

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

Gabriel de Aragão Farage

**Avaliação e comparação dos sistemas coloidais de leites UHT comercializados
nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**

**Juiz de Fora
2023**

Gabriel de Aragão Farage

**Avaliação e comparação dos sistemas coloidais de leites UHT comercializados
nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**

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

Orientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Juiz de Fora

2023

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

Farage, Gabriel de Aragão .

Avaliação e comparação dos sistemas coloidais de leites uht comercializados nas regiões sul e sudeste do Brasil / Gabriel de Aragão Farage. -- 2023.

61 f. : il.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Rodrigo Stephani

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Estabilidade do leite. 2. Cálcio iônico. 3. Processo UHT. 4. Sedimentação. I. Perrone, Ítalo Tuler, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

Gabriel de Aragão Farage

Avaliação e comparação dos sistemas coloidais de leites UHT comercializados nas regiões sul e sudeste do Brasil

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

Aprovada em 26 de outubro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Alisson Borges de Souza

Juiz de Fora, 09/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Italo Tuler Perroni, Professor(a)**, em 12/12/2023, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 12/12/2023, às 19:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro, Professor(a)**, em 13/12/2023, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALISSON BORGES DE SOUZA, Usuário Externo**, em 26/03/2024, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1519429** e o código CRC **9352A19B**.

Dedico este trabalho aos meus pais e à
minha esposa que me inspiram a ser
consistente e dedicado.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, eu gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu irmão por todo amor, carinho e suporte ao longo dos anos. A minha paixão pela ciência é proveniente de todo o convívio e ensinamentos que vocês me transmitiram.

À minha esposa, Paula, por me incentivar, acreditar no meu potencial e me apoiar em todos os momentos. A caminhada ao seu lado é leve, inspiradora e me faz uma pessoa melhor a cada dia.

Ao QUIMTEC e a todos os alunos do Departamento de Química que me receberam com carinho e me auxiliaram nas análises. O ambiente de trabalho no laboratório é extremamente cooperativo e harmonioso.

À Nathalia da Silva Campos por toda atenção, suporte e paciência durante o período do experimento. O seu auxílio foi imprescindível na realização das tarefas e rotinas.

Ao meu coorientador Professor Rodrigo Stephani pelo seu envolvimento direto no experimento desde a concepção dos delineamentos até as orientações finais. O seu suporte e atenção foi fundamental em todas as etapas.

Ao meu orientador Professor Ítalo Tuler Perrone pela oportunidade de retomar a carreira acadêmica e trabalhar neste projeto de mestrado, que me trouxe novos desafios e uma bagagem de conhecimento muito preciosa.

Aos membros da banca de defesa do Mestrado, Dr. Alisson Borges de Souza e Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro pela disposição e interesse em contribuir para o melhor desenvolvimento deste projeto.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da UFJF que me proporcionou aprender, revisar e atualizar conceitos fundamentais desta área do conhecimento.

As propriedades físico-químicas do leite são essencialmente o resultado de uma grande quantidade de equilíbrios que ocorrem entre os constituintes da matriz láctea (HUPPERTZ, 2016).

RESUMO

O leite UHT possui grande relevância no mercado lácteo brasileiro. O processamento térmico, as propriedades físico-químicas e composicionais têm importante influência na qualidade do leite processado via UHT. O surgimento de novas categorias desse produto torna o cenário produtivo ainda mais desafiador. O objetivo desse trabalho foi investigar, sob a ótica coloidal, a estabilidade de leites UHT e o efeito de aditivos alimentares em produtos comercializados nas principais regiões consumidoras do Brasil. Além disso, devido à relevância do teor de cálcio iônico na estabilidade do leite e a necessidade de pronta aferição desse indicador de processamento por parte das indústrias, foram avaliados os resultados obtidos por meio de um eletrodo portátil em comparação com um método de referência. Os sistemas coloidais de amostras com e sem adição de estabilizantes e com e sem adição de fosfato tricálcico foram avaliados por meio de análises de teor de cálcio iônico, pH, sedimentação, HCT (tempo de coagulação por calor), estabilidade ao etanol, parâmetro D90 (diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90%), percentual de partículas com tamanho $<1 \mu\text{m}$ e potencial zeta. A comparação dos resultados dos teores de cálcio iônico obtidos foi realizada por meio do método de Bland-Altman. Os resultados dos parâmetros analisados indicaram uma estabilidade coloidal pertinente para esse tipo de matriz, além de um processo de homogeneização industrial eficiente. As amostras que sofreram adição de estabilizantes apresentaram menor teor de cálcio iônico, maior HCT e maior estabilidade ao etanol. Não houve diferença significativa em relação à massa de sedimentos e ao pH. As amostras que receberam adição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ apresentaram maior sedimentação e menor estabilidade ao etanol. Não houve diferenças significativas em relação a cálcio iônico, pH e HCT. A análise de concordância entre os resultados dos teores de cálcio iônico mostrou que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos analíticos. No entanto, não foi confirmado um viés de proporção.

