentos	54
4.1.4.1	<i>Equipamentos analíticos</i>	54
4.1.4.2	<i>Equipamentos eletrônicos e de medição</i>	54
4.1.5	Componentes eletrônicos	54
4.2	MÉTODOS	54
4.2.1	Descrição e funcionamento do circuito eletrônico	54

4.2.2	Pesquisa exploratória (<i>screening</i>)	56
4.2.3	Análise de qualidade da matéria-prima (leite)	57
4.2.4	Análise estatística dos resultados	59
4.2.5	Definição da faixa operacional de acidificação do leite	61
4.2.6	Coleta de dados e construção dos modelos de calibração	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	RESULTADO ÀS ANÁLISES EXPLORATÓRIAS (<i>screening</i>)	63
5.2	RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO	63
5.2.1	Regressão entre quantidade de ácido láctico adicionado ao leite e tensão (mV) no eletrodo	63
5.2.1.1	Experimento para determinar as quantidades de ácido láctico a serem adicionadas ao leite a fim de simular sua acidificação natural	63
5.2.1.2	Análise da correlação entre tensão no eletrodo de pH e quantidade de ácido adicionado ao leite	64
5.2.2	Regressão entre quantidade de ácido láctico adicionado ao leite vs. pH	66
5.2.3	Regressão entre pH e acidez titulável(°D)	68
5.2.4	Análise do efeito da temperatura sobre a acidez titulável (°D)	69
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

As empresas de processamento de leite, cada vez mais, cobram do produtor uma qualidade maior pelo seu produto. Essas empresas tem um plano de remuneração pelo leite fornecido pelas fazendas, pagando mais por um produto com menor índice de contaminação (Contagem Total de Bactérias (CTB) e Contagem de Células Somáticas (CCS)). Além do controle sanitário, é comum haver uma remuneração diferenciada, valorizando os maiores percentuais de gordura e de proteína. Da mesma forma, o leite que possui baixa estabilidade térmica (recusado no teste do alizarol, vide seção 3.2) não será remunerado pela empresa, ocasionando uma perda de receita para o produtor e de matéria-prima para o laticínio. Desta forma, tanto para produzir o leite fluido quanto para produzir os derivados lácteos com qualidade e maior segurança alimentar para o consumidor, é importante que o setor produtivo e as indústrias de processamento tenham conhecimento da composição, grau de contaminação e estabilidade do leite. Estes aspectos são importantes no destino da matéria-prima e processamento mais adequado, evitando problemas durante a industrialização e armazenamento dos derivados lácteos.

Quando o leite é coletado nas fazendas, em latões ou em tanques de expansão, é realizado um teste pelo próprio caminhoneiro, que define se o mesmo está em um nível de acidez que permita o seu aproveitamento pela indústria. O teste do alizarol (álcool + alizarina) permite uma avaliação rápida do leite. Entretanto, as análises de laboratório tem identificado que este teste apresenta um alto índice de falso-positivo, isto é, informa que o leite está ácido mesmo que este não esteja. Esta característica do leite recebe no Brasil o nome de Leite Instável Não Ácido (LINA). Não foi possível localizar em órgãos oficiais ou em trabalhos acadêmicos uma estimativa da ocorrência de LINA em todo o território brasileiro. No entanto, a potencialidade de seu impacto na atividade leiteira, foi decisiva para que fosse feita a opção pelo tema.

O leite com LINA pode ser utilizado normalmente pela indústria, pois, ao contrário do leite ácido, ele apresenta estabilidade térmica. Para comprovarmos a acidez do leite de maneira inequívoca e descartarmos a possibilidade de LINA, podemos realizar duas verificações. Na primeira, através de um teste simples, submetemos uma amostra de leite à fervura e quando este não coagula (talha), comprovamos que o mesmo não está ácido. Na segunda, o método utilizado necessita de um profissional treinado, pois utiliza um acidímetro Dornic onde a acidez titulável do leite é medida. Se a mesma estiver entre (14 e 18) °D, este será considerado normal. Com base nos dados levantados, existe um grande volume de leite sendo descartado sem que haja um real motivo para isso. Os dados mais consistentes encontram-se no sul do Brasil e foram os maiores motivadores deste trabalho.

- Na bacia leiteira de Panambi, RS, a prevalência do LINA, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003, foi de 55% (2.396 amostras avaliadas), com 37% de amostras

normais, 6% de alcalinas e 2% de ácidas [16].

- Em pesquisa realizada na região oeste do Paraná, das 69 amostras analisadas, 68,11% apresentaram anormalidade quanto o quesito acidez, sendo 23 amostras LINA (33%), 16 alcalinas e 8 amostras de caráter ácido, todas classificadas nos parâmetros citados no trabalho [25] .
- No Sul do Brasil, na bacia leiteira de Pelotas, RS, durante 36 meses, foram analisadas 18.662 amostras de leite, sendo 8.230 (44,1%) positivas ao LINA. A sua prevalência apresentou valor máximo em março de 2004, com mais de 82% e mínimo em janeiro de 2004, com 33%, com uma amplitude de 49 unidades percentuais [26].

Este trabalho desenvolveu um método que torna possível uma identificação rápida, barata e bem precisa do leite ácido, possibilitando a redução das perdas de matéria-prima pelos laticínios e o aumento de receita do produtor rural.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste projeto foi desenvolver uma metodologia (equipamento) que permitisse a identificação inequívoca de um leite de vaca quando este estivesse com a acidez fora dos parâmetros (14 a 18) °D e, como consequência, garantir a condição de estabilidade térmica do leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Devido às características peculiares deste projeto, os critérios que nortearam seu desenvolvimento levaram em conta:

- Índice de assertividade na identificação do leite ácido muito superior ao teste do alizarol que, em alguns casos (>30%), relaciona o LINA como leite ácido;
- Equipamento robusto, de fácil transporte (de mão) e autônomo, podendo ser utilizado com bateria própria ou veicular;
- Baixo custo de operação, não necessitando de reagentes, mas somente de um recipiente descartável para acomodar a amostra e água destilada;
- Operação fácil, intuitiva e rápida, possibilitando seu uso e interpretação de resultados por pessoal não técnico.
- Capacidade de armazenar as análises realizadas durante uma semana de coleta e descarregar os dados em um PC ao final do período de coleta.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O LEITE

3.1.1 Aspectos gerais

Do ponto de vista químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, gorduras, proteínas, sais minerais, vitaminas, enzimas, etc.), das quais algumas estão em emulsão, que são as gorduras e as substâncias associadas, algumas em suspensão em estado coloidal como as caseínas ligadas a sais minerais e outras em solução verdadeira tais como lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc. De acordo com a IN51 de 18 de setembro de 2002, o leite pasteurizado é classificado como tipo A, B e C [1]. Esta classificação, determinada pelo Ministério da Agricultura, diz respeito ao grau de higiene na ordenha, no resfriamento, no acondicionamento e no transporte do leite. Entende-se por Leite Pasteurizado tipo A o leite classificado quanto ao teor de gordura integral (não inferior a 3 %), produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado Granja Leiteira (oriundo de um único rebanho). A expedição do Leite Pasteurizado tipo A deve ser conduzida sob temperatura máxima de 4 °C, mediante seu acondicionamento adequado e levado ao comércio distribuidor através de veículos com carroçarias providas de isolamento térmico e dotadas de unidade frigorífica, para alcançar os pontos de venda com temperatura não superior a 7 °C, com, no máximo, 500 bactérias por mililitro.

Entende-se por Leite Cru Refrigerado tipo B o produto definido como integral quanto ao teor de gordura, refrigerado em propriedade rural produtora de leite e nela mantido pelo período máximo de 48h, em temperatura igual ou inferior a 4 °C, que deve ser atingida no máximo 3h após o término da ordenha, transportado para estabelecimento industrial para ser processado, onde deve apresentar, no momento do seu recebimento, temperatura igual ou inferior a 7 °C e com no máximo 40.000 bactérias por mililitro [1]. Quanto ao leite cru tipo C, entende-se como produto não submetido a qualquer tipo de tratamento térmico na fazenda leiteira onde foi produzido e integral quanto ao teor de gordura, transportado em vasilhame adequado e individual de capacidade até 50 l (cinquenta litros) e entregue até as 10:00 h (dez horas) do dia de sua obtenção em posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado e nele ser refrigerado e mantido em temperatura igual ou inferior a 4 °C e com, no máximo, 150.000 bactérias por mililitro. O leite C é de baixa qualidade, inclusive com modificação no sabor pelo elevado número de bactérias antes da pasteurização, pois, o leite é entregue na plataforma dos laticínios na temperatura ambiente. A consequência é uma vida de prateleira muito curta, (menos que 3 dias) e sua gordura é padronizada em 3%, sendo usado pela indústria na fabricação de derivados, como manteiga e queijo [1].

No momento da ordenha, o leite apresenta microbiota benéfica (*Lactobacilos e Lactococos*). As contaminações posteriores são indesejáveis e podem ser detectadas por alterações físico-químicas e sensoriais. O processo de pasteurização do leite submete o mesmo a temperaturas entre 72 °C a 75 °C, por 12 a 15 segundos; em seguida, o leite é resfriado e, com isto, o número de micro-organismos patogênicos será sensivelmente reduzido. A pasteurização consiste na destruição quase total dos micro-organismos patogênicos, bem como na redução drástica de deteriorantes presentes no leite. Quanto menor for a quantidade inicial de micro-organismos presentes no leite cru, melhor será a qualidade e maior será a vida útil do produto. Em virtude da pasteurização empregar temperaturas brandas, sempre há sobrevivência de micro-organismos deteriorantes e, portanto, os leites e alguns de seus derivados necessitam de refrigeração. No caso do leite pasteurizado, a vida de prateleira é curta, podendo variar de 3 a 6 dias sob refrigeração. A pasteurização destrói também as bactérias psicrotróficas como as do gênero *Pseudomonas*, porém, não inativa as enzimas produzidas por elas durante a armazenagem refrigerada e, portanto, é necessário evitar ou minimizar a contaminação por psicrotróficos durante a ordenha, o transporte e a armazenagem do leite refrigerado, prevenindo problemas durante a vida de prateleira dos leites e derivados [3].

Na pasteurização rápida (*High Temperature Short Time* (HTST)), o leite é submetido a (72 a 75) °C por 15 a 20 segundos e refrigeração a temperatura inferior a 5 °C, em processo contínuo realizado em trocadores de calor a placas. A pasteurização rápida é mais econômica e sua eficiência energética é maior, pois nos trocadores de calor a placas ocorre o reaproveitamento da energia. Ela é mais segura e de fácil controle, ocorrendo menos alteração no sabor do leite e menos perdas nutricionais (vitaminas), em comparação com a pasteurização lenta. Promove a inativação das lipases e proteases endógenas e maior insolubilização do cálcio coloidal. A pasteurização rápida é a mais utilizada no processamento de leite (72 °C a 15 segundos). Na pasteurização lenta o leite é submetido a um aquecimento (63 a 65)°C por 30 minutos e subsequente resfriamento a 4 °C, usado na fabricação de queijos e iogurtes. A pasteurização lenta é restrita ao processamento de derivados do leite, sendo a mais indicada para o processamento de queijos, uma vez que promove o mínimo de desnaturação proteica, evitando que ocorra deposição de proteínas do soro sobre as misturas de caseína, o que dificulta a ação da quimosina (coalho). Na pasteurização lenta, as lipases e as proteases endógenas não são totalmente inativadas, nem as bactérias lácticas originais do leite são totalmente destruídas, o que lhes possibilita agir durante a maturação dos queijos, trazendo efeitos benéficos. Adequada para a produção de queijos, além de ser o tipo mais barato de pasteurização, contudo apresenta desvantagens. É um processo em batelada, trabalhoso, de difícil controle, demorado, energeticamente ineficiente e o equipamento ocupa um espaço maior que o usado na pasteurização rápida. No processamento de queijos a partir de leite pasteurizado, é necessário repor o cálcio, com cloreto de cálcio, de modo a garantir uma concentração mínima do mesmo, para promover

a coagulação, uma vez que o aquecimento promove a insolubilização do carbonato de cálcio precipitado (CCP) [3].

O processo de ultrapasteurização (Leite Longa Vida) *Ultra High Temperature* (UHT) submete o leite a 142°C por 2 segundos, com redução a 32 °C, embalado em embalagem longa vida, que impossibilita interação do alimento com o meio (multicamadas de filme de papelão, alumínio, polietileno, poliéster e polipropileno). Na esterilização, o leite sofre um pré-aquecimento de 70°C e esterilização na própria embalagem à temperatura de 109 a 120 °C, durante 20 a 40 minutos, seguida de rápido arrefecimento a cerca de 30 °C. Este processo promove completa destruição dos micro-organismos esporulados ou não, ou seja, a eliminação de todos os micro-organismos patogênicos e também daqueles capazes de se proliferar durante o armazenamento do leite. Possui desvantagens em relação à pasteurização: é um processo caro, que altera significativamente a cor e o sabor do leite em virtude da caramelização e da reação de Maillard; ocorre alteração sensorial, deixando o produto com sabor de cozido, resultado de uma intensa desnaturação de proteínas em especial das proteínas do soro e ocorre destruição acentuada das vitaminas, em comparação com a pasteurização [3].

3.1.2 Legislação e mercado

A demanda por produtos lácteos no Brasil cresceu a uma taxa anual de 3% ao longo da última década. Cada brasileiro consome, em média, 170 litros de leite por ano, segundo a EMBRAPA. Esse incremento no consumo foi favorecido, principalmente, pelo aumento da renda da população e, também, pela diversificação do portfólio de produtos derivados do leite. Ou seja, cresceu a demanda por produtos de maior valor agregado, o que é favorável para o setor de laticínios. O aumento da população urbana e as mudanças no ritmo de vida também impulsionaram o consumo de leite no Brasil. Contudo, o consumo *per capita* de leite ainda é baixo para atender às necessidades nutricionais da população. O Ministério da Saúde recomenda o consumo de 210 litros (média) por pessoa por ano. Existe, portanto, um déficit de consumo de pelo menos 40 litros por habitante. Segundo artigo publicado na revista *Agro Analysis* de junho 2013[4], multiplicando esse volume por 200 milhões de pessoas (população aproximada do Brasil), temos um potencial de crescimento da demanda brasileira por leite da ordem de 8 bilhões de litros anualmente. Considerando o consumo atual, de 32 bilhões de litros de leite, estamos falando de uma demanda potencial de 40 bilhões de litros de leite no País, valor próximo ao que o MAPA estima para a demanda brasileira por leite em 2021/2022. Esse potencial de crescimento da cadeia leiteira é um fator positivo a ser vislumbrado por um setor que, desde a crise de 2008, vem buscando se reestruturar [4].

Após a crise mundial, em 2008, o setor de laticínios no Brasil vem passando por transformações. Algumas aquisições e fusões resultaram na concentração das indústrias.

No caso de arrendamentos podemos citar a Laep Investments Ltda arrendando a planta de Santa Helena de Goiás, em Goiás, da Parmalat Brasil, para o laticínio Italac, e a Nestlé arrendando a planta da Parmalat em Carazinho, no Rio Grande do Sul. Podemos destacar ainda a Bom Gosto comprando a unidade desativada da Nestlé em Barra Mansa, no Rio de Janeiro (Scot consultoria, 15 dezembro 2010)[5]. Do lado das fusões, no início de 2010, tivemos uma iniciativa surgindo das cooperativas de leite no país. Foi a chamada “megafusão” entre a Itambé e outros quatro laticínios: Cemil, Minas Leite, Confepar e Centroleite. Investimentos no setor também foram feitos, como, por exemplo, grandes laticínios entrando no segmento de leite longa vida, além da expansão de algumas cooperativas ao redor do país. Em 2011 e 2012, o cenário não foi bom para os laticínios no Brasil. Os elevados custos de produção na fazenda e a concorrência entre as indústrias elevaram o preço da matéria-prima. A situação agravou-se pelo fato dos laticínios não conseguirem repassar esses aumentos para o varejo, o que reduziu as margens de comercialização. O mercado sentiu o impacto disso. Considerando os três maiores laticínios brasileiros pesquisados, em volume, a quantidade de leite captado em 2012 caiu em relação a 2011. Por outro lado, algumas indústrias aumentaram a captação e as suas participações neste mercado. Essa classificação é divulgada anualmente pela Associação Leite Brasil, em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), a Confederação Brasileira de Cooperativas de Laticínios (CBCL), a Organização das Cooperativas Brasileiras (OCB) e a Embrapa Gado de Leite [4].

O mercado de leite ganhou sustentação desde o final de 2012. A demanda no varejo está boa e a oferta de leite para a indústria está diminuindo desde o pico de produção, registrado em dezembro de 2012. A concorrência na indústria fez com que o preço do leite ao produtor subisse. Porém, em 2013, diferentemente de 2012, os laticínios estão conseguindo repassar esses aumentos para os preços no atacado, inclusive trabalhando com margens maiores. No atacado, segundo levantamento da Scot Consultoria [5], o preço do leite longa vida subiu 21,5% desde janeiro. O produto está 25,7% mais caro na comparação com o mesmo período de 2012. Ainda em relação a maio de 2012, o preço médio da matéria-prima ou o preço do leite pago ao produtor subiu 7,9% e a margem dos laticínios aumentou. Os preços de outros lácteos também subiram em relação ao ano passado: leite em pó integral (+29,1%), muçarela (+11,5%), creme de leite (+5,4%), manteiga (+5,3%), etc. No contexto mundial, o Brasil aparece com grande potencial exportador, mas esforços serão necessários para que esse cenário se concretize. O setor agrícola deverá passar por importantes transformações nos próximos anos em função do processo de reorganização e consolidação do segmento industrial. Existem iniciativas da indústria para melhorar a qualidade dos produtos lácteos e a eficiência no processamento. Casos de fraude do leite, como o que aconteceu no Rio Grande do Sul no começo de maio de 2013, prejudicam o setor de maneira geral, já que abalam a confiança do consumidor e pesam contra a construção desse quadro promissor [5].

3.1.3 Composição, características nutricionais e tecnológicas

3.1.3.1 *Importância nutricional*

O leite humano, sem dúvida, é o melhor alimento para recém-nascidos, uma vez que proporciona um crescimento e um desenvolvimento imunológico adequados, além de proteger o lactente contra infecções. Há benefícios também para a mãe, como, por exemplo, menor incidência de câncer de mama durante a pré-menopausa e câncer de ovário, prolongamento da fertilidade após o parto, redução de peso de maneira natural e menor incidência de fratura de colo do fêmur em mulheres com mais de 65 anos [6]. O aleitamento materno é considerado um dos pilares para a promoção e proteção da saúde das crianças. A superioridade do leite humano como fonte de alimento e de proteção contra doenças faz com que especialistas do mundo inteiro recomendem a amamentação exclusiva por seis meses e complementando até, pelo menos, o final do primeiro ano de vida [6]. O leite materno é o único alimento que garante qualidade e quantidade ideais de nutrientes para o bebê, nos primeiros anos de vida, protegendo a criança contra infecções, diarreia e doenças respiratórias [6].