Palavras-chave: Estabilidade do leite. Cálcio iônico. Sedimentação. Processo UHT.

ABSTRACT

UHT milk has great relevance in the Brazilian dairy market. Thermal processing, physical-chemical and compositional properties have relevant impact on the quality of milk processed via UHT. The emergence of new categories of this product makes the production scenario even more challenging. The aim of this study was to investigate UHT milk and the effect of food additives on it, from a colloidal perspective, in the main consumer regions. Furthermore, due to the high relevance of the ionic calcium content in the stability of milk and the need for prompt measurement of this processing indicator by industries, the results obtained using a portable electrode were evaluated in comparison with a reference method. The colloidal systems of samples with or without addition of stabilizers and with or without addition of tricalcium phosphate were evaluated based on analyzes of ionic calcium concentration, pH, sedimentation, HCT (heat coagulation time), ethanol stability, parameter D90 (cut-off diameter of the cumulative distribution curve at 90%), percentage of particles with size $<1 \mu\text{m}$ and zeta potential. Comparison of the results of ionic calcium content was carried out using the Bland-Altman method. The results indicated a relevant colloidal stability for this type of matrix, in addition to an efficient industrial homogenization process. The samples that received stabilizers addition showed lower ionic calcium, higher HCT and greater ethanol stability. There was no significant difference in sediment mass and pH. The samples that received $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ addition showed higher sedimentation and lower stability to ethanol. There were no significant differences regarding ionic calcium, pH and HCT. The agreement analysis between the results of ionic calcium levels showed that there is a statistically significant difference between the two analytical methods. However, a proportion bias was not confirmed.

Keywords: Milk stability. Ionic calcium. Sedimentation. UHT processing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Comparação entre as curvas de aquecimento dos processos UHT direto e indireto.....	18
Figura 1 - Estrutura representativa das ligações inter-proteínas na micela de caseína.....	21
Gráfico 2 - Relação entre o HCT e o pH para amostras de leite não concentrado aquecido a 140°C	27
Gráfico 3 - Relação entre o teor de cálcio iônico (mM) e o pH para amostras de leite bovino.....	39
Gráfico 4 - Concentração de cálcio iônico em função do pH para as amostras de leite UHT	39
Gráfico 5 - Relação entre a concentração de cálcio iônico e massa de sedimentos (a) e entre o pH e massa de sedimentos (b) das amostras de leites UHT.....	40
Gráfico 6 - Perfil pH-HCT das amostras de leites UHT.....	41
Gráfico 7 - Quantidade de amostras de leites UHT em relação a graduação alcoólica do teste de estabilidade ao etanol	42
Gráfico 8 - Potencial zeta das amostras de leites UHT.....	44
Gráfico 9 - Percentual de partículas com tamanho <1 µm nas amostras de leites UHT.....	45
Gráfico 10 - Valores de D90 referente ao tamanho de partícula das amostras de leites UHT.....	46
Gráfico 11 - Influência da adição de estabilizantes no teor de cálcio iônico	47
Gráfico 12 - Influência da adição de estabilizantes no HCT (a) e na estabilidade ao etanol (b).....	48
Gráfico 13 - Influência da adição de estabilizantes na massa de sedimentos (a) e no pH (b)	48
Gráfico 14 - Influência do enriquecimento de cálcio no teor cálcio iônico	49
Gráfico 15 - Influência do enriquecimento de cálcio no pH (a) e na massa de sedimentos (b)	50
Gráfico 16 - Influência do enriquecimento de cálcio no HCT (a) e na estabilidade ao etanol(b).....	50

Gráfico 17 - Avaliação da concordância entre os eletrodos íon seletivos na análise de cálcio iônico das amostras de leites UHT por meio do gráfico de Bland-Altman	51
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume de leite inspecionado no Brasil em 2021 e 2022.....	16
Tabela 2 - Composição média do leite bovino	19
Tabela 3 - Composição salina do leite bovino	20
Tabela 4 - Partição média dos sais no leite bovino	20
Tabela 5 - Composição média das substâncias nitrogenadas do leite bovino	22
Tabela 6 - Distribuição das amostras conforme o teor de gordura, região, adição de estabilizantes e adição de fosfato tricálcico	32
Tabela 7 - Estatística descritiva dos dados das análises físico-químicas das amostras de leites UHT	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp	Ácido aspártico
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato tricálcico
D90	Diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90%
Glu	Ácido glutâmico
HCT	<i>Heat Coagulation Time</i>
H ⁺	Íon hidrogênio
Pi	Fósforo inorgânico
pH	Potencial Hidrogeniônico
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SerP	Fosfoserina
UAT	Ultra Alta Temperatura
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	O SEGMENTO DE LEITES UHT NO CENÁRIO LÁCTEO BRASILEIRO.	16
2.2	PROCESSAMENTO UHT	16
2.3	COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO.....	18
2.3.1	FRAÇÃO SALINA DO LEITE BOVINO.....	19
2.3.2	FRAÇÃO PROTEICA DO LEITE BOVINO	22
2.3.3	MICELAS DE CASEÍNA	23
2.4	ESTABILIDADE DO LEITE E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	24
2.4.1	Efeitos do tratamento térmico sobre o pH e o equilíbrio salino do leite.....	24
2.4.2	Efeitos do tratamento térmico sobre as proteínas do leite	25
2.4.3	Avaliação da estabilidade coloidal do leite	26
2.4.4	Principais alterações na estabilidade coloidal do leite UHT	28
2.5	ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	32
4.2	CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO IÔNICO	32
4.3	TEMPO DE COAGULAÇÃO POR CALOR (HCT).....	33
4.4	ESTABILIDADE AO ETANOL	33
4.5	MASSA DE SEDIMENTOS	33
4.6	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	34

4.7	PARÂMETRO D90 E PERCENTUAL DE PARTÍCULAS COM TAMANHO <1 µM	34
4.8	POTENCIAL ZETA.....	35
4.9	CONCORDÂNCIA ENTRE OS ELETRODOS DE ÍON SELETIVO	35
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5	RESULTADOS.....	37
5.1	AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS COLOIDAIIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE LEITES UHT	37
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA ESTABILIDADE COLOIDAL DAS AMOSTRAS DE LEITES UHT COMERCIAIS.....	46
5.2.1	Avaliação da influência da adição de sais estabilizadores na estabilidade coloidal das amostras	46
5.2.2	Avaliação da influência do enriquecimento de cálcio na estabilidade coloidal das amostras	49
5.3	CONCORDÂNCIA ENTRE OS ELETRODOS DE ÍON SELETIVO	51
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2022 foram produzidos 23,85 bilhões de litros de leite inspecionados no Brasil. O percentual desse montante destinado ao processamento UHT correspondeu a 26,9%, ficando atrás somente do setor queijos (EMBRAPA, 2023).

O processo UHT, por meio do emprego de altas temperaturas (130 - 150 °C) em curto período (2 - 4 segundos) (BRASIL, 1997), visa obter produtos comercialmente estéreis, através da inativação de microrganismos capazes de se desenvolver em condições de armazenamento não refrigerado durante o prazo de validade (EISNER, 2021).

No entanto, a estabilidade microbiológica não garante que o leite vai estar apto ao consumo ao longo do prazo de validade (ANEMA, 2019). A qualidade do produto é influenciada pelas condições de processamento, propriedades físico-químicas e composicionais do leite (HUPPERTZ, 2016).

As propriedades físico-químicas do leite são essencialmente um resultado dos equilíbrios que ocorrem entre os constituintes. Os equilíbrios mais notáveis incluem a solubilidade e ionização de sais, interação entre sais e proteínas, além da associação entre proteínas. A estabilidade desse sistema é fortemente afetada pelo tratamento térmico (HUPPERTZ, 2016) .

A estabilidade coloidal das micelas de caseína é governada principalmente pela extremidade C-terminal da κ -caseína, que se projeta para a face externa da superfície da micela. A estabilização ocorre por meio de filamentos protuberantes em que o N-terminal da κ -caseína está ligado à estrutura da micela e o C-terminal se direciona para o solvente. A extremidade C-terminal é carregada negativamente devido à presença de resíduos de aminoácidos, que no pH do leite são ionizáveis. Portanto, a estabilização das micelas é proveniente tanto do impedimento eletrostático, devido às cargas negativas, quanto do impedimento estérico, resultante da estrutura dos filamentos de κ -caseína (HUPPERTZ, 2016).

O tratamento térmico acarreta dissociação significativa de κ -caseína das micelas. A remoção da estrutura estabilizadora (filamentos protuberantes de κ -caseína) produz um arranjo micelar que tem a estabilidade coloidal muito reduzida (ANEMA, 2019).

Além disso, o tratamento térmico promove uma considerável redução do pH do leite durante o aquecimento. A acidificação acarreta protonação dos grupos

carboxilatos dos resíduos de aminoácidos e causa colapso da estrutura estabilizadora de κ -caseína, conseqüentemente, perda da estabilidade do sistema coloidal (HUPPERTZ, 2016).

O tratamento térmico também tem efeito sobre as proteínas do soro do leite. Além da dissociação, ocorre desdobramento da estrutura proteica e exposição de aminoácidos reativos. Isso pode causar agregação das proteínas do soro entre si ou associação com as micelas de caseínas (ANEMA, 2014).

O aquecimento é um dos fatores que afeta o equilíbrio entre as diferentes formas em que os sais estão distribuídos no leite. À medida que a temperatura é elevada, ocorre redução na solubilidade do fosfato de cálcio, acarretando diminuição da concentração de Ca e Pi na fase solúvel (NIEUWENHUIJSE; HUPPERTZ, 2022).