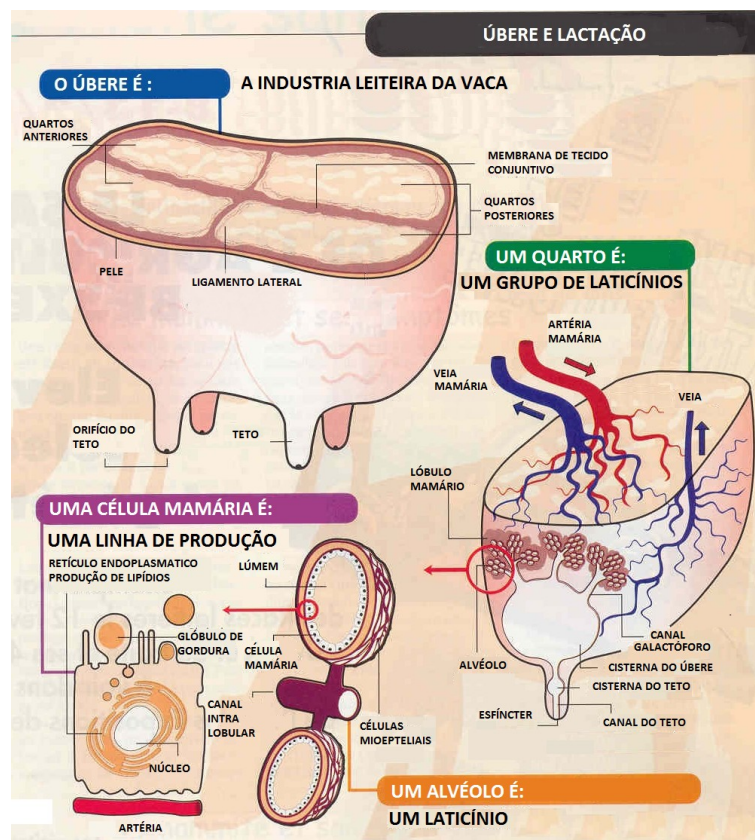
A utilização do leite e ou seus derivados por adultos não é objeto de consenso. Quanto aos adultos, a ingestão de leite é controversa. O leite é visto como causador de alergias, principalmente sua fração proteica, de intolerância à lactose, asma, rinite, aumento da produção de secreções mucosas, diabetes, catarata, câncer do ovário, entre outras doenças. Entretanto, o leite e seus derivados constituem importantes fontes de minerais, vitaminas e proteínas de alto valor biológico. O produto contém nutrientes capazes de modular funções fisiológicas específicas, o que o torna fonte de ingredientes funcionais promotores da imunomodulação (estimulação do sistema imune). O consumo de leite está associado à prevenção de osteoporose, hipertensão arterial, ao controle do peso corpóreo e até a modulação da gordura corporal, entre outros fatores. Contribui também na atividade antimicrobiana e antiviral. Os animais mamíferos adultos também bebem leite desde que lhes seja ofertado e isso não acontece por se tratar de um alimento caro. O desmame dos animais ocorre porque o leite precisa ser preservado para as novas crias. O soro do leite resultante da fabricação do queijo é utilizado para alimentar porcos adultos. Existe o mito de que o homem não necessita incluir leite na sua dieta e que todo cálcio que o ser humano precisa pode vir dos vegetais, a exemplo do que acontece com animais como girafa e elefantes, que vivem de folhas. Mas a comparação dificilmente atende às necessidades humanas porque os animais passam muitas horas do dia se alimentando. A biodisponibilidade de cálcio nas folhas é pequena se comparada ao leite e existem ainda alguns fatores anti-nutricionais que dificultam sua absorção, o que torna seu aproveitamento mais difícil. Excetuando a manteiga, que é obtida da porção gordurosa do leite, a grande fonte de cálcio é constituída pelo leite e derivados. Três copos, do tipo americano, de leite diários são suficientes para atender cerca de 75% das recomendações nutricionais

do organismo. Para obter as mesmas quantidades de cálcio, com a ingestão do leite, é necessário o consumo de um grande volume de vegetais, o que não é frequentemente observado na dieta da maioria das pessoas [7].

3.1.3.2 Composição

O leite é uma solução contendo sais, lactose e proteínas dispersas em fase aquosa, glóbulos de gordura em emulsão e partículas hidratadas de proteína em suspensão coloidal [8]. É uma secreção branca, produzida pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos. Este líquido nutritivo tem como função alimentar as crias na tenra idade. A fêmea pode produzir leite antes ou logo após o parto, sendo este com características bastante particulares, cujo nome é colostro. É o único fluido que as crias dos mamíferos necessitam até o desmame. Nos seres humanos, as glândulas mamárias apresentam-se em um par na parte frontal do torso, já nos bovinos e bubalinos, se apresentam em número de 4 (quatro) na posição ventral, como esquematizado na Figura 1. O leite de animais forma parte da alimentação humana adulta. Na maioria das civilizações, o leite de vaca é o mais consumido, entretanto, os de ovelha, cabra, égua, camela, etc, também são consumido [8].

Figura 1 – Vistas em corte de um úbere bovino



Fonte: PLM, 1998 [21].

O homem é o único animal que continua a tomar leite depois de adulto. O leite é sintetizado na glândula mamária, que é uma glândula sudorípara modificada. Alguns constituintes do leite são produzidos nas células secretoras e os demais, a partir do sangue. A composição do leite descrita em seus principais constituintes na Tabela 1 é determinante para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e adequação para processamento e consumo humano. A biossíntese do leite ocorre na glândula mamária, sob controle hormonal. Estima-se que o leite possua em torno de cem mil constituintes distintos, embora a maioria deles não tenha ainda sido identificada [11].

Tabela 1 – Composição média do leite de vaca

Contribuinte	Teor (%)	Variação (%)
Água	87,3	85,5-88,7
Lactose	4,6	3,8-5,3
Gordura	3,9	2,4-5,5
Proteínas	3,25	2,3-4,4
Substâncias minerais	0,65	0,53-0,80
Ácidos orgânicos	0,18	0,13-0,22
Outros	0,14	-

Fonte: Adaptado de Wastra e Jenness, 1984 [8]

A água é o maior e mais importante constituinte do leite, no qual estão dissolvidos, dispersos ou emulsionados os demais componentes. A maior parte encontra-se como água livre, embora haja água ligada a outros componentes, como proteínas, lactose e substâncias minerais. A gordura no leite ocorre como pequenos glóbulos contendo principalmente triacilgliceróis, envolvidos por uma membrana lipoproteica. O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oleico. A gordura é o constituinte que mais sofre variações (Tabela 1) em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação.

Todas as vitaminas conhecidas estão presentes tanto no leite humano como no leite bovino. As vitaminas A, D, E e K estão associadas aos glóbulos de gordura e as demais ocorrem na fase aquosa do leite. A concentração das vitaminas lipossolúveis depende da alimentação do gado, exceto a da vitamina K. Esta, como as vitaminas hidrossolúveis, é sintetizada no sistema digestivo dos ruminantes. As proteínas do leite bovino contém vários compostos nitrogenados, dos quais aproximadamente 95% ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não-proteicos [11].

O nitrogênio proteico do leite é constituído de cerca de 80% de nitrogênio caseínico e de 20% de nitrogênio não-caseínico (albuminas e globulinas). Diversos fatores influenciam na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, tais como

temperatura ambiente, doenças do animal, estágio de lactação, número de parições, raça, alimentação e teor energético da alimentação.

As enzimas podem ser encontradas no leite, como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. O desenvolvimento, intencional ou não, de micro-organismos no leite contribui para o complexo enzimático. A atividade dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio (temperatura, pH, acesso ao substrato), sendo alteráveis pelo processamento tecnológico. A lactose é o carboidrato característico do leite, formado a partir da glicose e da galactose, sendo o constituinte sólido predominante e menos variável. Tratamentos térmicos ocasionam reações de escurecimento a partir da lactose, (reação de Maillard), com uma diminuição do valor nutricional diretamente proporcional à intensidade e o tempo de aquecimento.

As substâncias minerais do leite são cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio, magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, formando sais orgânicos e inorgânicos [11].

A associação entre os sais e as proteínas do leite é um fator determinante para a estabilidade das caseínas ante diferentes agentes desnaturantes. O fosfato de cálcio, particularmente, faz parte da estrutura das micelas de caseína. Dentre as propriedades físico-químicas do leite, estão o sabor e odor. O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor *sui generis* pouco pronunciado, essencialmente devido à relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo ser afetado em condições como a ocorrência de mamite (infecções do úbere). Sabores e odores pronunciados em leite fresco são devidos, usualmente à alimentação (ração, silagem) e ao ambiente de ordenha [11].

A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. A cor amarelada provém do pigmento caroteno, que é lipossolúvel. Cores anormais podem resultar de desenvolvimento microbiano, como a cor vermelha causada pela bactéria *Serratia marcescens* e a cor azul, pela bactéria do gênero *Pseudomonas* [11].

O leite, logo após a ordenha, apresenta reação ácida com a fenolftaleína, mesmo sem que nenhuma acidez, como ácido láctico, tenha sido produzida por fermentações. A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A acidez natural do leite varia entre (0,13 e 0,17)%, expressa como ácido láctico. A elevação da acidez é determinada pela transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida do leite. Tanto a acidez natural quanto a acidez desenvolvida são quantificadas, simultaneamente, em titulações por soluções alcalinas.

Para o leite proveniente de diversas fontes, após misturado, o pH varia entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20 °C ou 6,6 a 25 °C. No caso da secreção após o parto (colostro), o pH varia de 6,25, no primeiro dia, a 6,46 no terceiro. O leite proveniente de animais com mamite é levemente alcalino, podendo atingir pH 7,5. O leite apresenta considerável efeito tampão, especialmente em pH entre 5 e 6, em razão da presença de dióxido de carbono, proteínas, citratos, lactatos e fosfatos. A densidade do leite varia entre 1,023 g/mL e 1,040 g/mL a 15 °C; o valor médio é 1,032 g/mL. Leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade em relação a leite com baixo teor de gordura, em razão do aumento do extrato seco desengordurado que acompanha o aumento no teor de gordura [11]. Em um leite contendo 12,5% de extrato seco (4,75% de lactose e 0,1% de cloretos), o ponto de congelamento aproximado será -0,531 °C, em razão do abaixamento do ponto de congelamento causado pela lactose (-0,296 °C), pelos sais (-0,119 °C) e por outros constituintes dissolvidos (uréia, dióxido de carbono). Esses valores, entretanto, dependem de diversos fatores relacionados com o animal, o ambiente, o processamento industrial e as técnicas crioscópicas. As substâncias dissolvidas no leite fazem com que o ponto de ebulição seja levemente maior que o da água. As temperaturas médias de ebulição, ao nível do mar, situam-se entre 100 e 101 °C[11].

O conhecimento do calor específico do leite e dos produtos lácteos é essencial à engenharia de processos e ao dimensionamento de equipamentos. A 15 °C, o leite integral, o leite desnatado e o creme de leite (30% de gordura) apresentam calores específicos de 3,93, 3,95 e 4,11 $kJK^{-1}kg^{-1}$. Os valores da tensão superficial do leite integral, do leite desnatado e do creme de leite são (55,3, 57,4 e 49,6) mNm^{-1} , respectivamente. Aumento nos teores de constituintes tensoativos (proteínas, ácidos graxos livres) ocasiona redução da tensão superficial do leite. O leite é mais viscoso que a água, em razão da presença de proteínas e lipídios, podendo sofrer alterações com o processamento industrial. O leite integral e o leite desnatado têm viscosidades médias, a 20 °C, de 1,631 $mPa s$ e 1,404 $mPa s$, respectivamente. A presença de íons no leite, particularmente na forma de sais, possibilita a passagem de corrente elétrica, dependente da atividade desses íons. Em média, a condutividade do leite varia entre 4,61 $mS cm^{-1}$ a 4,92 $mS cm^{-1}$ [11].

A quantidade de leite produzida e sua composição apresentam variações ocasionadas por diversos fatores como: espécie, raça, fisiologia (individualidade, diferenças entre os quartos do úbere, idade), alimentação, estações do ano, doenças, período de lactação, ordenhas (número, intervalo e processo), fraudes e adulterações [9].

Apesar de ser um grande produtor de leite, o Brasil possui problemas na área de higiene, armazenamento, transporte e beneficiamento deste produto, fazendo com que grande parte do leite produzido não seja aproveitada pelas indústrias. Parte do leite rejeitado pela indústria é direcionada para confecção de derivados. Esta situação faz com que o produtor aproveite o leite sem o devido tratamento térmico, comercializando

o produto sob a forma de leite cru ou queijo. Como consequência, temos a redução da oferta de leite para a indústria e o fornecimento de leite e derivados com más condições de higiene e sem inspeção sanitária para a população.

Existe quase um consenso, por parte dos pesquisadores/profissionais da área, de que grande parte dos problemas de sanidade do leite (CTB, CCS) se deve a práticas que favorecem a proliferação de micro-organismos por parte dos pequenos produtores que, por desinformação ou custo, deixam de trabalhar seguindo as boas práticas de higiene.

A primeira avaliação da qualidade do leite é feita no campo, normalmente pelo motorista da carreta que vem buscar a matéria-prima. O caminhoneiro realiza um teste rápido e simples, onde observa a reação entre o leite e uma solução que promove a desnaturação do mesmo e a formação de coagulação e precipitação no caso deste estar ácido. O motivo pelo qual a indústria rejeita parte do leite que deveria ser coletado reside no fato deste, quando submetido ao teste de acidez com alizarol, apresentar-se positivo. O leite ácido, quando tratado termicamente (pasteurização), não mantém sua estabilidade, vindo a coagular. Esta situação ocasiona perda do material, interrupção na produção e, em resumo, prejuízo para a indústria.

O teste do alizarol possui dupla função. Na primeira, é avaliada a estabilidade térmica e, na segunda, a sua acidez. É comum encontrarmos leite que dê positivo no teste e, quando o mesmo é submetido ao teste de acidez titulável, este não se apresenta ácido. Entretanto, esta diferenciação é impossível de ser feita pelo método do alizarol (alizarina + etanol), provocando a rejeição da matéria-prima. Alterações na estabilidade do leite frente ao etanol tem sido relatadas em outros países [31, 33, 34].

Lopes (2008) [22], analisando 451 amostras de leite, classificou 64,77% como positivas no teste do álcool e, desta porcentagem, apenas 35,23% apresentou acidez titulável acima de 18 °D, demonstrando que o leite instável, em sua maioria, não é ácido.

Problema comum na produção de leite, o LINA é responsável por prejuízos para toda a cadeia. O impacto maior, porém, se dá sobre o próprio criador, que tem sua produção recusada pela indústria. Sua origem mais comum é a alimentação inadequada das vacas em lactação, ocorrendo principalmente em períodos de seca e de algum tipo de restrição alimentar. Em alguns períodos do ano, na Região Sul do País, a ocorrência pode chegar a 50% das propriedades. [17, 37].

Entretanto, nem só a deficiência nutricional é causadora do problema. Existem outros, de acordo com a pesquisadora Maira Zanella, da Embrapa Clima Temperado, que há alguns anos pesquisa o assunto. Um deles é o tempo de lactação prolongado. "O ideal é que se seque uma vaca leiteira dez meses após o parto, mas, quando esses animais ficam além desse período, por sua composição mineral, o leite terá uma estabilidade menor e pode dar positivo no caso do álcool", explica.

Outras causas associadas são os fatores ambientais. Períodos muito quentes em que o animal sofre estresse térmico, por exemplo, acabam afetando seu metabolismo e fazendo com que ingira menos alimento e pode refletir em um caso de LINA. Períodos de muita chuva, quando o produtor faz uma troca brusca nos alimentos oferecidos aos animais, sem dar tempo de adaptação do rumem, também podem redundar na instabilidade do leite.

As perdas econômicas são significativas, pois, quando é detectado o LINA há rejeição total do produto. Se o criador tem seu leite recusado, perde sua remuneração uma vez que, na maioria dos casos, o leite é a principal, quando não a única fonte de renda da propriedade.

A prova do álcool pode ser usada como um método rápido para estimar a estabilidade das proteínas do leite. E esta prova verifica a estabilidade da caseína, criando uma situação de estresse à proteína por meio de uma solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pelo processamento térmico (O'CONNELL et al., 2001) [19]. A adição de etanol ao leite induz várias alterações nas micelas de caseína, como o colapso da camada de κ -caseína, a redução na carga micelar e a precipitação do fosfato de cálcio, que colaboram para a redução da estabilidade micelar da κ -caseína (O'CONNELL et al., 2006)[18].

O diagnóstico é extremamente importante para saber se o problema é mesmo o LINA e não o leite ácido. Segundo a pesquisadora, a diferenciação é necessária porque o teste do álcool detecta a existência do problema, mas não qual deles, o que pode causar confusão na hora do tratamento. Uma vez confirmado o LINA, o que pode ser feito através de testes realizados pelo próprio produtor e outros que vão precisar de auxílio técnico, é necessário solucionar o problema através da adoção de uma série de medidas. A primeira delas é a secagem dos animais que estejam em períodos acima de dez meses em lactação. Depois vem a questão da alimentação, mas isso varia de caso a caso, dependendo das condições da propriedade. O mais indicado, porém, é a prevenção, que pode ser feita com ajuda de uma programação o ano todo e que contemple as diferentes necessidades dos animais e condições climáticas [37].

Na literatura, há referência sobre a influência do LINA no rendimento e qualidade dos derivados lácteos e as implicações deste leite sobre os equipamentos de processamento térmico, onde ocorrem deposições anormais, necessitando mais interrupções durante o processo para a realização de limpezas nos trocadores térmicos, reduzindo o valor do produto final e onerando o processo produtivo da indústria. Tais alterações já foram relatadas pela literatura em diferentes regiões do mundo como no Japão (Yoshida [45]), na Itália (Pecorari et al. [46]), no Iran (Sobhani et al. [47]), em Cuba (Ponce [48]), no Uruguai (Barros et al. [33]) e no Brasil (Donatele et al. [50]; Conceição et al. [51], Marques [53]; Zanela [17]).

3.1.3.3 *Contaminação microbiana e a acidez do leite.*

A qualidade higiênica do leite está diretamente relacionada, principalmente, com a sanidade do rebanho, da qual fazem parte a água, o manejo do gado, os cuidados na ordenha e a aplicação das boas praticas de higiene. Do ponto de vista higiênico, o leite deve ter as seguintes propriedades características:

- Agradável (com preservação das suas propriedades: sabor, cor, odor, viscosidade);
- Limpo (livre de sujeiras, micro-organismos e resíduos);
- Fresco (composição correta e conservação adequada);
- Seguro (não cause problemas à saúde).

Para se determinar a acidez do leite, podemos avaliar os resultados de seu pH ou de sua acidez titulável. A legislação brasileira considera normal o leite que apresenta acidez titulável entre 15 e 18 °D. Esta acidez titulável, natural do leite (denominada também de acidez aparente), resulta da presença de CO_2 , fosfatos, citratos, caseína e de outros constituintes de menor importância do leite. Estes compostos estão presentes na porção aquosa (soro) do leite e fazem parte dos "sólidos não-gordurosos". Portanto, o leite que contém grande quantidade de sólidos não-gordurosos pode apresentar acidez aparente mais alta que o normal. Na tabela 2, observamos as alterações produzidas no leite pela ação das bactérias.

Tabela 2 – Alterações do leite ocasionadas por micro-organismos

Alteração	Micro-organismo
Acidificação e coagulação	Bactérias ácido-láticas lactococcus, lactobacillus, micrococcus, microbacterium, coliformes, leveduras.
Produção de gás	Coliformes e leveduras
Gelificação e sabor amargo	Bacillus, Proteus, Clostridium, Aeromonas, Pseudomonas
Coagulação sem acidificação	Bacillus coagulans, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis
Aumento da viscosidade	Enterobacter aerogenes, Alcaligenes viscolatis, Leuconostoc mesenteroides, Bacillus ssp, E. coli, Micrococcus
Alteração de cor	Rosada: Propionibacterium e Lactobacillus, Vermelho: Serratia marcescens; Azul: Pseudomonas synxantha; Amarela: Pseudomonas synxantha
Odores e sabores variados	Odor de mofo: Bolores; Frutas: Leveduras; Estábulo: Coliformes; Peixe: Aeromonas; Terra: Actinomyces; Malte: Lactococcus lactis biovar, Maltigenis; Medicamentos: Enterobacter aerogenes

Fonte: Adaptado de Micro-organismos que Deterioram a Qualidade do Leite, Carla C. Lange e José R. F. Brito, 2005) [15]

Os lactobacilos executam fermentação láctica, em que o produto final é o ácido láctico. Para isso, eles utilizam como ponto de partida a lactose, que é o açúcar do leite, desdobrado, por ação enzimática que ocorre fora das células bacterianas, em glicose e galactose. A seguir, os monossacarídeos entram nas células, onde ocorre a fermentação. O sabor azedo do leite fermentado se deve ao ácido láctico formado e eliminado pelos lactobacilos. O abaixamento do pH causado pelo ácido láctico provoca a coagulação das proteínas do leite e a formação da coalhada, usada na fabricação de iogurtes e queijos. Elevados níveis de contagem bacteriana interferem diretamente na composição de leite, determinando um aumento da concentração de proteína e redução dos níveis de lactose (Bueno et al., 2008)[27]. Torna-se importante ressaltar que o aumento do teor de proteína no leite com alta CBT é decorrente da grande passagem de proteínas sanguíneas e não pelo aumento do teor de caseína (Fonseca e Santos, 2000) [57]. A Instrução Normativa 51

(IN 51) no Diário Oficial da União, em 18 de setembro de 2002 estabeleceu limites para CTB e CCS (BRASIL, 2002)[1]. Posteriormente, a IN 51 foi alterada e passou a vigorar a Instrução normativa 62/2011 (IN 62)[13] para a qualidade do leite cru produzido, com os novos limites para contagem bacteriana total (CTB) e CCS (BRASIL, 2011). Na tabela 3 estão relacionados os valores máximos de CTB e CCS e as datas limites adotadas pela IN62.

Tabela 3 – Valores máximos de CTB e CCS e datas limites adotadas pela IN62.

Período	CCS (cel/ml)	CBT (cel/ml)
01.07.2008 a 31.12.2011	$7,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
01.01.2012 a 30.06.2014	6×10^5	6×10^5
01.07.2014 a 30.06.2016	5×10^5	3×10^5
à partir de 2016	4×10^5	1×10^5

Fonte: Adaptado Alex L. da Silva, Marcos I. Marcondes, Daniele C. Jácome. junho/2013

3.1.3.4 Mastite

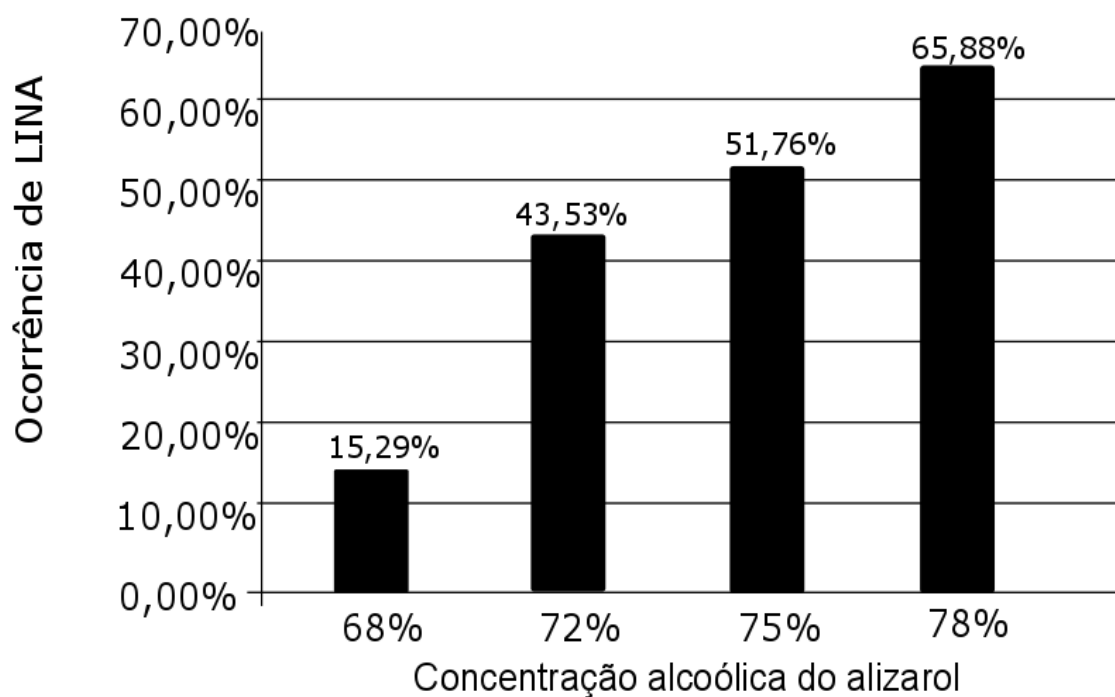
Mastite, segundo Philpot & Nickerson (2002)[40], é a inflamação da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por micro-organismos, especialmente por bactérias. Segundo Bradley (2002)[43], a mastite é a doença mais importante economicamente que acomete o gado leiteiro, sendo responsável por 38% do total dos custos diretos com as doenças comuns de produção. A composição do leite do animal com mastite é alterada, com tendência ao aumento dos componentes provenientes do sangue. O conteúdo de sódio no sangue é maior do que o de potássio. O pH do sangue é de 7,3 a 7,5 e o teor de cálcio é menor do que o do leite. O leite de vacas com mastite possui maior teor de sódio e menores teores de cálcio, fósforo e potássio. O pH tende a ficar alcalino e, portanto, com menor acidez titulável. No leite normal, a plasmina é a principal enzima responsável pela atividade proteolítica, juntamente com o seu precursor inativo, o plasminogênio. No leite obtido de quartos mamários com mastite subclínica, a produção de plasmina e plasminogênio aumenta, predispondo à proteólise (Leitner et al., 2005)[44]. A atividade proteolítica é insensível à pasteurização, ou seja, mesmo após o tratamento térmico, a enzima continua ativa. No leite proveniente de vacas com mastite, as enzimas, catepsina e plasmina aumentam, influenciando no processo de coagulação e, conseqüentemente, na perda de componentes para o soro, o que refletirá na composição do produto final, diminuindo o teor de proteína.

3.1.3.5 *Efeito do etanol sobre a estabilidade do leite*

Segundo Barros (2001)[32], a prova do álcool é empregada para medir a estabilidade térmica do leite, determinando o aceite ou a rejeição, por parte da indústria, no momento da recepção do leite. No momento da coleta do leite, é obrigatório a aplicação do teste do álcool, sendo que a legislação brasileira determina uma concentração mínima de 72% v/v, sempre acompanhado de alizarol. Leites que precipitem na execução do teste, devem ser rejeitados (Brasil, 2002). Quanto maior a concentração de álcool utilizada no teste menor será a constante dielétrica da mistura o que vai determinar uma menor capacidade repulsiva da estrutura micelar o que acaba propiciando a precipitação (Negri, 2002; Mikheeva et al., 2003)[34]. A constante dielétrica interfere no grau de ionização do grupamento R dos aminoácidos e dessa forma, tende a agregar-se (Lehninger, 1995)[39]. Os fatores nutricionais interferem de forma decisiva na estabilidade do leite ao álcool, principalmente pelo fato que desequilíbrios possibilitam alteração de pH do leite e aumento nos níveis de cálcio iônico, o que desestabiliza a micela (Barros, 2006)[52]. Em um trabalho realizado com a utilização de dietas aniônicas, obteve-se uma redução do pH do leite e chegou-se a uma redução da concentração de álcool necessária para promover a coagulação do leite (Marques et al., 2006)[28]. Outro fator de interferência importante é o tempo de lactação que, em animais nos terços inicial e final da curva de lactação tendem a apresentar uma maior concentração de cálcio iônico no leite (Paez et al. 2006)[29].

Segundo Lin et al. (2003)[38], a estabilidade ao etanol na concentração de 75% é considerada o limiar da estabilidade do leite durante o tratamento UHT. A Figura 2 mostra a frequência de amostras de leite instável não ácido em diferentes concentrações alcoólicas (68, 72, 75 e 78% v/v), em 85 amostras de leite cru do município de Sapopema-PR, analisadas entre junho e julho de 2009.

Figura 2 – Concentração de álcool no alizarol



Fonte: Revista Cândido Tostes nº384 [68].

Um grande número de amostras de leite instável sem acidez adquirida foi detectado nesse estudo (Figura 2). Das 53 amostras instáveis ao alizarol 72% (v/v), apenas 16 (30,19%) possuíam acidez acima de 18 °D, o restante das 37 (69,81%) amostras apresentou acidez entre 14 e 18 °D. A tabela 4 sintetiza um estudo realizado no Instituto de Laticínios Cândido Tostes, relacionando os percentuais de etanol com o índice de falso positivo.

Tabela 4 – Relação entre percentual de etanol e incidência de LINA

	Instabilidade à prova do álcool			Instabilidade à prova da fervura		
	Estáveis	LINA	LIA	Estáveis	LINA	LIA
68%	63	13	9	2	0	3
72%	32	37	16	2	0	3
75%	22	44	19	0	1 ¹	4
78%	8	56	21	0	1 ¹	4

Fonte : Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, 2012 [68].

Os resultados são semelhantes àqueles encontrados por Molina et al. (2001)[35], que analisaram 96 amostras de leite cru sem acidez adquirida e concluíram que o aumento progressivo da graduação alcoólica de 75% para 80% e posteriormente para 85% resultou no aumento da instabilidade do leite, sendo respectivamente 8,3%, 61,5% e 94,8%.

¹ Amostra descartada por aguagem.

3.1.4 A fraude econômica do leite

A prática de adulteração no leite é comum em parte dos estabelecimentos industriais envolvidos com a produção, beneficiamento e/ou envase do leite, podendo as fraudes serem caracterizadas em dois tipos:

- sanitária: adição de substâncias estranhas ao leite com o intuito de mascarar deficiências do produto, podendo tais produtos causar mal à saúde;
- econômica: adição de substâncias inócuas, que aumentam o volume de leite, mas não causam mal à saúde (ABLV, 2007)[36].

Segundo Velloso (2003) [54], essas adulterações são mais comumente praticadas no leite fluido com a adição de água, leiteiro e soro de leite. Este último, adicionado ao leite fluido é financeiramente mais atrativo. No entanto, desde que o produto final receba a denominação “bebida láctea”, a sua adição é permitida pela legislação brasileira e, para isso, é também necessário que contenha, no mínimo, 51% de base láctea [41] (BRASIL, 2005 apud OLIVEIRA, 2009). A tabela 5 relaciona os adulterantes comuns do leite e seus efeitos.

Tabela 5 – Tabela de adulterantes e componentes químicos reportados na literatura como sendo frequentemente adicionados ao leite para promover a sua fraude econômica.

Adulterante	Efeito
Água	Aumento de volume
Soro	Aumento de volume
Urina de vaca	Mascarar o estado do leite, bactericida
Água oxigenada	Mascarar o estado do leite, bactericida
Soda cáustica	Mascarar o estado do leite ácido (alcalino)
Uréia	Aumenta o teor de proteína (nitrogênio)
Formol	Mascarar o estado do leite, bactericida
Leitelho	Aumento de volume

Fonte: Adaptado de *Food Fraud Database* [14]

A ingestão de leite adulterado com sal, para disfarçar a diluição de água no produto, pode causar efeitos imediatos à saúde humana — especialmente em crianças. A ação mais direta do excesso de sódio no organismo é o aumento da pressão arterial e da sobrecarga renal, explica a nutricionista Gilberti Helena Hubscher, professora da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A adição de soluções alcalinas, para prolongar a conservação ou diminuir a acidez do leite, é considerada fraude. Contudo, bicarbonatos, formol, ácido bórico, peróxido de

hidrogênio, bicromato de potássio, hipocloritos e ácido salicílico têm sido empregados como conservadores (BEHMER, 1987; PEREIRA et al., 2001). Segundo [67]BEHMER (1987), o amido, o açúcar e a urina são utilizados criminosamente para encobrir a adição de água ao leite, aumentando a densidade.

3.2 A ACIDEZ DO LEITE

O leite é um produto altamente perecível, podendo ter suas características sensoriais alteradas pela ação de microrganismos e ser um veículo de doenças, caso não passe por processos higiênico-sanitários desde a ordenha até o processo de embalagem.

Nos últimos anos, a qualidade do leite vem sendo bastante discutida por todo o setor leiteiro e diversas ações no intuito de implementar melhorias continuam sendo desenvolvidas por toda a cadeia láctea. As etapas de ordenha e armazenamento do leite, até que seja entregue na indústria, para Oliveira (2005)[59], são críticas para sua contaminação, que é extremamente variável. A grandeza e a diversidade da população contaminante variam consideravelmente e estão intimamente associadas à origem do leite (HARVEY & HILL, 1989; PELCZAR et al., 1996)[58].

O MAPA criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) que tem parte do seu amparo legal na IN 51, que estabelece critérios para a produção, identidade e qualidade do leite. Em 2006 o MAPA também passou a monitorar a presença de resíduos de drogas veterinárias e contaminantes ambientais em leite e demais produtos de origem animal por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos.

Para dar suporte analítico aos regulamentos técnicos publicados, foi criada em abril de 2002 a RBQL, estrutura de fundamental importância na implementação das medidas propostas. Os laboratórios credenciados à RBQL estão distribuídos pelo Brasil, de forma que as principais bacias leiteiras do país possam ser monitoradas adequadamente.

Esses laboratórios da RBQL vem realizando rotineiramente análises de composição, CCS, CBT e resíduos de antibióticos. Para isso, contam com equipamentos eletrônicos que aumentam a capacidade analítica, promovendo um maior número de resultados em menor tempo, atendendo, assim, à demanda por análises solicitadas por indústrias e produtores.

A seguir, uma breve descrição sobre as principais análises realizadas, destacando sua finalidade, determinação e os limites aceitáveis para leite bovino:

Acidez: É um dos testes preconizados para avaliar o grau de qualidade do leite, pois qualquer aumento de acidez além dos valores normais é um indicativo da ação de microrganismos sobre a lactose, que é metabolizada a ácido láctico. A acidez pode ser determinada qualitativamente pelo teste de alizarol e quantitativamente pela titulação ou pH. A acidez titulável é expressa em graus Dornic (°D) e seu resultado pode variar de 14-18 °D. A determinação do pH através de phmetros é outra forma de se conhecer a

acidez do leite e derivados, apresentando-se normalmente numa faixa de variação entre 6,6 e 6,8.

Índice crioscópico: baseia-se no ponto de congelamento do leite em relação ao da água com o objetivo de detectar fraudes por aguagem e sua determinação padrão é realizada por meio de crioscópicos eletrônicos que fornecem seus resultados expressos em graus Hortvet (°H), podendo ser convertidos para graus Celsius (°C). O limite aceitável pela legislação é de -0,530 °H(equivalente a -0,512 °C).

Contagem bacteriana total (CBT): medida de contaminação e qualidade higiênica do leite cru que vem sendo determinada por equipamentos automatizados de alto rendimento analítico. Seus resultados são fornecidos em unidades formadoras de colônias (UFC) e segundo a legislação, o limite aceitável é de 750.000 ufc/mL, sendo para as regiões Norte e Nordeste a partir de julho de 2010 e para as demais regiões, a partir de julho de 2008, devendo ser analisados mensalmente.

Composição e Contagem de Células Somáticas (CCS): As análises de proteínas, gordura, lactose, sólidos totais e CCS também vem sendo realizadas com mais facilidade e rapidez por meio de equipamentos automatizados pelos laboratórios da RBQL. Os limites legais mínimo para gordura, proteína e sólidos não gordurosos são 3,0; 2,9 e 8,4, respectivamente. Normalmente a microbiota contaminante do leite é composta por bactérias, enquanto as leveduras e fungos são mais raros de serem encontrados (LIMA, 1998)[62]. Dentre os contaminantes estão as bactérias lácticas, coliformes, Micrococcus, Staphilococcus, Enterococcus, Bacillus, esporos de Clostridium e bastonetes gram-negativos (JAY, 1996)[60]. Por outro lado, segundo (JAY, 1998)[61], em condições adequadas de manipulação e armazenamento, predomina a flora Gram positiva. Resíduos de antibióticos: o objetivo dessa análise é avaliar resíduos de antibióticos e de outros agentes inibidores do crescimento microbiano na matéria-prima, pois os mesmos podem causar riscos à saúde pública. É uma análise exigida por lei, tem sido realizada nos laboratórios da RBQL e o resultado deve ser negativo, ou seja, o leite deve ser isento de resíduos.

O MAPA deverá ser mais um balizador e auditor do que fiscal propriamente dito. O SIF atua juntamente às indústrias processadoras. As equipes de fiscais federais agropecuários e de agentes de inspeção devem orientar e avaliar os estabelecimentos através do fornecimento das análises realizadas em laboratórios pertencentes à RBQL. As análises terão que ser realizadas mensalmente e a avaliação será realizada pela média geométrica sobre o período de três meses. O leite com problema deve sofrer destinação, conforme Plano de Controle do estabelecimento, que deve tratar da questão baseando-se nos Critérios de Julgamento de Leite e Produtos Lácteos, do SIF/DIPOA (IN51)[1].

É fato que a qualidade do leite que chega na indústria de processamento seja determinada pela qualidade do leite que sai da propriedade e por isso, dois pontos tornam-se relevantes: primeiro, a escolha de fornecedores que primem pela qualidade e segundo,

o transporte do leite realizado de forma criteriosa até a indústria. O pagamento por qualidade praticado pelas indústrias vem incentivando e contribuindo para a melhoria da qualidade. Cada laticínio monta seu programa e vários indicadores de qualidade fazem parte, como é o caso, principalmente, da CCS, CBT, proteína e gordura.

Produtos industrializados que apresentam-se fora dos padrões estabelecidos são indicativos da utilização de matéria-prima de baixa qualidade ou que sofreram falhas higiênicas no processamento industrial.

Apesar dos avanços no quesito qualidade do leite, muito trabalho ainda precisa ser feito. É importante que o monitoramento seja realizado de forma contínua em todas as etapas e que esforços sejam realizados de forma consistente por todos os atores da cadeia produtiva, ou seja, consumidores mais exigentes geram demandas por produtos de qualidade e as indústrias, por sua vez, e uma matéria-prima de melhor qualidade aos seus produtores. Diante desse cenário, é necessário que cada segmento envolvido faça efetivamente a sua parte, tornando a cadeia produtiva mais competitiva atendendo às necessidades e exigências dos consumidores.