O processamento UHT apesar de ocorrer de forma rápida, impacta diretamente nas propriedades do leite. Por conta disso, uma série de alterações químicas e físicas podem acarretar características indesejáveis no produto como sedimentação, gelificação e separação de gordura ao longo da vida de prateleira (ANEMA, 2019).

Devido à importância do setor de leites UHT no cenário lácteo brasileiro e à relevante influência do processamento e das propriedades físico-químicas e composicionais em sua estabilidade coloidal, faz-se necessário avaliar os sistemas coloidais de leites UHT comerciais. Além disso, o surgimento de novas categorias e o emprego de aditivos alimentares em produtos disponíveis no mercado reforça a utilidade de tais avaliações.

Concomitantemente, em virtude da notável relação entre o teor de cálcio iônico e a estabilidade do leite, que implica a necessidade de uma pronta aferição desse indicador de processamento por parte das indústrias, foram avaliados os resultados obtidos por um eletrodo portátil em comparação com um método de referência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O SEGMENTO DE LEITES UHT NO CENÁRIO LÁCTEO BRASILEIRO

No ano de 2022 foram produzidos 23,85 bilhões de litros de leite inspecionados no Brasil (Tabela 1). O percentual desse montante destinado ao processamento UHT correspondeu a 26,9% (EMBRAPA, 2023).

Tabela 1 – Volume de leite inspecionado no Brasil em 2021 e 2022

Destinação do leite inspecionado	2021	2022
Leite pasteurizado	924	876
Leite UHT	6.735	6.432
Leite em pó	6.430	6.134
Queijos	8.844	8.658
Demais produtos	2.146	1.754
Total	25.079	23.854

Valores expressos em milhões de litros.

Fonte: Adaptado de (EMBRAPA, 2023).

Em relação as principais regiões produtoras de leite inspecionado no Brasil, ao longo dos últimos dez anos, o domínio das regiões Sul e Sudeste foi evidente. Segundo EMBRAPA (2023), essas duas regiões somadas corresponderam a 77,4% da produção anual média de leite inspecionado no ano de 2022.

O segmento de leite UHT no Brasil em 2021 processou 6.730 bilhões de litros e gerou uma receita bruta de vinte e três bilhões de reais. Esse setor teve 88% de participação no total de leite líquido consumido no país (EMBRAPA, 2022).

2.2 PROCESSAMENTO UHT

No Brasil, o leite UHT (*Ultra High Temperature*) ou UAT (Ultra Alta Temperatura) é definido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite (RTIQ) como: o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob

condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O processo UHT é uma série de operações unitárias que transformam um produto não-estéril, como o leite, em um produto final envasado, comercialmente estéril e estável a temperatura ambiente por alguns meses. As principais etapas do processo estão descritas abaixo:

- Entrada da matéria-prima
- Pré-aquecimento
- Desaeração (opcional)
- Homogeneização (em processo *upstream*)
- Aquecimento até a temperatura de esterilização
- Retenção até o intervalo de esterilização
- Resfriamento inicial
- Homogeneização (em processo *downstream*)
- Resfriamento final
- Armazenamento asséptico
- Envase asséptico

Há duas principais variações do sistema UHT em operação nas indústrias processadoras de leite: processo direto e processo indireto. As principais diferenças entre elas ocorrem no aquecimento durante a fase de esterilização e no resfriamento inicial.

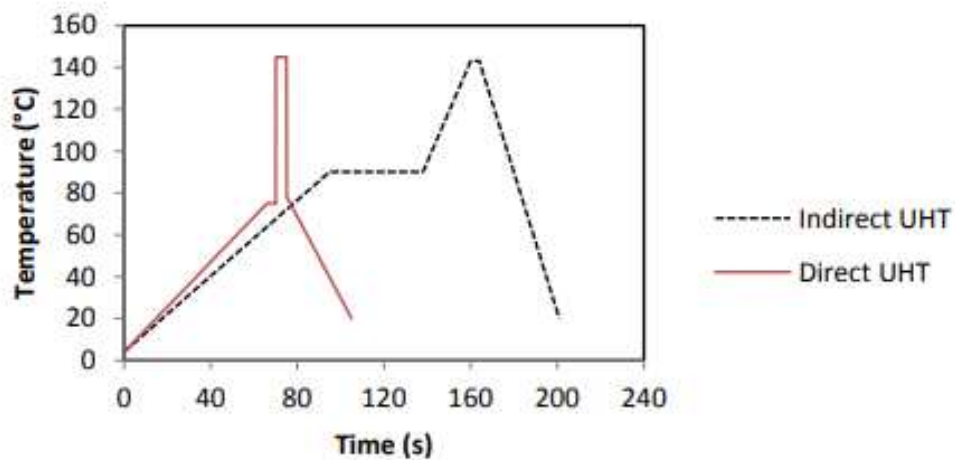
No processo direto, o aquecimento até a temperatura de esterilização ocorre por meio de contato direto entre o sistema de aquecimento (vapor culinário superaquecido) e o leite. Após o tempo de retenção, o resfriamento inicial é realizado através de uma câmara de vácuo, que também remove a água proveniente da condensação do vapor culinário (DEETH; LEWIS, 2017).