3.3 MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS E O ELETRODO DE pH

3.3.1 O pH

O pH é símbolo para uma medida físico-química que significa potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio, que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa. O termo pH foi introduzido, em 1909, pelo bioquímico dinamarquês Soren Peter Lauritz Sorensen (1868-1939) com o objetivo de facilitar seus trabalhos no controle de qualidade de cervejas. O p vem do alemão *potenz*, que significa poder de concentração, e o H é para o íon de hidrogênio (H^+). Matematicamente, o p equivale ao simétrico do logaritmo (cologaritmo) de base 10 da atividade dos íons a que se refere. Para íons (H^+):

$$pH = -\log_{10} [a_{H^+}] \quad (3.1)$$

Sendo que a_{H^+} representa a atividade em $mol\ dm^{-3}$. Em soluções diluídas (abaixo de $0,1\ mol\ dm^{-3}$), os valores da atividade se aproximam dos valores de concentração, permitindo que a equação anterior seja escrita como:

$$pH = -\log_{10} (H^+) \quad (3.2)$$

pH é o logaritmo negativo da concentração de H^+

No final do século XIX, o químico Arrhenius propôs, a partir de diversas discussões, a definição de ácido e base. Segundo o cientista, ácidos são substâncias que, em solução aquosa, são ionizadas, desprendendo íons (H^+), enquanto as bases ou hidróxidos são substâncias que, em solução aquosa, passam por uma dissociação iônica, lançando como

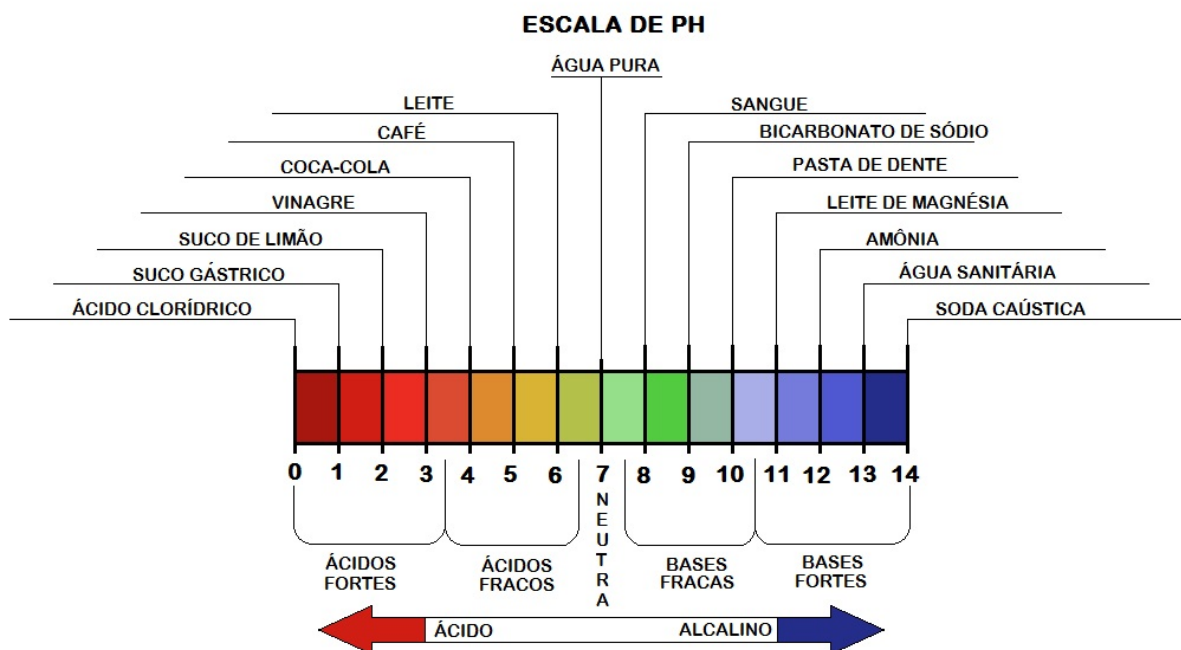
único tipo de ânion o radical (OH^-) (hidroxila ou oxidrila). O termo utilizado para representar tais funções inorgânicas é o pH, potencial hidrogeniônico.

Uma expressiva consequência da teoria ácido-base de Arrhenius é a possibilidade de estabelecer uma escala para aferir o teor de acidez ou basicidade de uma dada substância. Esse instrumento é comumente conhecido como escala de pH, uma escala numérica apresentando valores que variam de 0 a 14.

A escala de pH é formulada a partir de cálculos matemáticos que expressam a concentração do íon na solução. Para determinar o valor do pH é utilizada a seguinte equação matemática, em que $[H^+]$ representa a concentração de hidrogênio em mol/L.

Na escala de pH, as substâncias cujo pH é menor que 7 são classificadas como ácidas, aquelas que apresentam pH maior que 7 são classificadas como básicas e aquelas que apresentam pH em torno de 7, são consideradas neutras. Na Figura 3, observamos a escala de pH com alguns produtos de uso comum.

Figura 3 – Escala de pH



Fonte: Próprio autor

3.3.2 Medida de pH

A determinação do pH é feita eletrometricamente com a utilização de um potenciômetro e eletrodos. O princípio da medição eletrométrica do pH é a determinação da atividade iônica do hidrogênio utilizando o eletrodo padrão de hidrogênio, que consiste

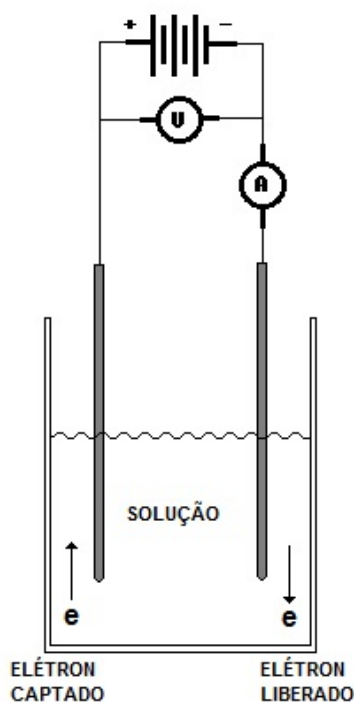
de uma haste de platina sobre a qual o gás hidrogênio flui a uma pressão de 101 kPa. O eletrodo de hidrogênio, no entanto, não é bem adaptado para uso universal, especialmente em trabalho de campo ou em soluções contendo espécies químicas contaminantes do eletrodo. Assim, um outro eletrodo, o de vidro, é comumente utilizado.

3.3.3 Métodos eletroanalíticos

As relações entre a matéria e a eletricidade são o objeto de estudo da eletroquímica. As soluções são especialmente importantes para a bioquímica analítica. As propriedades elétricas de uma solução dependem tanto da natureza dos componentes quanto da sua concentração, permitindo que métodos qualitativos e quantitativos de análise sejam desenvolvidos. Estas propriedades elétricas das soluções são medidas utilizando-se eletrodos em arranjos (dispositivos) conhecidos como células eletroquímicas.

Células eletrolíticas. Quando uma diferença de potencial é aplicada através de dois eletrodos que estão mergulhados numa solução, uma corrente irá fluir entre ambos (Figura 4). A quantidade de corrente que flui depende da tensão aplicada e das propriedades eletroquímicas das soluções. Isso fornece a base para os métodos condutivimétrico e polarográficos de análise. De um modo semelhante, a quantidade total de mudança química que tem lugar em um eletrodo está relacionada com a quantidade total de corrente. Esta é a base de métodos da análise coulométrica.

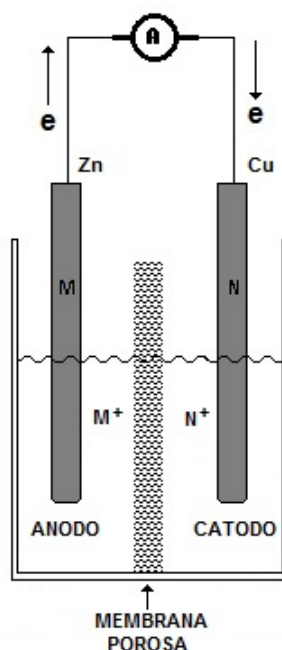
Figura 4 – Diagrama esquemático de uma célula eletrolítica.



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry[56].

Existem dois tipos principais de células eletroquímicas: Células galvânicas ou voltaicas. Em algumas células, a natureza química dos eletrodos e as soluções resultam em uma reação química que ocorre com os eletrodos produzindo energia elétrica (baterias), mas sem a necessidade de uma tensão externa (Figura 5). Este tipo de célula é utilizada em métodos potenciométricos em que nenhuma tensão é aplicada à célula, embora nenhuma corrente flua efetivamente entre os eletrodos (não polarizados), que desenvolvem um potencial em relação à solução, devido à natureza dos eletrodos e da solução. Esse potencial pode ser medido e relacionado com a concentração de íons da solução.

Figura 5 – Diagrama esquemático de uma célula galvânica.



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

O potencial desenvolvido por um único eletrodo numa solução é provocado pela tendência da solução de doar ou aceitar elétrons e pode ser calculado utilizando-se a equação de Nernst:

$$E = E^0 - \frac{2,3026 RT}{n F} \log a \quad (3.3)$$

- E é o potencial do eletrodo para a concentração especificada
- E^0 é o potencial do eletrodo padrão
- R é a constante dos gases

- T é a temperatura absoluta
- n é o numero de elétrons envolvidos
- F é a constante de Faraday
- a é a atividade iônica

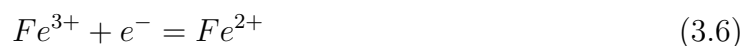
Para medidas feitas a 25°C a equação simplifica para:

$$E = E^0 - \frac{0,059}{n} \log a \quad (3.4)$$

Não pode haver uma reação química num tal sistema sem que haja um doador ou aceitador de elétrons para completar o processo. Cada um destes sistemas de eletrodos é conhecido como uma meia-célula e o potencial desenvolvido por uma meia-célula não pode ser medido em termos absolutos, mas apenas em comparação com o da outra meia-célula. A reação química que ocorre em cada meia-célula é conhecida como meia reação. Um eletrodo ativo consiste de um elemento (M), no seu estado não combinado que é capaz de estabelecer um equilíbrio com uma solução que contém os íons:



A ionização de átomos ou moléculas resulta em um potencial cuja intensidade esta relacionada com a concentração dos íons. A concentração eficaz dos íons (conhecida como a atividade iônica) é mais significativa do que a concentração molar. Os valores para a atividade e concentração são os mesmos em soluções muito diluídas. Eletrodos inertes, tais como a prata, a platina, e carbono, são utilizados unicamente para fazer contato elétrico com a solução e refletir apenas o potencial da solução. Eles são usados para medir o potencial de soluções contendo misturas de íons que têm uma tendência para transferir elétrons entre eles, por exemplo, íons férricos e ferrosos:



Tais reações são conhecidas como reações redox (oxirredução) e, neste caso, o potencial desenvolvido pelo sistema do eletrodo depende da tendência dos íons ferrosos para doar um elétron em comparação com a tendência dos íons férricos de aceitar um. O potencial do eletrodo padrão de um elemento é definido como o seu potencial elétrico quando ele está em contato com uma solução molar de seus íons. Qualquer meia-célula será capaz de oxidar, isto é, aceitar elétrons de qualquer outra meia-célula que tenha um potencial mais baixo em seu eletrodo (Tabela 6).

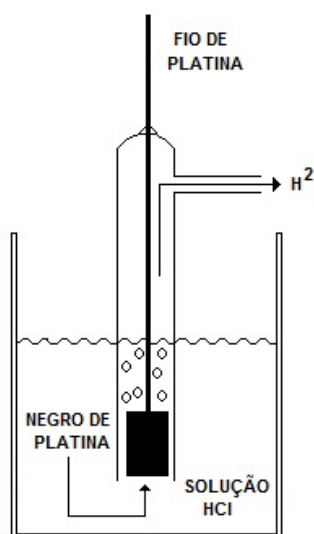
Tabela 6 – Potencial do eletrodo padrão com pH 7.0.

Meia-reação	E^0 (Volt)
Oxigênio/água	0,81
Férrico/ferroso	0,77
Cianeto ferroso/cianeto férrico	0,36
Oxigênio/peróxido de hidrogênio	0,30
Citocromo c férrico/ferroso	0,22
Ácido deidroascorbico/ácido ascórbico	0,08
piruvato/lactato	-0,19
FAD/(FADH ₂)	-0,22
(NAD ⁺)/NADH	-0,32
(2H ⁺) / (2H ₂)	-0,42
Ferroso/ferro	-0,44

Fonte: Adaptado de *Analytical Biochemistry 3rd ed* [56].

É impossível medir o potencial de uma meia-célula diretamente e uma meia-célula de referência deve ser usada para completar o circuito. O eletrodo de hidrogênio (Figura 6) é o eletrodo de referência padrão contra a qual todas as outras meia-células são medidos e é atribuído arbitrariamente um potencial de eletrodo padrão de zero no pH 0. Uma vez que é difícil de preparar e de utilização trabalhosa, um eletrodo de calomelano saturado é frequentemente usado em seu lugar.

Figura 6 – Diagrama esquemático de um eletrodo de hidrogênio.



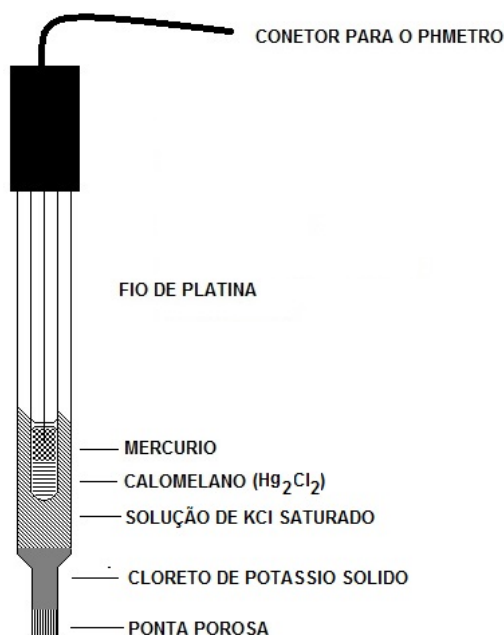
Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

Um eletrodo de folha de platina, recoberto com negro de platina é mergulhado numa solução de ácido clorídrico ($1,0 \text{ mol l}^{-1}$). O gás hidrogênio a uma pressão de 1 atm (101 kPa) começa a borbulhar através do eletrodo e é absorvido pelo negro de platina. O meio de reação para o eletrodo pode ser representado como:



O eletrodo padrão tem um potencial de 0,242 V em relação ao eletrodo de hidrogênio. Ele consiste de um eletrodo de mercúrio em equilíbrio com os íons de mercúrio no sal ligeiramente solúvel, cloreto de mercúrio (Figura 7). Uma alta concentração de íons cloreto é mantida por meio de uma solução saturada de cloreto de potássio, que também proporciona um meio de assegurar contato elétrico com qualquer outra meia-célula utilizada.

Figura 7 – Diagrama esquemático de um eletrodo de calomelano.



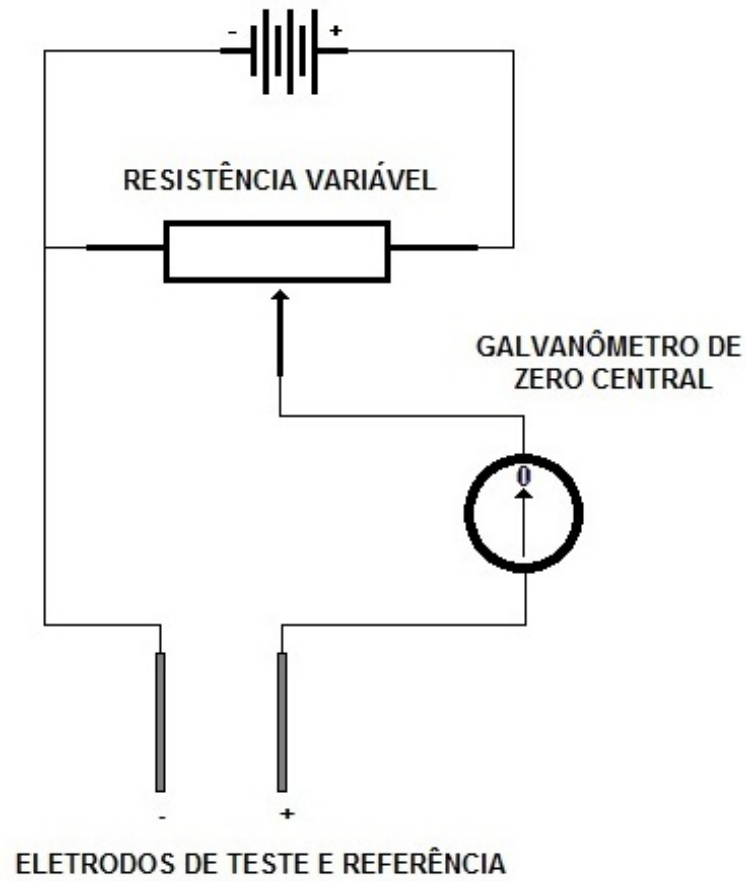
Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

Um fio de platina faz um contato elétrico com um eletrodo que é composto de uma massa de mercúrio metálico, cloreto de mercúrio (calomelanos) e cloreto de potássio. Uma solução saturada de cloreto de potássio completa metade da célula e proporciona um contato elétrico através de um tampão poroso.

A sensibilidade dos instrumentos que utilizam circuitos de baixa resistência elétrica é determinada primeiro pela sensibilidade do galvanômetro (Figura 8). Sistemas de eletrodos que têm uma alta resistência, por exemplo, eletrodos de vidro, requerem um voltímetro de alta impedância, o qual converte o potencial gerado em corrente que pode ser amplificada e medida. Tais instrumentos são comumente conhecidos como medidores de pH, mas podem ser utilizados para muitas outras medições potenciométricas de pH. Em titulação, muitas vezes pode ser conveniente utilizar a potenciometria. Muitas vezes não é o valor real do potencial de eletrodo que é importante mas, sim o padrão de mudança de potencial com que varia a composição da solução. Medições de pH e redox são particularmente bem adequados para tais métodos. Em muitos casos, o ponto de equivalência será indicada por uma mudança significativa no potencial (Figura 9), mas, por vezes, a mudança no ponto de equivalência é difícil de se detectar e pode ser mais conveniente utilizar um gráfico da derivada. Em vez do gráfico do potencial (E) contra o volume de titulante (V), é traçado um gráfico da variação no volume $\frac{\Delta E}{\Delta V}$ contra volume. O gráfico da derivada primeira

(Figura 10) indica o ponto de equivalência como um pico.

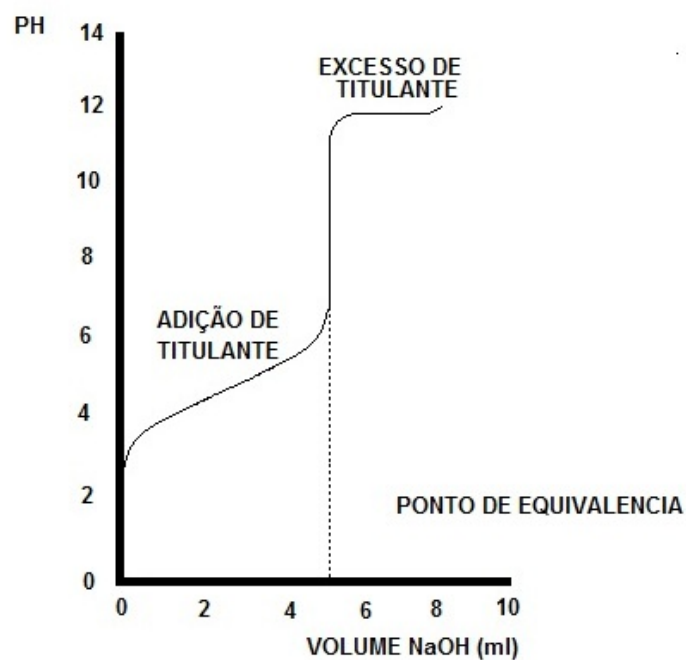
Figura 8 – Diagrama do método clássico do circuito com potenciômetro



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

A tensão do circuito de teste é equilibrado contra uma tensão conhecida por meio de uma resistência variável, utilizando um galvanômetro que indica a posição em que não há fluxo de corrente (zero central).

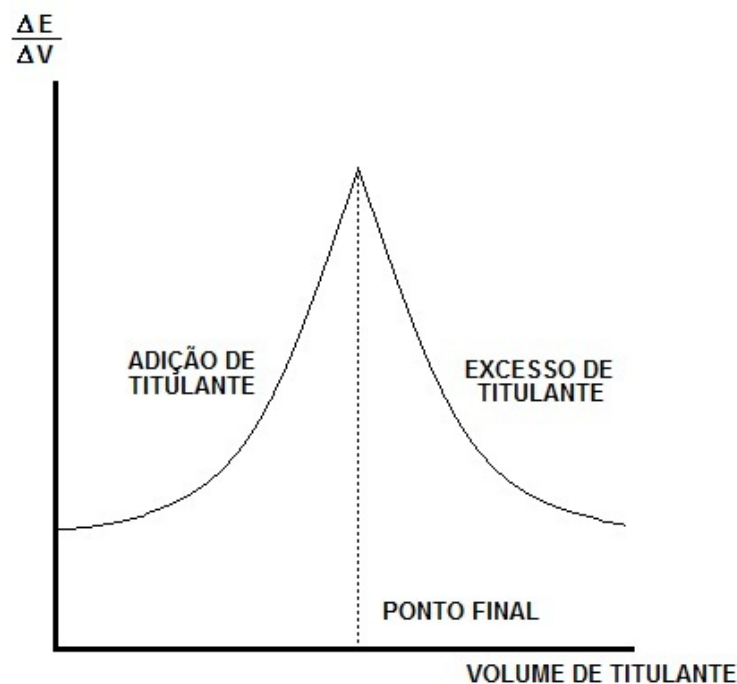
Figura 9 – Curva de titulação



Fonte: Próprio autor

Ácido acético (10 ml de solução de $0,1 \text{ mol l}^{-1}$) foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio ($0,2 \text{ mol l}^{-1}$) e o pH da solução resultante representada graficamente contra a quantidade de álcali adicionado.

Figura 10 – Primeira derivada



Fonte: Próprio autor

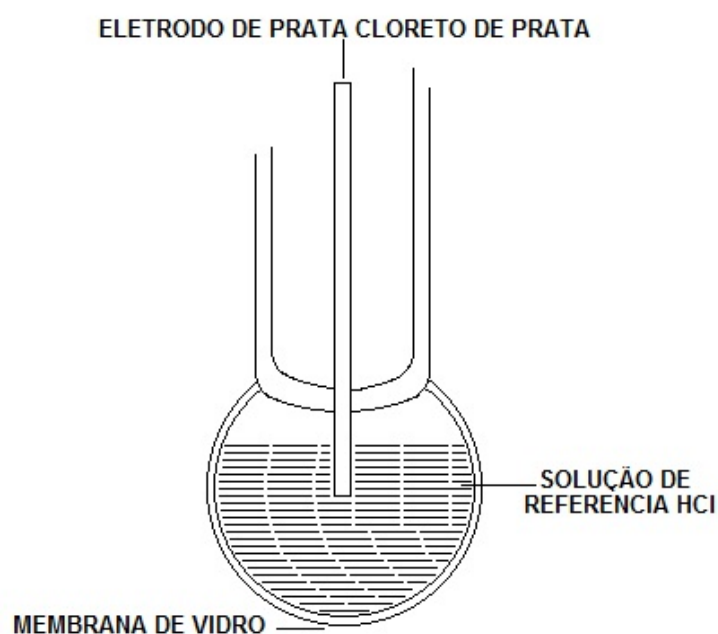
Se dois eletrodos idênticos são colocados em soluções separadas que são semelhantes em todos os aspectos exceto para a concentração dos íons de teste, o potencial desenvolvido entre os eletrodos vai ser relacionado com a proporção das duas concentrações, como por exemplo, eletrodos de Ag-AgCl em soluções contendo íons cloreto. Uma curva de calibração de potencial desenvolvido em uma série de concentrações conhecidas de íons de teste pode ser usado na análise de amostras desconhecidas. É aconselhável traçar o gráfico como potencial em função do logaritmo de concentração para dar a relação de linha reta, tal como indicado pela equação de Nernst. É necessário adicionar uma quantidade constante de uma elevada concentração de um eletrólito não reativo para dar todas às soluções testadas a mesma força iônica. Isto é porque o potencial depende da atividade dos íons, em vez de concentração.

3.3.4 Medição do pH

O eletrodo de vidro é mais comumente utilizado para a medição de rotina do pH (Figura 11). Ele consiste de um eletrodo de cloreto de prata-prata em uma solução de referência de ácido clorídrico (geralmente $0,1 \text{ mol l}^{-1}$) contido em uma membrana de vidro. A membrana é feita de um vidro especial, geralmente um aluminossilicato hidratado contendo íons de sódio ou de cálcio. É seletivamente permeável a íons de hidrogênio e o potencial que se desenvolve através da membrana depende da concentração de íon hidrogênio da solução de teste, em comparação com a solução de ácido de referência

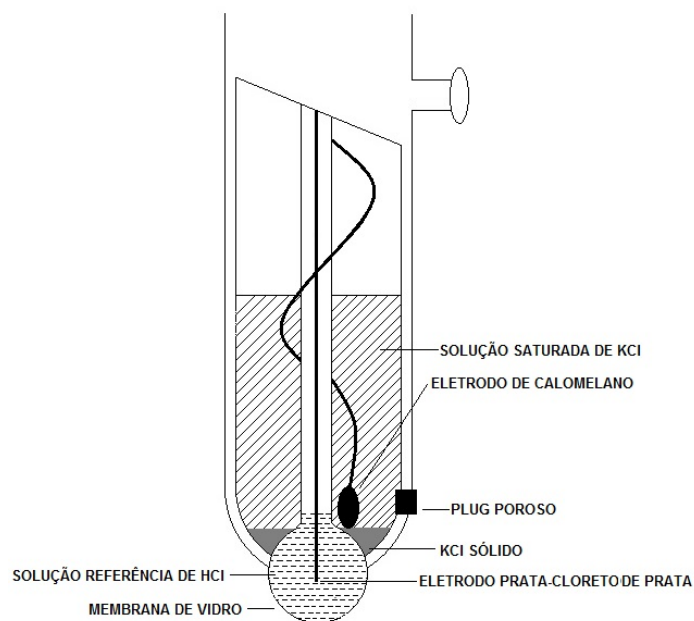
dentro do eletrodo. Este potencial pode ser medido contra um eletrodo de calomelano de referência, usando um voltímetro de alta impedância. Para facilitar a operação do eletrodo de vidro, este é muitas vezes combinado com um eletrodo de referência de calomelano em uma única sonda (Figura 12). Eletrodos de vidro devem ser armazenados em água quando não estiverem em uso, a fim de manter a membrana de vidro completamente hidratada. Existe uma relação quase linear entre pH e o potencial ao longo de uma faixa de pH que vai de 2 a 10, entretanto com valores de pH extremos eletrodos de vidro especiais deve ser usado. A calibração dos instrumentos é essencial e pode ser obtida tanto com tampões cujo pH foi previamente medido usando um eletrodo ou soluções de produtos químicos muito puros preparados em concentrações específicas de hidrogênio, por exemplo, uma solução de biftalato de potássio ($0,05 \text{ mol l}^{-1}$) tem um pH de 4,00 a 15°C . Para medições acima da escala de pH é necessário padronizar o instrumento em pelo menos duas soluções tampão padrão que cubram a faixa necessária, certificando-se de que o ajuste de temperatura correta é usada.

Figura 11 – Eletrodo de vidro



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

Figura 12 – Eletrodo combinado de pH



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

3.3.5 Eletrodos de íons seletivos

A membrana do eletrodo de vidro utilizado para medições de pH é seletivamente permeável aos íons de hidrogênio e a partir deste conceito de base, toda uma série de eletrodos seletivos de íons têm sido desenvolvidos. Variando a composição da membrana de vidro pode alterar a permeabilidade do vidro. Embora tais eletrodos possam ser descritos como específicos para íons como Na^+ , K^+ , Ca^{++} e NH_4^+ eles são na verdade apenas seletivos e não específicos e, muitas vezes mostram interferência significativa de outros íons, em especialmente os íons de hidrogênio. Em todos os casos, o desenho básico dos eletrodos é o mesmo (Figura 14(a)), mas a natureza da membrana seletiva de íons varia.

interferentes.

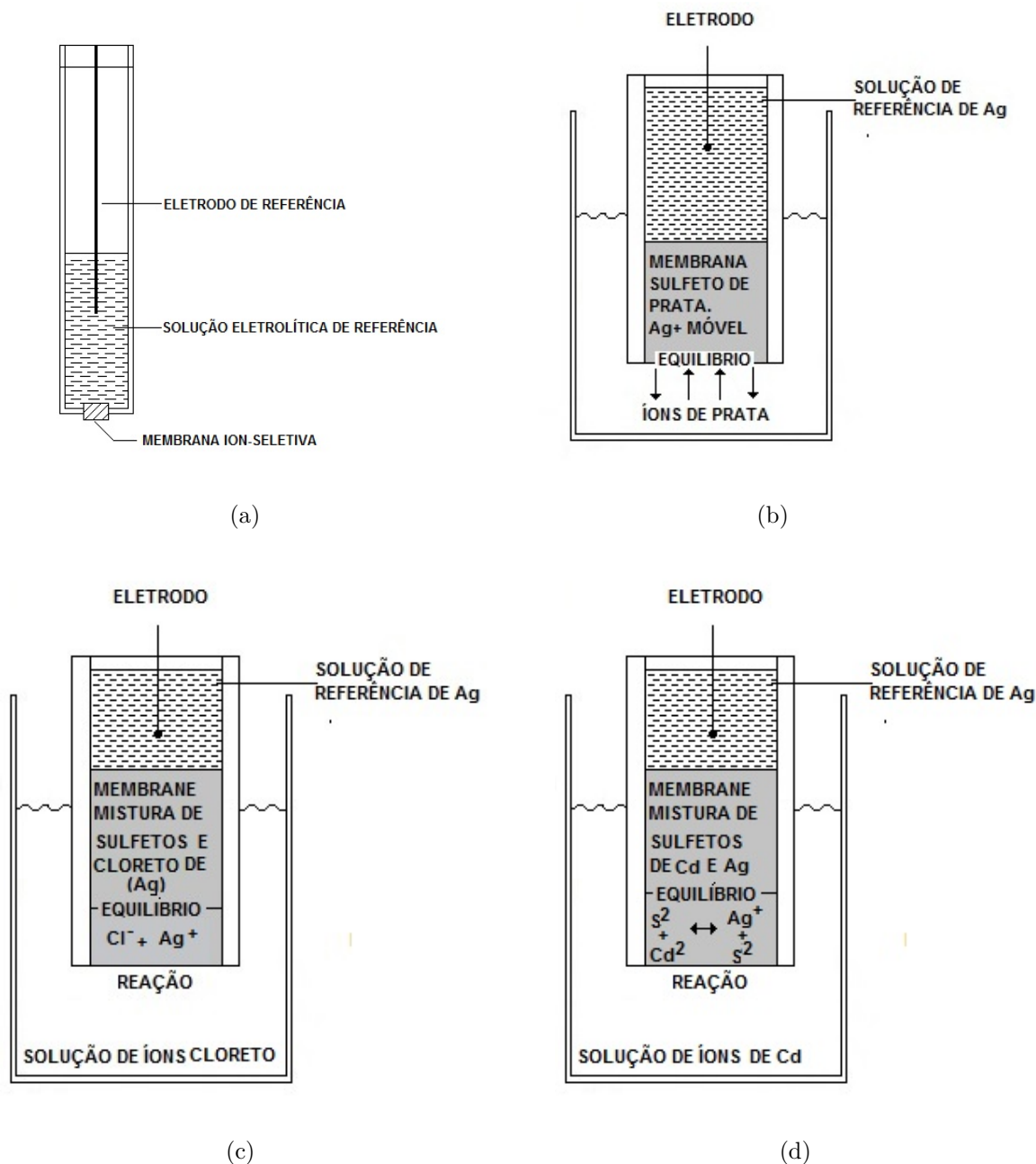
Tabela 7 – Tabela eletrodo íon-seletivo

	Íon de teste	Material da membrana	íons interferentes
Eletrodos de estado sólido	Fluoreto	LaF	I^- Br^- Cl^-
	Cloreto	AgCl/Ag ² S	S^- I^-
	Brometo	AgBr/Ag ² S	S^- I^-
	Iodeto	AgI/Ag ² S	S^-
	Sulfito	AgI/Ag ² S	
	Cúprico	Ag ² S/CuS	Hg^+ Ag^+
	Plúmbico	Ag ² S/PbS	Hg^+ Ag^+
	Cádmio	Ag ² S/CdS	Hg^+ Ag^+ Cu^{2+}
Eletrodos de membrana líquida	Prata	Ag ² S	
	Potássio	Valinomicina em difenil-éter	
	Amônio	Macrotetrolides em tris(etil-hexil) fosfato	
	Cálcio	Dialquil fosfato de cálcio em dioctil fenil fosfato	
	Cálcio/Magnésio	Ácido dialquil fosfórico em álcool alifático	

Fonte: Adaptado de *Analytical Biochemistry* [56]

Um eletrodo concebido para medir a atividade de íons de prata (figura 14) usa uma membrana cristalina de sulfureto de prata. O equilíbrio entre os íons de prata móveis da membrana e os íons sulfeto de prata nas soluções resulta no desenvolvimento de uma diferença de potencial através da membrana.

Figura 13 – (a) Eletrodo íon seletivo, (b) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de primeira ordem, (c) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de segunda ordem e (d) Eletrodo de estado sólido que mostra uma resposta de terceira ordem.



Fonte: Adaptado de Analytical Biochemistry [56].

O eletrodo esquematizado na Figura 14(b) pode ser modificado pela incorporação de cloreto de prata na membrana para permitir a atividade de íons cloreto em uma amostra a ser medida. Uma reação superficial entre os íons cloreto do teste e os íons de prata de membrana altera a atividade do último, resultando numa mudança na diferença de potencial através da membrana.

Em eletrodos de estado sólido a membrana é um disco sólido de um material cristalino relativamente insolúvel, que mostra uma elevada especificidade para um íon particular. A membrana permite movimento de íons no interior da estrutura da rede cristalina. Estes normalmente têm a menor carga e diâmetro. Assim, apenas os íons que são muito semelhantes para os íons móveis internos podem ter acesso à membrana a partir do exterior, uma característica que lhe dá cristais membranas sua elevada especificidade. Quando o eletrodo é imerso na solução de amostra, um equilíbrio é estabelecido entre os íons móveis no cristal e íons similares presentes na solução e o potencial resultante criado através da membrana pode ser medida pela maneira habitual. As membranas de estado sólido mais simples são projetadas para medir íons de teste, que são também os íons móveis do cristal (resposta de primeira ordem) e são usualmente cristais com a substância única (Figura 14(b)). Em alternativa, a substância de teste pode ser envolvida em uma ou duas reações químicas na superfície do eletrodo que alteram a atividade do íon móvel na membrana (Figuras 14(c) e 14(d)). Estas membranas, que são muitas vezes misturas de substâncias, são ditas para mostrar as respostas de segunda e de terceira ordem. Embora apenas um seletividade de eletrodos que mostram as respostas de segunda e de terceira ordem é reduzida. Eletrodos líquidos de membrana consistem de um material íon-seletivo dissolvido em um número limitado de íons.

Uma modificação alternativa ao eletrodo descrito na Figura 14(b) irá permitir a medição de íons de cádmio em solução. A membrana é composta por uma mistura de prata e sulfetos de cádmio. A reação superficial entre os íons de cádmio na solução teste e os íons sulfeto na membrana irá afetar o equilíbrio entre os íons sulfeto e os íons de prata na membrana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia de Materiais (LEM) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, MG). A seguir são apresentadas as seções de materiais e métodos utilizados no trabalho.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matéria-prima (leite)

O leite utilizado, tipo A, da região de Juiz de Fora, estava na forma fluida, pasteurizado, dentro do prazo de validade, embalado em sacos plásticos e comprado no mercado local. Durante o processo de teste o leite foi mantido na própria embalagem, em refrigeração por até 24 horas. Após esse prazo, o leite foi descartado e substituído por um produto novo. Antes do início de cada fase do experimento, uma amostra de leite de 50 ml foi analisada quanto aos seus constituintes (gordura, proteína e lactose) pelo Lactoscope, modelo C4-3.0 da Delta Instruments, tendo como resultado sempre os limites normais dos referidos constituintes. Após o recebimento, foi retirada uma amostra e esta submetida ao teste do alizarol (75 °GL), sem que em nenhum momento fossem identificados grumos ou mudança de cor que indicasse leite ácido ou baixa estabilidade térmica.

4.1.2 Vidrarias

Nos experimentos foram utilizados béckers de (1000, 250 e 50) ml. Foram também usados erlenmeyers de 125 ml, balão volumétrico de 100 ml e outras vidrarias auxiliares como proveta, pipetas graduadas de 5 e 10 ml e pipetas de Pasteur. Para as análises de acidez titulável foi utilizada uma bureta de 50 ml. O processo de acidificação das amostras de leite foi feito com uma pipeta automática (P100) da marca Labmate soft.

4.1.3 Reagentes

O reagente de alizarol (solução de alizarina em etanol 75 °GL), as soluções de calibração de pH nos valores 4,0 e 7,0 e a solução Dornic (hidróxido de sódio $\frac{1}{9}$ N, $f_c = 0,981246098$) foram obtidos no comércio local. Ácido láctico 85% e bifitalato de potássio P.A. foram cedidos pela Faculdade de Farmácia (UFJF). Etanol (92,8 °GL), cloreto de sódio (grau alimentício) e gelo, utilizados na manutenção da temperatura das amostras, foram adquiridos no comércio local.

4.1.4 Equipamentos

4.1.4.1 Equipamentos analíticos

O equipamento utilizado para a determinar o teor de proteínas, gordura e lactose, foi o Lactoscope modelo C4-3.0, fabricado pela Delta Instruments. A matéria-prima e as amostras foram armazenadas em baixa temperatura no refrigerador modelo compacto 80, fabricado pela Consul. Para a determinação do valor de pH e ponto de viragem na medição da acidez titulável, foi utilizado o Phmetro modelo MPA-210, fabricado pela Nova Orgânica. Termômetro digital modelo HI 98501-1, fabricado por Hanna Instruments.

4.1.4.2 Equipamentos eletrônicos e de medição

As medidas referentes ao ganho do amplificador, forma da onda e constante de tempo, foram realizadas pelo osciloscópio modelo MO-2025, fabricado pela Minipa. Multímetro digital ET-1501, Fonte de laboratório ajustável, modelo 72-2005, fabricada por Tenma. Gerador de função modelo MFG-4201A, fabricado pela Minipa. Estação de solda, modelo WESD51, fabricante Weller. Matriz de contatos, modelo PL 551, Pront O Labor. Kit Arduino UNO e eletrodo de pH, modelo AF405, fabricante TecnoPON.