No processo indireto a principal diferença é que o sistema de aquecimento não entra em contato direto com o produto. A temperatura de esterilização é atingida por meio da troca de calor entre o sistema de aquecimento (vapor ou água quente) e o leite, através das paredes de um trocador de calor. Após o tempo de retenção, o

resfriamento inicial nesse processo ocorre na seção fria do trocador de calor (DEETH; LEWIS, 2017).

A principal diferença encontrada em razão das distintas concepções dos dois tipos de processos é o perfil de aquecimento gerado. No processo direto, o leite é aquecido e resfriado rapidamente quando comparado ao indireto (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Comparação entre as curvas de aquecimento dos processos UHT direto e indireto



Fonte: (GAUR, 2017).

O processo de aquecimento acarreta alterações nas características do produto. As principais transformações são: desnaturação das proteínas do soro de leite, interações proteína-proteína (particularmente a interação de β -lactoglobulina e κ -caseína), escurecimento, formação de compostos sulfidrila (em grande parte por degradação de β -lactoglobulina e material da membrana dos glóbulos de gordura do leite), produção de compostos carbonílicos, redução dos níveis de vitaminas, sabor de cozido mais intenso e separação de gordura. Essas mudanças ocorrem de forma mais intensa no leite aquecido indiretamente (DEETH; LEWIS, 2017). O leite aquecido através do sistema direto apresenta maior sedimentação e gelificação (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018)

2.3 COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO

A composição do leite bovino varia de acordo com a individualidade, raça do animal, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental, estação do ano e vários fatores fisiológicos (gestação), patológicos (mastite) e intervalo entre ordenhas (WALSTRA; M WOUTERS; GEURTS, 2006). Em média, o leite apresenta a composição ilustrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição média do leite bovino

Constituinte	Conteúdo médio (%)	Variação (%)
Água	87,1	83,5 - 88,7
Sólidos não gordurosos	8,9	7,9 - 10,0
Gordura no extrato seco	31	22,0 - 38,0
Lactose	4,6	3,8 - 5,3
Gordura	4,0	2,5 - 5,5
Proteínas	3,3	2,3 - 4,4
Caseínas	2,6	1,7 - 3,5
Minerais	0,7	0,5 - 0,83
Ácidos orgânicos	0,2	0,1 - 0,21
Outros	0,2	-

Fonte: (ORDOÑEZ *et al.*, 2005).

Além dos principais constituintes enumerados na Tabela 2, o leite contém uma série de outros componentes que têm grande importância em suas propriedades (FOX; MCSWEENEY, 1998).

2.3.1 Fração salina do leite bovino

A fração salina representa uma pequena parcela da composição total do leite, porém a concentração e distribuição dos sais são fatores determinantes na estrutura das micelas de caseína e na estabilidade coloidal do sistema (GAUCHERON, 2005). A Tabela 3 mostra a concentração dos sais no leite bovino.

Tabela 3 – Composição salina do leite bovino

Constituinte	Concentração (mM)
Cálcio	26 - 32
Magnésio	4 - 6
Fosfato inorgânico	19 - 23
Citrato	7 - 11
Sódio	17 - 28
Potássio	31 - 43
Cloreto	22 - 34

Fonte: Adaptado de (GAUCHERON, 2005).

Os sais se distribuem em duas fases: a fase livre ou solúvel e a fase ligada às micelas, ou coloidal. Eles estão presentes como íons livres ou complexados em solução, parcialmente como íons associados a proteínas, peptídeos e fosfolipídios, e parcialmente em forma não dissolvida nas micelas de caseína, isso se aplica especialmente ao cálcio e ao fosfato. Os sais não dissolvidos são chamados de sais coloidais ou micelares (NIEUWENHUIJSE; HUPPERTZ, 2022). A Tabela 4 apresenta a distribuição média dos sais na fase solúvel e coloidal.

Tabela 4 – Partição média dos sais no leite bovino

Constituinte	Concentração (mM)
Cálcio total	29,4
Cálcio solúvel	9,2
Cálcio coloidal	20,2
Fosfato inorgânico total	20,9
Fosfato inorgânico solúvel	11,2
Fosfato inorgânico coloidal	9,7
Magnésio total	5,1
Magnésio solúvel	3,3
Magnésio coloidal	1,8
Citrato total	9,2
Citrato solúvel	8,2
Citrato coloidal	1,0

Fonte: Adaptado de (GAUCHERON, 2005).