4.1.5 Componentes eletrônicos

Relação de componentes utilizados no projeto e desenvolvimento do dispositivo para medição de pH e acidez titulável: microcontrolador Atmega 328P-PU, CI 4066, CI ca3140, CI 7812, CI 7912, diodo 2w10, placa universal ilha, potenciômetro multivoltas trimpot modelo 3006p 20 $k\Omega$, potenciômetro trimpot modelo 3386f 50 $k\Omega$, capacitor eletrolítico radial 1.000 $\mu F/25V$, resistores de carbono 5% 1/8 W, Conector BNC macho, transformador 127/220V 18+18V, Led azul 5 mm, fio de wire-wrap diversas cores, caixa plástica (35 × 65) mm, conector Molex macho e fêmea 6 vias,

4.2 MÉTODOS

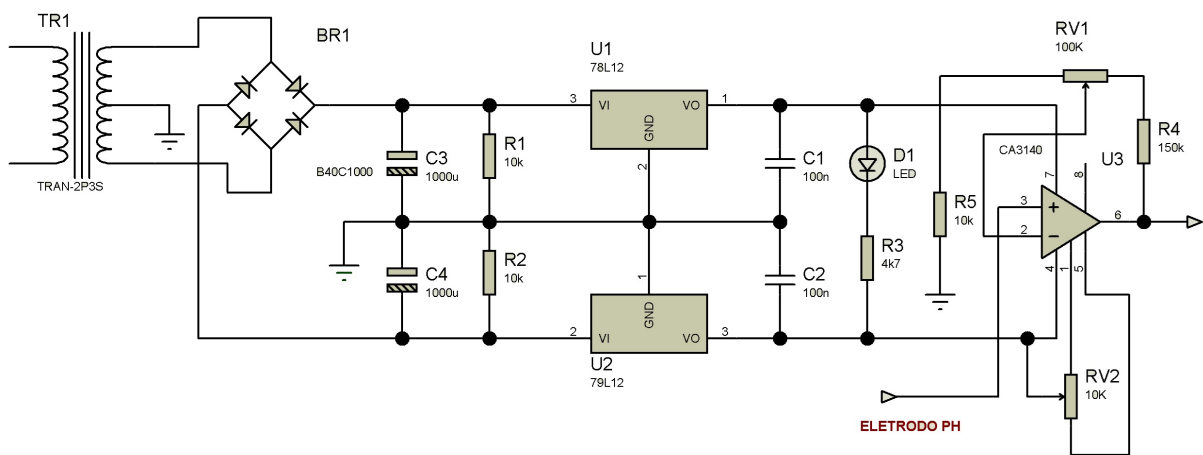
4.2.1 Descrição e funcionamento do circuito eletrônico

Devido à impossibilidade de se medir o potencial elétrico diretamente da sonda de pH em função da baixa impedância dos equipamentos de medida disponíveis, foi necessário a construção de uma amplificador com alta impedância de entrada.

Medir o potencial de entrada foi feito então de maneira indireta. O ganho do amplificador é conhecido (10), e o potencial de saída foi obtido conectando-se a saída do amplificador ao phmetro $A = \frac{V_o}{V_i}$. Foi escolhido o amplificador operacional CA3140, por ser um dispositivo BIMOS. A alta impedância de entrada ($\approx 1 T\Omega$) está garantida por um MOSFET. O amplificador operacional foi montado inicialmente em uma matriz de

contatos e posteriormente em uma placa universal ilha, a alimentação foi feita por uma fonte simétrica (-12V, +12V). A conexão com a sonda de pH se deu através de um conector BNC fêmea ligado à placa por um segmento de 5 cm de cabo coaxial. Devido aos baixos níveis de tensão em uso no experimento, foram tomados cuidados especiais (blindagem, desacoplamentos) para que não houvessem interferências de sinais espúrios. Durante o processo de medidas sempre que o sensor não estava em uso, sua ponta ficava dentro de uma solução de KCl com concentração de 3M.

Figura 14 – Amplificador com fonte



Fonte: Próprio autor

O método potenciométrico fez uso do medidor de pH (MPA 210). Este equipamento possui uma escala de pH e outra em mV. O eletrodo de pH modelo AF405, fabricado pela Tecnopon, possui as seguintes características,

- Sistema de referência único Ag/AgCl e KCl 3M;
- Junção: cerâmica, / 15-20 uL/H;
- Escala de pH: 0 a 14 pH;
- Escala de temperatura: 5 a 90 °C;
- Material do corpo: Vidro; Isopotencial: pH $7,0 \pm 0,5$;
- Resistência: 200 M Ω .

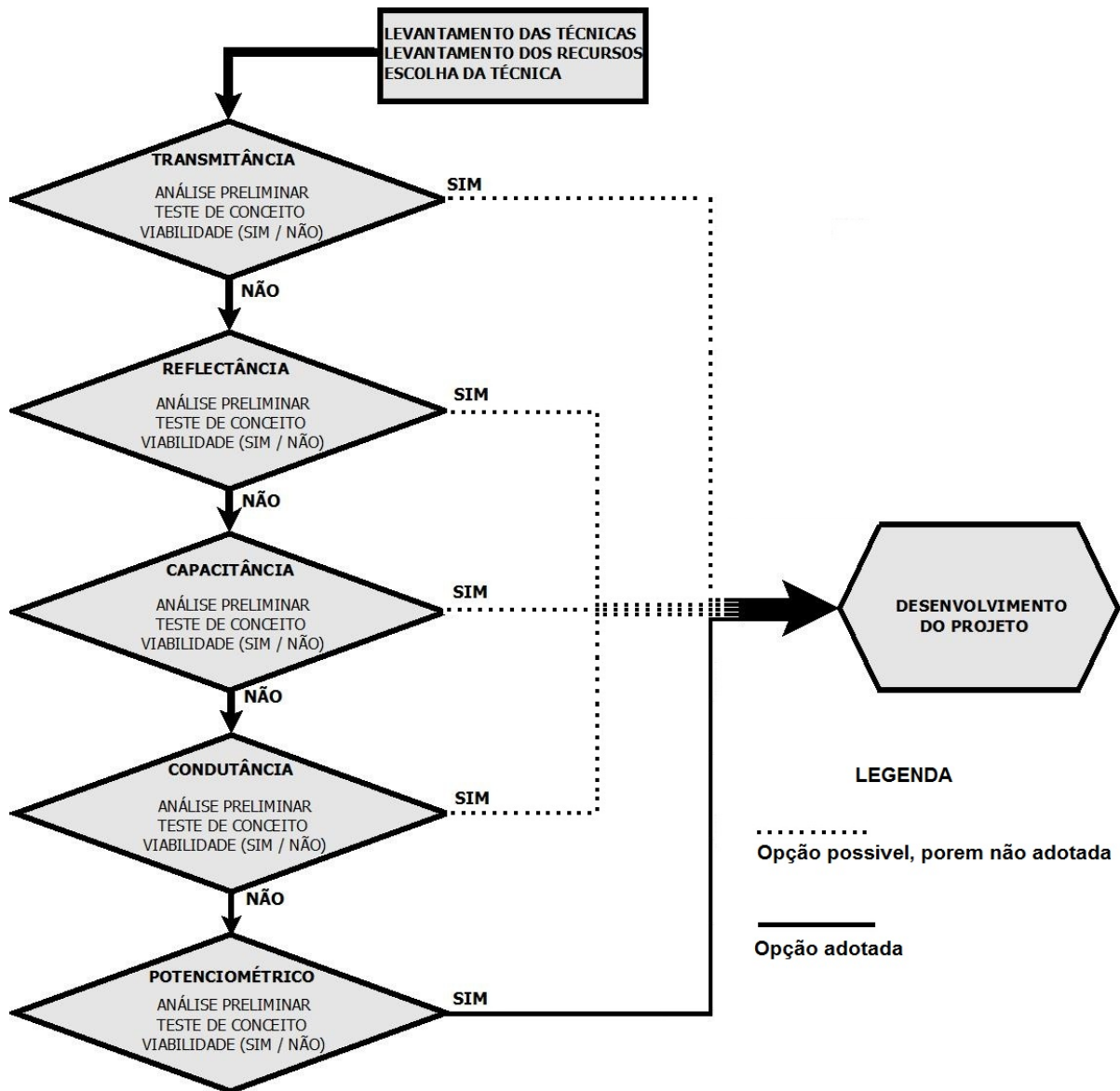
4.2.2 Pesquisa exploratória (*screening*)

Os métodos de *screenings* são levantamentos expeditos que têm como função confirmar ou não a suspeita de contaminação numa determinada área de interesse, através de técnicas que economizem tempo e investimentos.

A pesquisa exploratória é muito utilizada para realizar um estudo preliminar do principal objetivo da pesquisa que será realizada, ou seja, familiarizar-se com o fenômeno que está sendo investigado, de modo que a pesquisa subsequente possa ser concebida com uma maior compreensão e precisão. A pesquisa exploratória, que pode ser realizada através de diversas técnicas, geralmente com uma pequena amostra, permite ao pesquisador definir o seu problema de pesquisa e formular a sua hipótese com mais precisão. Ela também lhe permite escolher as técnicas mais adequadas para suas pesquisas e decidir sobre as questões que mais necessitam de atenção e investigação detalhada, e pode alertá-lo devido a potenciais dificuldades, as sensibilidades e as áreas de resistência. Como qualquer exploração, a pesquisa exploratória depende da intuição do explorador. Por ser um tipo de pesquisa muito específica, quase sempre ela assume a forma de um estudo de caso (GIL, 2008)[30]. Como parte do delineamento de pesquisa, esta foi subdividida em duas partes, a primeira consistiu na fase da pesquisa bibliográfica. Esta etapa é básica e obrigatória em qualquer modalidade de pesquisa e neste caso consistiu em leitura de material impresso (livros) ou leitura de material disponibilizado eletronicamente (artigos). A segunda parte foi a pesquisa experimental. Nesta abordagem, determina-se um objeto de estudo, identifica-se que variáveis participam e/ou interferem no processo, verifica-se a existência (ou não) de relações de dependência entre as variáveis, e, em uma outra etapa (geralmente denominada de pesquisa aplicada), analisa-se a sua aplicabilidade prática, ou seja, de que modo esta pesquisa pode ser utilizada para interferir na realidade.

Especificamente no desenvolvimento deste projeto, a pesquisa exploratória foi utilizada visando-se estabelecer a princípio qual técnica obteria os melhores resultados com os recursos disponíveis (Refletância, Transmitância, Capacitância, Condutância e Análise Potenciométrica) conforme figura 15. Posteriormente após a definição pela abordagem Potenciométrica, a pesquisa exploratória foi novamente aplicada na elaboração dos padrões de acidez que foram utilizados para definir o range das amostras entre 14 e 18 °D, que foi a base de todo o experimento.

Figura 15 – Diagrama esquemático mostrando as grandezas físicas avaliadas nos experimentos exploratórios na busca de um modelo capaz de prever o pH e a acidez do leite.



Fonte: Próprio autor

4.2.3 Análise de qualidade da matéria-prima (leite)

Todas as amostras utilizadas nos testes foram submetidas a análise com o teste do alizarol. Posteriormente, as mesmas amostras passaram pela quantificação dos seguintes constituintes, proteínas, gordura e lactose, feita pelo lactoscope. Na tabela 8 representamos o modelo do resultado da análise.

Tabela 8 – Resultado das medidas de gordura, proteína, lactose e sólidos totais para o leite utilizado nos experimentos.

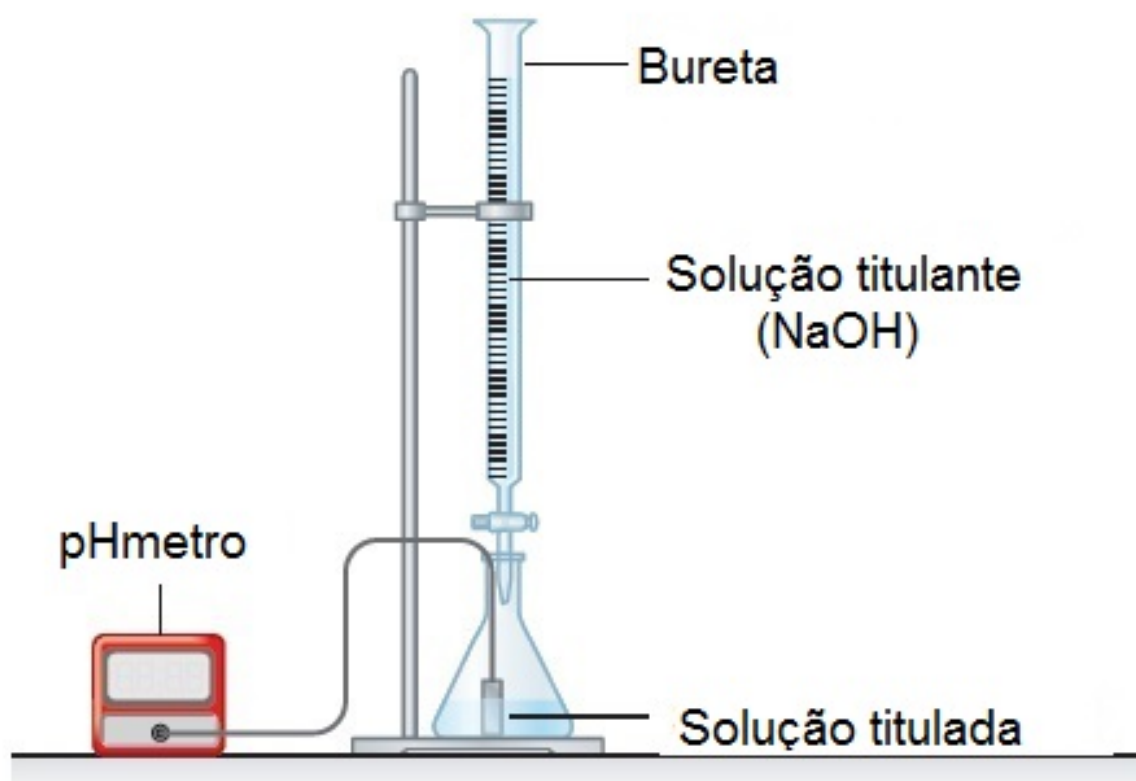
Instrumento Zerado				
Data & Tempo: 09-09-2014 13:01:17				
Nome do Produto : Leite Integral Pasteurizado				
Replica	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos
1	2,72	2,98	4,52	10,23
2	2,73	3	4,53	10,26

Valores em percentual

Fonte: Próprio autor

Finalmente, foram realizadas medidas de acidez titulável com bureta graduada, termômetro digital, líquido de neutralização (NaOH) e phmetro digital para marcar o ponto de viragem, conforme figura 16.

Figura 16 – Montagem para titulação.



Fonte: Próprio autor

A determinação da acidez consistiu em titular uma amostra de leite com uma

solução de hidróxido de sódio (NaOH , $\frac{1}{9}$ N), utilizando como indicador uma solução alcoólica de fenolftaleína, até o aparecimento da coloração rósea, que se mantém por 30 segundos. Quatro gotas (1 mL) de fenolftaleína são adicionadas a aproximadamente 10 mL de leite e o hidróxido de sódio é então gotejado para o leite por meio de uma bureta. A fenolftaleína é incolor em solução ácida e rósea, em meio alcalino. Assim que ocorra a neutralização da acidez presente na amostra, a primeira gota da solução alcalina em excesso tornará o indicador róseo, sendo este, portanto, o ponto de viragem. Neste processo, o ponto de viragem depende, da avaliação humana e de uma padronização da intensidade da cor. A acidez nesse caso pode ser expressa em porcentagem de ácido láctico ou graus Dornic ($^{\circ}\text{D}$) e varia de 0,12 a 0,23% de ácido láctico. Cada mL de NaOH irá neutralizar 0,009g de ácido láctico. Um leite normal irá apresentar acidez titulável na faixa de 16 a 18 graus Dornic. Neste trabalho, este método foi modificado, substituímos a imprecisão do fator humano pela inserção de um eletrodo de pH ligado a um phmetro e observamos o valor do pH, que deverá estar em torno de 8,3 – 8,6 no leite.

4.2.4 Análise estatística dos resultados

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o software SAS versão 9.3. Frequentemente, em uma pesquisa procura-se verificar se existe relação entre duas ou mais variáveis, isto é, saber se as alterações sofridas por uma das variáveis são acompanhadas por alterações nas outras. Procuramos estabelecer uma correlação, ($A \rightleftharpoons B$). Esta correlação é usada em estatística para designar a força que mantém unidos dois conjuntos de valores. A verificação da existência e do grau de relação entre as variáveis é o objeto de estudo da correlação. Os pares de valores das duas variáveis poderão ser colocados num diagrama cartesiano chamado “diagrama de dispersão”. A vantagem de construir um diagrama de dispersão está em que, muitas vezes sua simples observação já nos dá uma idéia bastante boa de como as duas variáveis se relacionam.

A análise dos resultados foi feita verificando-se a existência de correlação (duas variáveis estão relacionadas se a mudança de uma provoca a mudança na outra) entre as diversas variáveis envolvidas na pesquisa. Entretanto, antes de se aplicar os métodos de análise, algumas questões deveriam ser respondidas:

- Verificar a existência de algum efeito da temperatura na tensão produzida no eletrodo, caso exista, determinar a intensidade desta correlação.
- Verificar a existência de algum efeito da quantidade de ácido na tensão produzida pelo eletrodo, caso exista, determinar a intensidade desta correlação.
- Verificar a existência de algum efeito da quantidade de ácido na acidez em graus Dornic, caso exista, determinar a intensidade desta correlação.

- Verificar a existência de correlação entre acidez titulável e pH, determinar a intensidade desta relação.

Todas as propostas de correlação verificadas foram verdadeiras, isto é, a correlação se confirmou. A análise dos dados foi feita pelo SAS Statistical Analysis System, utilizando seu módulo de Correlação de Pearson. O coeficiente de correlação de Pearson (r) ou o r de Pearson mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas. É um índice adimensional com valores situados ente -1,0 e 1.0 inclusive, que reflete a intensidade de uma relação linear entre dois conjuntos de dados e sua fórmula está representada na equação 4.1.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (xy) - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x \sum_{i=1}^n y}{n} \right)}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n x^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x \right)^2}{n} \right] \times \left[\sum_{i=1}^n y^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n y \right)^2}{n} \right]}} \quad (4.1)$$

No numerador da equação 4.1, temos o somatório do produto das variáveis (x,y) e no denominador a raiz do produto do desvio padrão das variáveis x e y. Quando $r= 1$, significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis. Quando $r= -1$ significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, isto é, se uma aumenta, a outra sempre diminui. Quando $r= 0$ significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. No entanto, pode existir uma outra dependência que seja "não linear". Assim, o resultado $r=0$ deve ser investigado por outros meios. A representação da correlação linear para o r se dá quando os dados correspondem a uma amostra. Quando os dados correspondem a uma população a correlação é representada por ρ . Nos resultados obtidos pelo SAS aparece r^2 (coeficiente de determinação), que corresponde a r (coeficiente de correlação) elevado ao quadrado. Referimo-nos ao r^2 como a quantidade de variabilidade nos dados que é explicada pelo modelo de regressão ajustado. Dada uma coleção de dados amostrais emparelhados, a seguinte equação de regressão descreve a relação entre as duas variáveis.

O gráfico da equação é chamado reta de regressão (ou reta de melhor ajuste, ou reta de mínimos quadrados).

$$Y = \alpha + \beta X \quad (4.2)$$

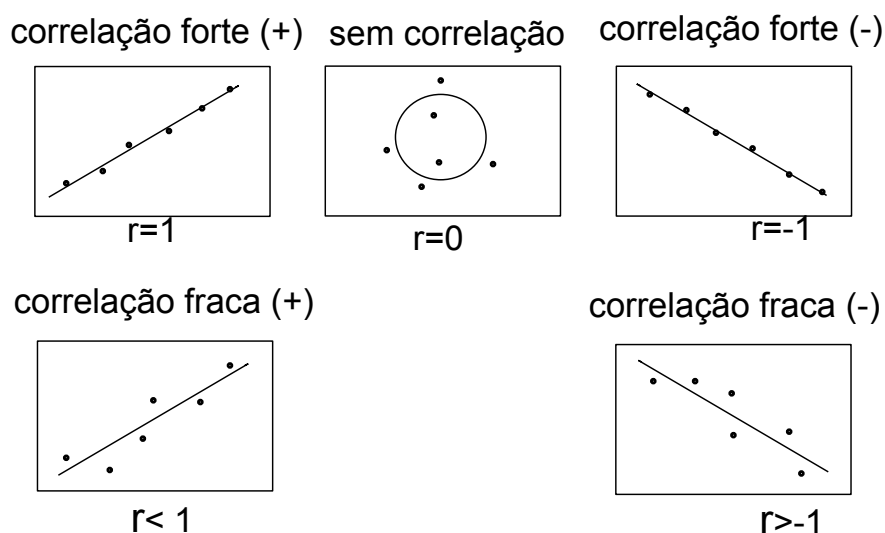
Sendo β o coeficiente angular, α o coeficiente linear, Y é a variável dependente, X é a variável independente, e α e β são os coeficientes do modelo.

Todas as análises realizadas neste trabalho fizeram uso de regressão linear simples. O modelo matemático mais empregado para tentar explicar o efeito dos tratamentos na

variável resposta foi o modelo polinomial, os mais utilizados foram o de primeiro e segundo graus.

A figura 17 ilustra a análise gráfica dos padrões de dispersão.

Figura 17 – Padrões de dispersão



Fonte: Próprio autor

4.2.5 Definição da faixa operacional de acidificação do leite

A filosofia da análise exploratória foi utilizada para a determinação das quantidades de leite e ácido láctico que deveriam fazer parte da solução (amostra sob teste). A quantidade de leite foi definida principalmente pelo fato do eletrodo ter que estar com sua ponta totalmente submersa e para isso, foi escolhido um becker de 50 *ml*. Verificamos que bastariam 20 *ml* de leite, evitando o desperdício e permitindo uma margem de segurança para que o leite não entornasse do becker. Quanto a quantidade de ácido da amostra elaboramos uma metodologia baseada em testes empíricos. Foram preparados 11 beckers com capacidade de 50 *ml*, com 20 *ml* de leite em cada. Em seguida foi adicionado o ácido láctico, inicialmente 5 μ l no primeiro e nos seguintes foram sendo acrescentados mais 5 μ l, até o ultimo becker completar 50 μ l. Ficou estabelecido que só os valores de zero a 35 μ l estariam dentro da faixa que vai de (13 a 16) °D. O ponto de viragem tradicionalmente é definido pelo aparecimento de um tom rosa na solução. As normas recomendam que o ponto de viragem deva ter uma coloração semelhante a obtida com a mistura de 10 *ml* de leite com 1 *ml* de solução aquosa de fucsina a 0,00024%, ou com 1 *ml* da solução de acetato de rosanilina em 50 *ml* de etanol (95%), contendo 0,5 *ml* de ácido glacial. Entretanto este método depende de critérios pessoais de avaliação e percepção da cor e depende de um

técnico experiente. Portanto foi utilizado o método que substitui a percepção de cor, pelo valor do pH determinado por um phmetro.

4.2.6 Coleta de dados e construção dos modelos de calibração

No início de cada utilização do phmetro foi feita a sua calibração. A leitura da sensibilidade do pHmetro durante a sua calibração estavam próximos a 100%. Os padrões utilizados (pH 4 e pH 7) estavam dentro do prazo de validade e à temperatura ambiente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADO ÀS ANÁLISES EXPLORATÓRIAS (*screening*)

Existem várias causas que podem interferir na acidez do leite. A tabela abaixo favorece a interpretação de dados obtidos em análises (Ronon, 1983)

Tabela 9 – Tabela de correlação entre pH e acidez titulável

pH	Acidez (°D)	Interpretação
6,6 - 6,8	15 - 18	Leite Normal Fresco
> 6,9	< 15	Leite alcalino
6,5 - 6,6	19 - 20	Leite Ligeiramente ácido
6,4	± 20	Leite não resiste 110 °C
6,3	± 22	Leite não resiste 100 °C
6,1	≥ 24	leite não suporte a pasteurização (72 °C)
5,2	55 - 60	Leite começa a flocular
6,5	9 - 13	Soro de leite (fresco)

Fonte: Adaptado de [12]

O leite instável não ácido é responsável por uma perda estimada em aproximadamente 30 % de todo material recusado como leite ácido, diminuindo o fornecimento da matéria-prima dos laticínios. Não foi objetivo deste trabalho identificar os fatores que levam ao aparecimento do LINA, ou suas causas, mas sim desenvolver uma metodologia ou equipamento que poderá minimizar as perdas causadas por ele.

5.2 RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO

5.2.1 Regressão entre quantidade de ácido láctico adicionado ao leite e tensão (mV) no eletrodo

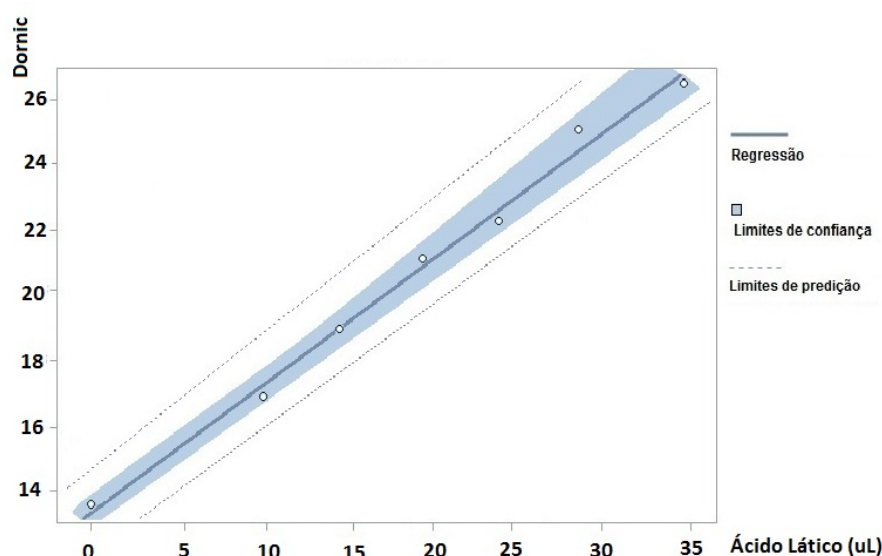
5.2.1.1 Experimento para determinar as quantidades de ácido láctico a serem adicionadas ao leite a fim de simular sua acidificação natural

Inicialmente, um experimento foi realizado para determinar o volume de ácido láctico necessário para acidificar amostras de leite, na mesma faixa de valores que ocorrem em sua fermentação natural. Os valores de acidificação foram expressos em graus Dornic. Os experimentos foram feitos em três repetições e as concentrações utilizadas estão descritas a seguir. Foram colocados alíquotas de 20 ml de leite em dez béquers de 50 ml. Cada béquer recebeu um volume entre (0 e 50) microlitros de ácido láctico (85% de pureza), distribuídos de forma crescente entre os béquers. A acidez dessas amostras foi medida

a partir do volume consumido de NaOH 1/9 N, fator de correção igual a 0.981246098, durante a titulação, usando uma bureta de 50 ml. O ponto final da titulação foi indicado pelo valor de pH igual a 8,3 medido com precisão numérica de duas casas decimais, com um pHmetro de bancada da marca Nova Orgânica, modelo mPA-210. A regressão feita a partir dos dados coletados nesse experimento está apresentada a seguir.

O modelo regressor foi significativo pelo teste F da análise de variância ($p < 0,0001$) e não apresentou falta de ajustamento ($p > 0,0987$). O r^2 do modelo é de 98,83%, com uma inclinação positiva da reta, como apresentado na figura 18.

Figura 18 – Acidez titulavel (Dornic) x Quantidade de ácido láctico (uL)



Fonte: Próprio autor

O modelo de regressão resultou na seguinte equação da reta:

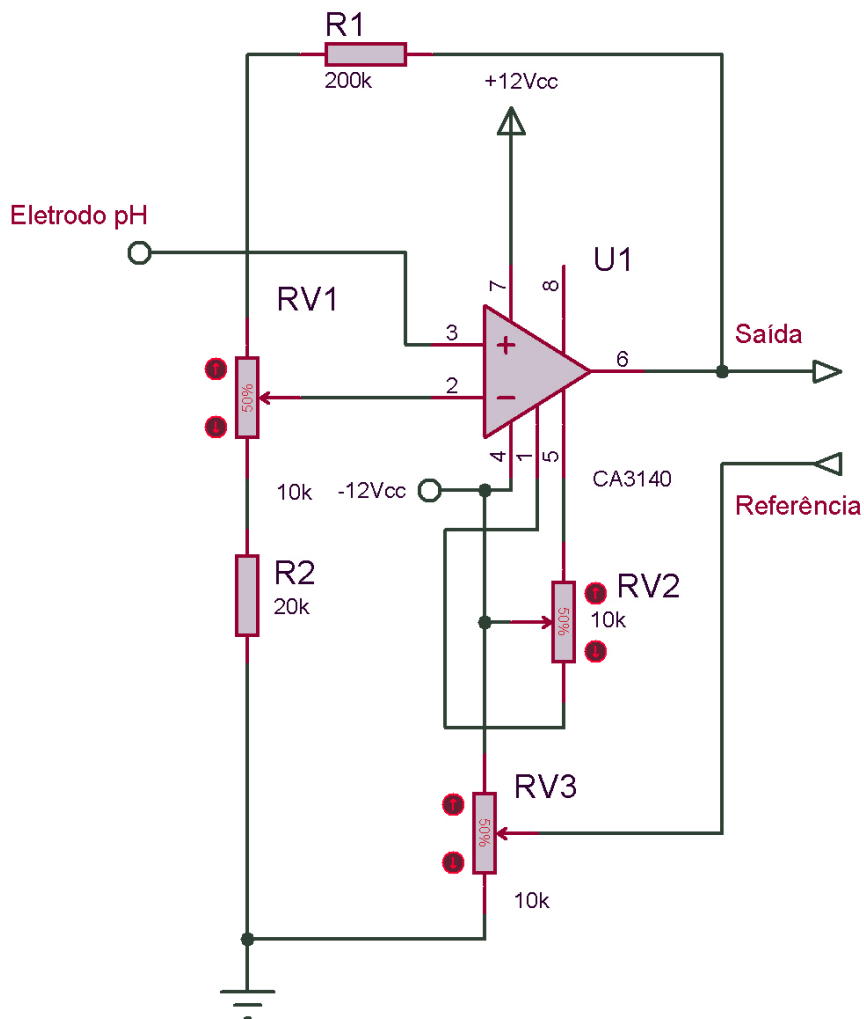
$$y = 12,32 + 0,38x \quad (5.1)$$

5.2.1.2 Análise da correlação entre tensão no eletrodo de pH e quantidade de ácido adicionado ao leite

Nesta etapa, foi realizado um experimento para avaliar correlação entre a tensão, em milivolts, obtida a partir de um eletrodo de pH e a quantidade de ácido presente no leite. Foi utilizado um eletrodo de pH de vidro, da marca TecnoPON e modelo SC06. O sinal elétrico nos terminais desse eletrodo foi condicionado por um circuito eletrônico externo, contendo o amplificador operacional CA3140, que possui alta impedância de entrada. O amplificador foi ajustado para que o seu ganho fosse igual a 10. O circuito utilizado está esquematizado na Figura 19. O circuito foi acondicionado em uma caixa

plástica com um conector BNC macho para a conexão com o terminal do eletrodo. A saída do amplificador foi ligada primeiramente com um multímetro digital e posteriormente com o próprio phmetro com escala ajustada para mV. Na figura 19 circuito amplificador e condicionador do sinal elétrico gerado pelo eletrodo de pH.

Figura 19 – Diagrama elétrico do circuito amplificador de alta impedância de ganho 10, utilizado para condicionamento do sinal na saída do eletrodo de pH. Sendo R1 e R2 resistores, RV1, RV2 e RV3, resistores variáveis (Trimpot) e U1 amplificador operacional (Ampop).



Fonte: Próprio autor

Todo o experimento foi realizado em três repetições reais, e as amostras foram preparadas colocando-se alíquotas de 20 ml de leite em béquers de 50 ml. Em cada béquer foi adicionado as quantidades de ácido láctico (85% de pureza) descritas na Tabela 10.

Tabela 10 – Volume de ácido láctico adicionado aos béquers no experimento realizado para avaliar a correlação entre tensão (em milivolts) no eletrodo de pH e diferentes quantidades de ácido láctico adicionadas ao leite.

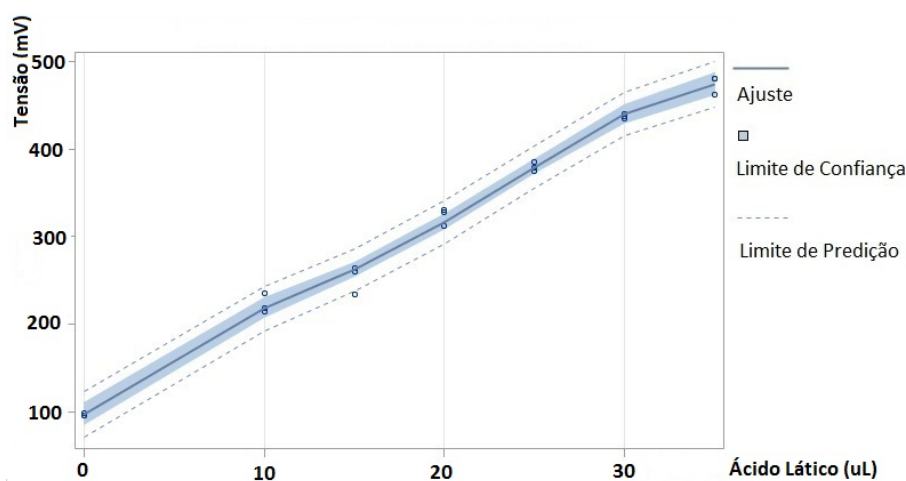
becker 1	becker 2	becker 3	becker 4	becker 5	becker 6	becker 7
0	10	15	20	25	30	35

Fonte: Próprio autor

O limite máximo para a quantidade de ácido apresentado na Tabela 10 foi determinado a partir do experimento preliminar apresentado anteriormente, em que foi feita uma regressão entre os valores de acidez, expressos em graus Dornic, e os volumes de ácido láctico adicionado ao leite. Antes de serem efetivamente utilizadas, todas as amostras de leite foram aprovadas no teste do álcool (72%) e do alizarol. Os resultados das medidas de tensão elétrica em função do volume de ácido estão apresentados nesta seção.

O modelo regressor foi significativo pelo teste F da análise de variância ($p < 0,0001$) e não apresentou falta de ajustamento ($p > 0,0928$). O r^2 do modelo é de 99,43%, com uma inclinação positiva da reta, com apresentado na figura 20.

Figura 20 – Gráfico de regressão entre as variáveis Tensão em mV e quantidade de ácido láctico



Fonte: Próprio autor

O modelo de regressão resultou na seguinte equação da reta:

$$y = 96,64 + 19,80x \quad (5.2)$$

5.2.2 Regressão entre quantidade de ácido láctico adicionado ao leite vs. pH

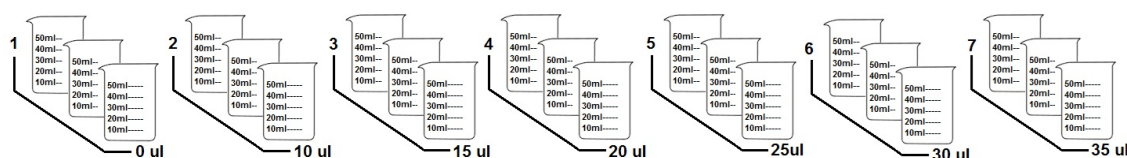
Neste teste o objetivo foi o de verificar se há alguma correlação entre o potencial elétrico da célula de pH (em mV) e a quantidade de ácido láctico adicionado às amostras.

O procedimento foi o seguinte: Separou-se e identificou-se 7 béquers de 50 *ml*. Em cada béquer foi colocado 20 *ml* de leite. Foram colocados os seguintes volumes de ácido láctico nos béquers:

- Béquer1: 0 μ l, Béquer2: 10 μ l, Béquer3: 15 μ l, Béquer4: 20 μ l, Béquer5: 25 μ l, Béquer6: 30 μ l, Béquer7: 35 μ l

Para cada béquer foi feita a leitura em mV (milivolts), utilizando uma sonda (eletrodo) de pH conectada em um circuito amplificador de alta impedância de entrada. O ganho do amplificador foi ajustado para 10. Todas essas análises foram feitas em 3 repetições (a partir de um único pacote de leite), como representado na figura 21.

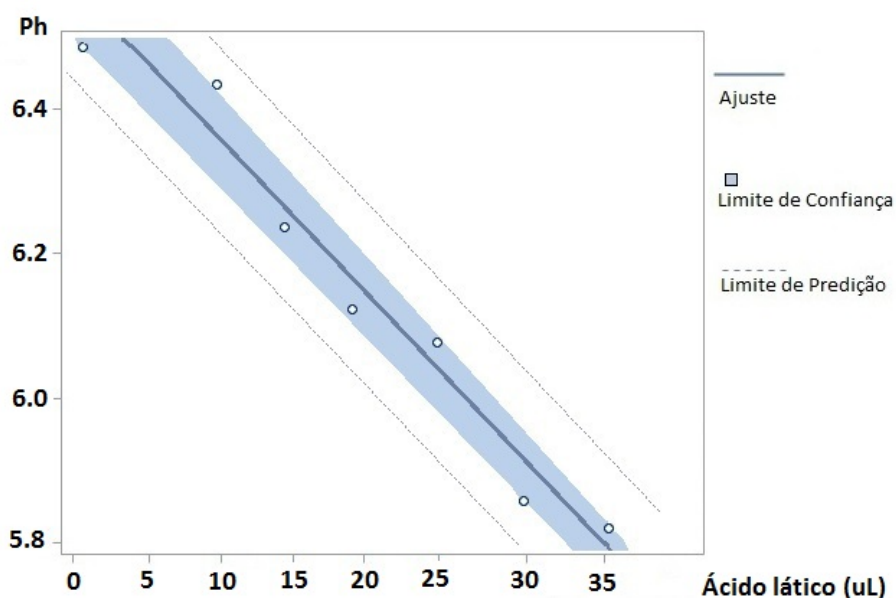
Figura 21 – Becker



Fonte: Próprio autor

O modelo regressor foi significativo pelo teste F da análise de variância ($p < 0,0001$) e não apresentou falta de ajustamento ($p > 0,0947$). O r^2 do modelo é de 95,04%, como uma inclinação negativa da reta, como apresentado na figura 22.