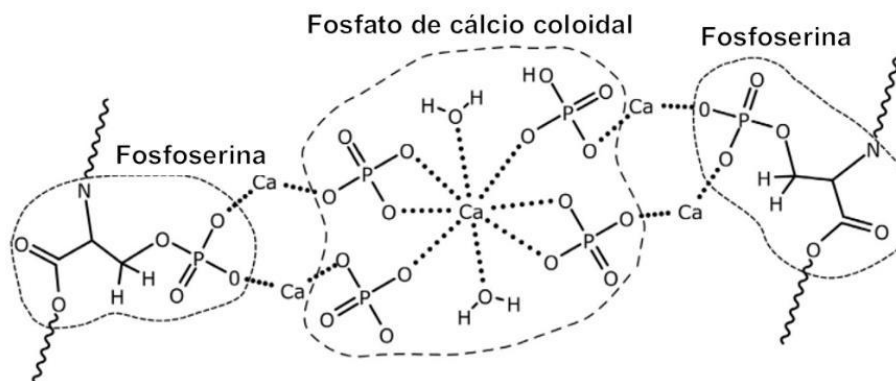
O fosfato de cálcio exerce um papel fundamental na estrutura e na estabilidade da micela de caseína. Todas as caseínas sofrem fosforilação e possuem resíduos de fosfoserinas em suas moléculas. Os grupos fosfatos presentes nos resíduos de fosfoserinas constituem os principais sítios de ligação para os cátions. Existe uma

dificuldade em definir o fosfato de cálcio coloidal devido ao fato de o cálcio e o fosfato inorgânico realizarem forte interação com os resíduos de fosfoserinas das caseínas (GAUCHERON, 2005).

Outro ponto relevante é que o cálcio coloidal não está totalmente associado ao fosfato coloidal inorgânico. Uma parte desse cálcio está diretamente ligado à caseína através do fosfato orgânico presente nos resíduos de fosfoserinas. Por isso, parte do cálcio coloidal pode ser definido como caseinato de cálcio (ligado a caseína) e outra parte como fosfato de cálcio inorgânico (ligado ao fosfato inorgânico) (GAUCHERON, 2005).

O fosfato de cálcio coloidal inorgânico é também denominado de *nanoclusters* de fosfato de cálcio que realizam ligações entre caseínas através de pontes salinas de cálcio (DE KRUIF *et al.*, 2012). A Figura 1 representa uma estrutura de ligações inter-proteínas nas micelas de caseína.

Figura 1 – Estrutura representativa das ligações inter-proteínas na micela de caseína



Fonte: (HINDMARSH *et al.*, 2019).

Existe um equilíbrio termodinâmico dos íons entre a fase contínua e a fase coloidal, principalmente o cálcio e o fosfato, que é extremamente crítico para as propriedades físico-químicas do leite e para a estabilidade das micelas de caseínas (WANG; MA, 2020). A partição dos sais entre as fases é afetada por uma série de

fatores como alterações no pH, aquecimento, resfriamento e adição de sais (GAUCHERON, 2005).

2.3.2 Fração proteica do leite bovino

A fração proteica representa aproximadamente 3,5% do conteúdo total do leite bovino, em massa. As caseínas e as proteínas do soro correspondem a 95% do nitrogênio total. Os 5% restantes são provenientes de compostos nitrogenados não proteicos, representados por ureia, amônia, ácido úrico, creatinina, peptídeos e aminoácidos, dentre outros. As frações de caseínas correspondem a cerca de 80% do total das proteínas e os 20% restantes são proteínas do soro (WALSTRA; M WOUTERS; GEURTS, 2006). A Tabela 5 mostra a composição média dos compostos nitrogenados do leite de vaca.

Tabela 5 – Composição média das substâncias nitrogenadas do leite bovino

Compostos nitrogenados		%
Proteínas		95
Caseínas		76
	α_{s1}	30
	α_{s2}	8
	β	27
	κ	9
	γ	2
Proteínas do soro		19
	β -lactoglobulina	9,5
	α -lactoalbumina	3,5
	Soroalbumina bovina	1
	Imunoglobulinas	2
	Outras	3
Nitrogênio não-proteico	Peptídeos, Aminoácidos livres, Outras substâncias	5

Fonte: Adaptado de (WALSTRA; M WOUTERS; GEURTS, 2006).

As quatro principais moléculas de caseína (α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína) apresentam diferentes composições de aminoácidos e diferem entre si devido a modificações pós-traducionais, chamadas de fosforilação e glicosilação. Todas as moléculas de caseína são fosforiladas e, por conta disso, apresentam elevada afinidade por cátions

bivalentes, como cálcio e magnésio. A glicosilação por sua vez ocorre somente nas moléculas de κ -caseínas. Cerca de 36% das moléculas de κ -caseínas não são glicosiladas e os 64% restantes possuem de 1 a 10 carboidratos por molécula (FOX; MCSWEENEY, 1998).

A fosforilação e a glicosilação conferem as κ -caseínas uma propriedade distinta das outras caseínas. Essas proteínas são fortemente anfífilas, pois ocorre uma separação entre a extremidade N-terminal hidrofóbica e a extremidade hidrofílica C-terminal, em que os resíduos fosforilados e/ou glicosilados estão presentes (SWAISGOOD, 2003)

Quando a caseína é removida do leite desnatado, o líquido remanescente recebe o nome de soro do leite. As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas totais do leite e são constituídas por proteínas de estrutura terciária, globulares, termolábeis acima de 65°C e não são fosforiladas, tais como a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (FOX; MCSWEENEY, 1998).