Figura 22 – Gráfico de regressão entre as variáveis pH e quantidade ácido láctico (uL)



Fonte: Próprio autor

O modelo de regressão resultou na seguinte equação da reta:

$$y = 6,59 - 0,02x \quad (5.3)$$

5.2.3 Regressão entre pH e acidez titulável(°D)

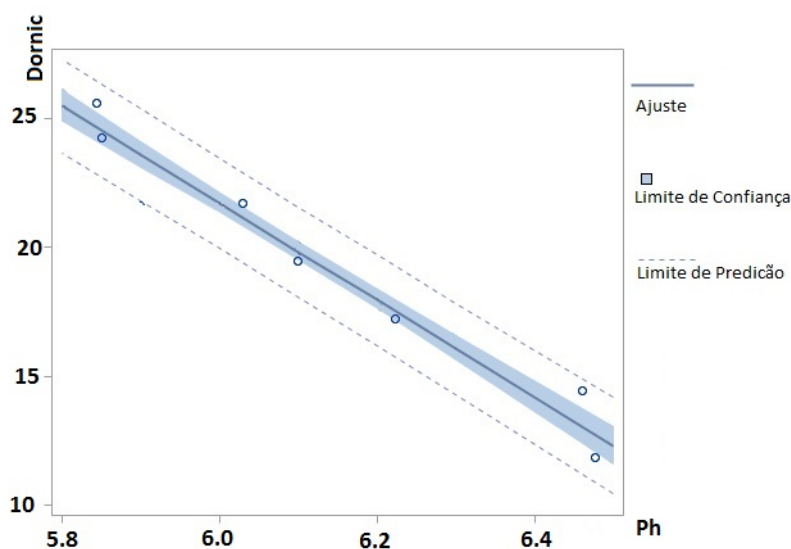
Com o intuito de expandir as funcionalidades do equipamento e de consolidar uma técnica confiável para a determinação de um leite estável termicamente, elaboramos um novo experimento. Desta vez buscávamos relacionar a acidez titulável ao valor de pH. O procedimento foi o seguinte: Separou-se e identificou-se 7 béquers de 50 ml Em cada béquer foi colocado 20 ml de leite. Foram colocados os seguintes volumes de ácido láctico nos béquers:

Béquer 1: 0 microlitros Béquer 2: 10 microlitros Béquer 3: 15 microlitros Béquer 4: 20 microlitros Béquer 5: 25 microlitros Béquer 6: 30 microlitros Béquer 7: 35 microlitros

Utilizando o phmetro da marca Nova Orgânica, modelo mPA-210, devidamente calibrado e com sensor de temperatura, e um eletrodo de medição de pH de vidro, da marca Tecnopon e modelo SC06, foram feitas as medidas de pH. Após cada medida, a amostra era levada para a medição de acidez titulável. Para tanto foi utilizada uma bureta de vidro graduada, com uma solução de NaOH. A neutralização da acidez do leite foi levada até o ponto de viragem indicado pelo valor de pH igual a 8,3. Os resultados estabeleceram a correspondência entre os valores de pH e da acidez titulável. Existe uma correlação negativa entre as variáveis acidez Dornic e pH. A correlação encontrada foi de 99,00% e é significativa ($p < 0,0005$). A partir da análise de variância da regressão entre acidez Dornic e pH, podemos obter as seguintes informações:

A regressão linear de primeiro grau é significativa pelo teste F ($p < 0,0005$) da análise de variância, e não há falta de ajustamento desse modelo ($p < 0,0005$) pelo teste F da ANOVA, cujo denominador foi o erro puro. O r^2 do modelo é de 98,02%, com uma inclinação negativa da reta, com apresentado na figura 23.

Figura 23 – Gráfico de regressão entre as variáveis acidez titulável (Dornic) x pH



Fonte: Próprio autor

O modelo de regressão resultou na seguinte equação da reta:

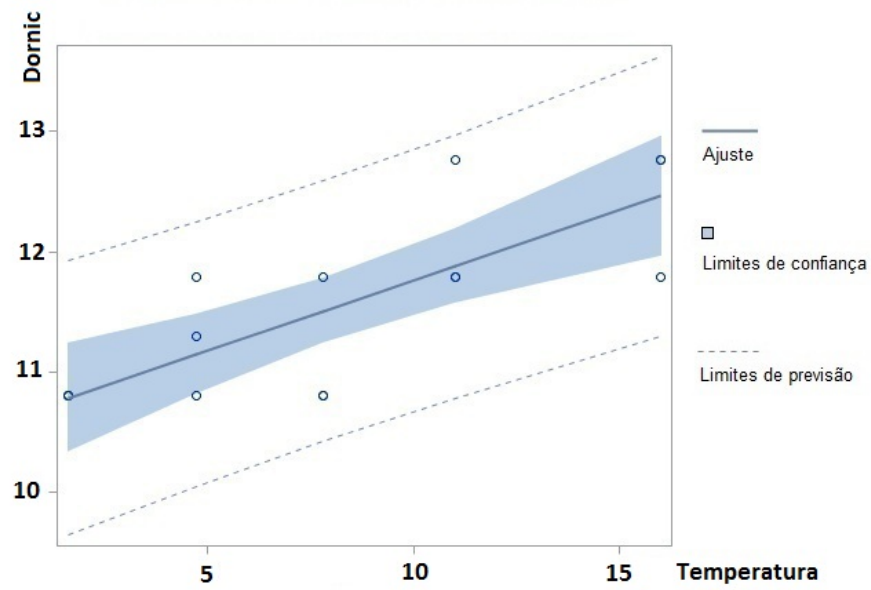
$$y = 114,49 - 15,26x \quad (5.4)$$

5.2.4 Análise do efeito da temperatura sobre a acidez titulável (°D)

As análises do SAS mostram que: existe uma correlação positiva entre as variáveis acidez Dornic e Temperatura e esse efeito não pode ser desprezado nos futuros procedimentos de calibração do protótipo. A correlação encontrada foi de 78,92% e é significativa ($p < 0,0005$), conforme apresentado pelo procedimento de correlações e medidas de associação do SAS. A partir da análise de variância da regressão entre acidez Dornic e Temperatura, podemos obter as seguintes informações:

A regressão linear de primeiro grau é significativa pelo teste F ($p < 0,0005$) da análise de variância, e não há falta de ajustamento desse modelo ($p < 0,4716$) pelo teste F da ANOVA, cujo denominador foi o erro puro. Embora o r^2 tenha sido relativamente pequeno (62,29%), o modelo regressor não será descartado, visto que os coeficientes linear e angular foram ambos significativos pelo teste-t ($p < 0,0005$).

Figura 24 – Gráfico de regressão entre as variáveis acidez e temperatura



Fonte: Próprio autor

O modelo de regressão resultou na seguinte equação da reta:

$$y = 10,59 + 0,11x \quad (5.5)$$

6 CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos em levantamento bibliográfico de casos tratados no sul do Brasil, foi estimado que em torno de 30 % das perdas apontadas como leite ácido podem estar de fato sendo erroneamente classificadas, uma vez que o teste padrão (alizarol) não distingue o leite verdadeiramente ácido do leite com LINA (falso positivo). Não existe uma estatística de LINA para todo o Brasil, por isso acreditamos que a situação possa ser bem pior do que a da região sul. O leite com LINA fica instável na presença de álcool. Entretanto, se mantêm estável no tratamento térmico. Esta situação tende a agravar-se em função do aumento constante dos teores de álcool no alizarol, como *modus operandi* da indústria a fim de trabalhar com um leite de qualidade melhor (menor carga bacteriana). Através da pesquisa exploratória, algumas soluções foram propostas (sensor capacitivo, condutividade, transmitância, reflectância). Nas condições que se apresentaram durante o desenvolvimento do trabalho, o método potenciométrico se mostrou plenamente adequado. Para que este procedimento pudesse ser implementado, foi necessário relacionar pH com acidez titulável. Para tanto, o primeiro passo consistiu em encontrar uma grandeza elétrica (tensão) que possuísse uma correspondência com valores em pH. Uma vez encontrada, foi desenvolvida uma alternativa viável para uso em campo de um identificador de acidez confiável, simples e barato em substituição ao teste do alizarol. Foram também correlacionados: volume de ácido láctico (μL) com acidez titulável ($^{\circ}D$), Tensão (mV) com volume de ácido láctico (μL), pH com volume de ácido láctico (μL), acidez titulável com pH e acidez titulável com temperatura. Acredita-se que a importância da substituição do método vigente para detecção de leite ácido, por um mais eficiente, poderia ser amplamente justificado, se houvessem trabalhos como os desenvolvidos no sul, para identificação de LINA em todo o território brasileiro. Com a adoção do álcool a 80 % no alizarol pelos laticínios, a situação tende a se agravar, pois a quantidade de leite rejeitado, conforme relatamos, tende a aumentar. Portanto, urge implantar uma alternativa para o alizarol, no que concerne à identificação precisa de leite ácido. Desta maneira, pode-se evitar perdas financeiras significativas para o produtor, falta de matéria prima para a indústria e, como consequência, o aumento de preço do leite para a população.

REFERÊNCIAS

- [1] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa 51, 18/09/2002.
- [2] Ciência y tecnologia de la leche: Principios y aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.
- [3] [http://lucitojal.blogspot.com.br/leite e derivados 15.html](http://lucitojal.blogspot.com.br/leite-e-derivados-15.html) acessado em 25/02/2015.
- [4] http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalle.php?idMateria=1525 acessado em 17/03/2015 as 13:57h.
- [5] <https://www.scotconsultoria.com.br/imprimir/leite/164>, Concentração chegou ao mercado do leite, Rafael Ribeiro de Lima Filho Quarta-feira, 15 de dezembro de 2010.
- [6] Simone do Amaral e Cristiana Basso, *Disciplinarum Scientia*. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 10, n. 1, p. 19-30, 2009.
- [7] A Importância Do Leite, Relatório apresentado para o Programa de Aprendizagem de Estágio Supervisionado em Indústria, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Curso de Farmácia.
- [8] Pieter Walstra, Robert Jenness, H. T. Badings, *Dairy chemistry and physics*, Wiley, 1984.
- [9] Filipe Pereira de Paula, Carlos Eduardo Cardoso e Maria Aparecida Carvalho Rangel, *Revista Eletrônica TECCEN*, Vassouras, v. 3, n. 4, p. 7-18, out./dez., 2010.
- [10] Plano mais pecuária / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília : MAPA/ACS, 2014.
- [11] Leite: Aspectos de Composição e Propriedades, Paulo Henrique Fonseca da Silva, Originalmente publicado em *Química Nova na Escola*, n. 6, novembro 1997.
- [12] Santos, E. C. e Rodrigues, R. Acidez do Leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 38(230) 9-17(1983).
- [13] IN62, 29/12/2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa 62.
- [14] Food Fraud Database. U.S. Pharmacopeial Convention. Acessado em 03.02.2015. URL: <https://www.foodfraud.org>.
- [15] Micro-organismos que Deterioram a Qualidade do Leite, Carla c. Lange e José R. F. Brito, agosto 2005.
- [16] Anais do V Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil: Sistemas de Produção Leiteira de Base Familiar como Forma de Fixação do Homem do Campo / organiza dores Geraldo Tadeu dos Santos et al. Maringá: Sthampa, 2012. 332p.
- [17] M.B.Zanela, Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA). 2004. 175f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

- [18] O'Connel, J. E.; Saracino, P.; Hupprtz, T.; Uniake, T.; DE Kruif, C. G.; Kelly, A. L.; Fox, P. F. Influence of ethanol on the rennet - induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research* , v. 73, p. 312 - 317, 2006.
- [19] O'Connel, J. E.; Kelly, A. L.; Fox, P. F.; DE Kruif, K. G. Mechanism for the ethanol dependent heat - induced dissociation of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , v. 49, p. 4424 - 4428, 2001.
- [20] <https://www.scotconsultoria.com.br/imprimir/leite/164> acessado em 18/04/2014.
- [21] http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno.
- [22] LOPES, L. C. Composição e Características Físico-químicas do Leite Instável Não Ácido (LINA) na Região de Casa Branca Estado de São Paulo. 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de pós-graduação em Zootecnia. Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- [23] Evolução do padrão do aleitamento materno. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 114, 2005.
- [24] Aleitamento do lactente: cuidados especiais. São Paulo: Santos, 1999.
- [25] Ocorrência de Leite Instável não Ácido na Região Oeste do Paraná, RECEN Guarapuava, Paraná v. 13 n^o 1 p. 101-112 jan/jun 2011 Itala Gouveia Marx, Tassyana Crespan Lazzarotto, Deisy Alessandra Drunkler, Eliane Colla.
- [26] Leite Instavel Não Ácido: um Problema Solucionavel? Leite instável não ácido: um problema solucionável? Fischer et al, 2011.
- [27] Bueno, V.F.F.; Mesquita, A.J.; Oliveira, A.N.; Nocolau, E.S.; Neves, R.B.S. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.15, n. 1, p. 40-44, 2008.
- [28] Marques, L. T. et al. Influencia da dieta sobre as propriedades físico- químicas do leite e a ocorrência do leite instável não ácido (Lina). In: Congresso Pan-Americano de Leite, 9., 2006, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, 2006b, p. 225-228.
- [29] Paez, R., Chavez, M, Negri, L.M., Costabel, L.M. , Cuatrin, A., Tave rna, M.A., Amerdht, P, Wanzenried, R. (2006) Estudio de la estabilidad térmica y al alcohol durante los días pos-parto en leche cruda de vaca. 9º Congreso Panamericano de la Leche, Porto Alegre, 20 al 23 de junio de 2006. Cópia electrónica, pp. 67-70.
- [30] GIL, Antonio Carlos. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2008.
- [31] Donnelly WJ & Horne DS 1986 Relationship between ethanol stability of bovine and natural variations in milk composition. *Journal of Dairy Research* 53 23–33.
- [32] Barros, L. Transtornos metalicos que afetam a qualidade do leite. In: Gonzales, F. H. D.; Durr, J. W.; Fontaleli, S. R. (Ed.). Uso do leite para monitorar a nutrição de vacas leiteiras . Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2001.
- [33] Barros, L.; Denis, N.; Gonzales, A. et al. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. *Pract. Vet.*, v.9, p.315, 1999.

- [34] Mónica S Chavez, Livia M Negri, Miguel A Taverna and Alejandra Cuatrín (2004). Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal of Dairy Research*, 71, pp 201-206. doi:10.1017/S0022029904000172.
- [35] Molina, L. H. et al. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de um centro de acopio lechero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 233-240, 2001.
- [36] Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Leite longa vida. 2007. Disponível em: <http://www.ablv.org.br/leiteLongaVida/index11.html>.
- [37] <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=27350&secao=Agrotemas> acessado em 21/05/2014.
- [38] Lin, M.J., M.J. Lewi and A.G. Grandison. 2003, Effect of pH on the calcium movement in milk between colloidal and ionic phases. IX World Conference on Animal Production, Anais... Porto Alegre, RS.
- [39] Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. e COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª ed. Trad. A.A. Simões e W.R.N. Lodi. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 46 - 47, 307, 323, 555 - 556.
- [40] Philpot, W. N.; Nickerson, C. *Vencendo a luta contra a mastite*. Westfalia Surge. Naperville, IL: Ed. Milkbizz, 2002.
- [41] Oliveira, Gislene Bremer. *Deteção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas*. 2009. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- [42] www.portaldiadecampo.com.br 20/12/2014.
- [43] Bradley, A.J.(2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal* 164 : 116-128.
- [44] Leitner, G.; Chaffer M.; Caraso Y. et al ., Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition fat, protein and lactose in Israeli Assaf and Awassi sheep. *Small Rumin Res.*, v.4, p.157-164, 2005.
- [45] Yoshida, S. Studies in the Utrecht abnormality of milk in the Miyuki Dairy Farm. *Journal Japanese Applied Biology Science* Hir. University, n.19, p.39-54, 1980.
- [46] Pecorari, M.; Fpssa E., Avansini, G.; Marian, P. Milk with abnormal coagulation: acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. *Sci. Tec. Latt. Cas.* v.35, n.4, p.263-278, 1984.
- [47] Sobhani,S; Valizadeh,R.; NA Serian,A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 80, Suppl. 1/J. Dairy Science, v. 85, Suppl. 1, 1998.
- [48] Ponce Ceballo, P. Síndrome do leite anormal e qualidade do leite. In: 1º Curso on line sobre qualidade do leite do Instituto Fernando Costa. <http://www.milkpoint.com.br> Acessado em nov./2000.

- [49] Barros, L; Denis, N; Gonzalez, A; Nunez, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. Rev. Prácticas Veterinarias, v.9, p.315, 1999.
- [50] Donatele, D.M.; Folly, M.M.; Vieira, L.F.P.; Teixeira, G.N. Estudo da relação da prova do álcool 72% (v/v) com pH, grau Dornic e contagem de células somáticas do leite de vacas do município de campos do Goytacazes, RJ In: XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária – CONBRAVET. Anais..., Brasília – DF, 2001.
- [51] Conceição, R.C.S., Marques, L.T.; Gandra, E. A. et al. Correlação entre as provas do álcool e da acidez titulável para amostras de leite com Síndrome do leite anormal (SILA). In: 10º Congresso de Iniciação Científica, UFPel. Anais..., Pelotas : UFPel, 2001.
- [52] Barros, L. Ionized Calcium as Responsible of Stability of milk. in: Congresso Pan-Americano de Leite, 9.2006. Porto Alegre. Anais,... Porto Alegre 2006,p.427.
- [53] Marques, L. T. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. Pelotas, 2004.68f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia- Produção Animal) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2004.
- [54] C. Celso Velloso: As ações do Ministério para o combate à fraude de leite no Brasil. Entrevista. Milkpoint, maio. 2003. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?actA=7&areaID=50&secaoID=126¬iciaID=8435>.
- [55] Costa Junior, L.C.G. Fisico-química do leite. Metodos analiticos. Juiz de Fora: Grafica.
- [56] Analytical Biochemistry, David j. Holme and Hazel Peck, 3ª edição, editora, Prentice Hall, 1998, p. 169-180.
- [57] Fonseca, L.F.L.; Santos, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- [58] PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1996. 2v.
- [59] <http://br.monografias.com/trabalhos3/fatores-afetam-composicao-do-leite/fatores-afetam-composicao-do-leite2.shtml>, 20/03/2015.
- [60] Jay, J.M. Modern Food Microbiology. 5. ed. New York: Chapman and Hall, 1996. 661p.
- [61] Jay, J.M. Modern Food Microbiology. 6. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1998. 661p.
- [62] Lima, M.C. Efeito de tratamento térmicos do leite tipo C em grupos de microorganismos e em seu desenvolvimento e estocagem em diferentes temperaturas. Viçosa, 1998. 90p. Dissertação (M.S.) - Universidade Federal de Viçosa.
- [63] http://www.cooperitaipu.com.br/recomendacoes.php?id_conteudo=115 acessado em 12/09/2014.
- [64] Cipelli, Antônio Marco Vicari, Teoria e Desenvolvimento de Projetos de Circuitos Eletrônicos. 12ª edição São Paulo, Erica 1986, 580p.

- [65] Lando, Roberto Antônio, Amplificador Operacional. 4ª edição. Érica 1986, 269p.
- [66] Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise.
- [67] Behmer, M. L. A. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 15. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 320p.
- [68] Livia Cavaletti Corrêa da SILVA et. al.; Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”, Jan/Fev, nº 384, 67: 55-60, 2012.