2.3.3 Micelas de caseína

As micelas de caseína são constituídas majoritariamente por moléculas de caseínas com a seguinte relação: [α_{s1} : α_{s2} : ($\beta + \gamma$): κ = 4: 1: 4: 1,3], além de sais (principalmente fosfato de cálcio) e água. As micelas são altamente hidratadas, contém aproximadamente 10^4 cadeias peptídicas por micela e sua fração mineral representa de 6% a 8% da matéria seca. Além disso, estão presentes como partículas polidispersas (10^{14} - 10^{16} micelas por ml de leite) com diâmetro médio de 200 nm (DALGLEISH, 2011).

A estrutura interna da micela é unida e estabilizada por pontes salinas através dos *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal inorgânico. Essas pontes salinas são ligações fortes, que ocorrem entre as porções de fosfato de cálcio orgânico das caseínas, por intermédio de pontos de ancoragem de fosfato de cálcio inorgânico (DE KRUIF; HOLT, 2003)

Além disso, a estrutura interna da micela não se deve somente às pontes salinas. As caseínas também se associam através de ligações de mais baixa energia, como interações hidrofóbicas (α e β caseína possuem em suas moléculas muitos pontos de hidrofobicidade), ligações de hidrogênio, ligações iônicas e atrações fracas

de Van der Walls. A combinação dessas interações tem papel fundamental na manutenção da estrutura interna da micela (intramicelar). O processo de autoassociação entre as unidades básicas é completado quando as moléculas de κ -caseína se depositam sobre a superfície desses conglomerados, formando a micela de caseína (DE KRUIF *et al.*, 2012)

A estabilidade intermicelar (entre micelas) é conduzida pela κ -caseína devido a algumas características desse tipo de caseína, sendo elas: hidrofília, baixa fosforilação, menor cadeia peptídica.

Essa estabilidade coloidal das micelas de caseína é governada principalmente pela extremidade C-terminal da κ -caseína, que se projeta para a face externa da superfície da micela. A estabilização ocorre por meio de filamentos protuberantes em que o N-terminal da κ -caseína está ligado à estrutura da micela e o C-terminal se direciona para o solvente. A extremidade C-terminal é carregada negativamente devido à presença de resíduos de aminoácidos, que no pH do leite são ionizáveis.

Portanto, a estabilização das micelas é proveniente tanto do impedimento eletrostático, devido a carboxila carregada negativamente, quanto do impedimento estérico, resultante da estrutura dos filamentos de κ -caseína, além do impedimento por camada de hidratação (glicopeptídeos hidrofílicos) (TUINIER; DE KRUIF, 2002).

2.4 ESTABILIDADE DO LEITE E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As propriedades físico-químicas do leite são essencialmente resultado dos equilíbrios que ocorrem entre seus constituintes. Os equilíbrios mais notáveis incluem a solubilidade e ionização de sais, interação entre sais e proteínas, além da associação entre proteínas. A estabilidade desse sistema é fortemente afetada pelo tratamento térmico (HUPPERTZ, 2016).

2.4.1 Efeitos do tratamento térmico sobre o pH e o equilíbrio salino do leite

O tratamento térmico promove considerável redução do pH do leite durante o aquecimento. Esse fenômeno pode ser atribuído a fatores como a degradação térmica da lactose em ácidos orgânicos, desfosforilação da caseína e precipitação do fosfato de cálcio com liberação de H^+ , devido ao reequilíbrio que ocorre na fase solúvel:

H_2PO_4^- em HPO_4^{2-} . A acidificação acarreta protonação dos grupos carboxilatos dos resíduos de aminoácidos (Glu e Asp), o que leva à neutralização do impedimento eletrostático entre as micelas de caseína e causa desestabilização da estrutura estabilizadora de κ -caseína e, conseqüentemente, perda da estabilidade do sistema coloidal e agregação das micelas (HUPPERTZ, 2016).

O tratamento térmico é um dos fatores que afeta o equilíbrio entre as diferentes formas em que os sais estão distribuídos no leite. À medida que a temperatura é elevada, ocorre redução na solubilidade do fosfato de cálcio, acarretando diminuição da concentração de Ca e Pi na fase solúvel (HUPPERTZ; NIEUWENHUIJSE, 2022).

A forma como esse fenômeno ocorre ainda não é clara. Uma possível explicação é que a estabilização do cálcio e do fosfato insolubilizados seja realizada na micela de caseína através dos nanoclusters de fosfato de cálcio. Outra possibilidade é a formação de precipitados (amorfo) de fosfato de cálcio, cujo crescimento pode ser limitado pela adsorção de caseínas ou peptídeos derivados de caseína contendo SerP na superfície (NIEUWENHUIJSE; HUPPERTZ, 2022).

Após o resfriamento, a solubilidade do fosfato de cálcio aumenta, o que gera um reequilíbrio dos íons na fase contínua do leite. Isso acontece a uma taxa mais lenta do que a precipitação e depende da intensidade do tratamento térmico (ANEMA, 2021).

2.4.2 Efeitos do tratamento térmico sobre as proteínas do leite

Ao considerar os componentes proteicos de leite, as reações de particular importância são a desnaturação da proteína do soro, as interações das proteínas desnaturadas do soro com outras proteínas (incluindo as das micelas de caseína) e a dissociação micelar da caseína. Esses três fenômenos podem modificar acentuadamente as propriedades físico-químicas do leite e podem desempenhar um papel importante na determinação da estabilidade e do desempenho funcional de produtos lácteos aquecidos (ANEMA, 2014).

O tratamento térmico acarreta dissociação significativa de κ -caseína das micelas de caseína. A remoção da estrutura estabilizadora (filamentos protuberantes de κ -caseína) produz um arranjo micelar que tem uma estabilidade coloidal muito reduzida, portanto, extremamente propenso à agregação induzida pela atividade do íon cálcio (ANEMA, 2019).

O tratamento térmico também tem efeito sobre as proteínas do soro do leite e causa dissociação de oligômeros ligados não covalentemente, além de desdobramento da estrutura proteica e exposição de aminoácidos reativos. A exposição de grupos sulfidrilícos dos aminoácidos pode causar agregação com outras proteínas do soro ou caseínas (ANEMA, 2014).

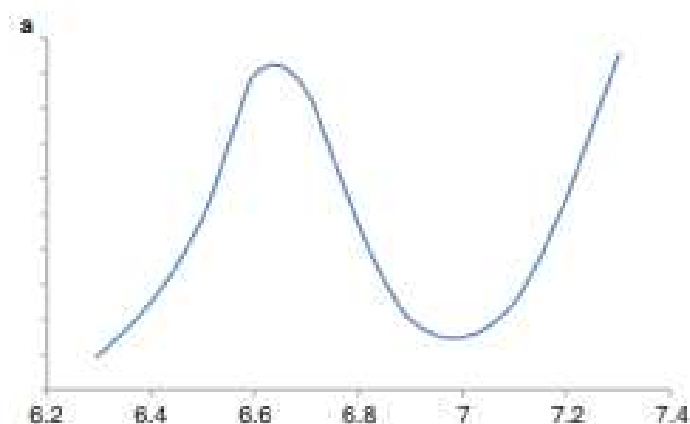
Quando o leite é aquecido acima de 70°C, as proteínas do soro do leite α -lactalbumina e β -lactoglobulina começam a desnaturar, levando a uma associação com a κ -caseína. Isso promove a formação de complexos através de ligações de dissulfetos (ANEMA, 2014).

A distribuição de proteínas do soro desnaturadas também mostra acentuada dependência do pH. No leite aquecido em pH baixo, a maior parte das proteínas desnaturadas do soro são encontradas associadas às micelas de caseína. À medida que o pH sofre elevação, há uma maior proporção de proteína de soro de leite desnaturada na fase contínua do leite (HUPPERTZ, 2016).

2.4.3 Avaliação da estabilidade coloidal do leite

O método mais comum para medir a estabilidade térmica do leite é o *heat coagulation time* (HCT). O HCT é definido como o tempo transcorrido entre a sujeição da amostra a uma determinada temperatura em um banho de óleo, até o momento em que seja possível verificar uma coagulação visível. O HCT das amostras é geralmente determinado como uma função do pH. O Gráfico 2 exibe o perfil típico do HCT-pH para leite não concentrado quando aquecido a 140°C (DEETH; LEWIS, 2017).

Gráfico 2 – Relação entre o HCT e o pH para amostras de leite não concentrado aquecido a 140°C



Fonte: (HUPPERTZ, 2016).

A partir do gráfico é possível perceber que o HCT aumenta à medida que o pH é elevado. O maior HCT é observado quando o pH da amostra coincide com o pH natural do leite (6,6 – 6,7). Isso ocorre por causa da maior estabilidade das micelas de caseínas revestidas com proteína do soro, devido à formação de um complexo entre κ -caseína e β -a lactoglobulina na superfície das micelas de caseína. Isso contribui para os efeitos estérico e eletrostático e evita a dissociação da κ -caseína micelar (HUPPERTZ, 2016).

Conforme o pH é reduzido (<6,6), a coagulação ocorre mais rapidamente. Isso se deve à acidificação e à alta atividade do íon cálcio que diminui as repulsões eletrostáticas entre as proteínas. Além disso, quantidades relativamente elevadas de proteínas do soro de leite são associadas às micelas e podem promover a agregação através de *cross-linking* de proteínas do soro ligadas a diferentes micelas de caseína (DEETH; LEWIS, 2017).

Em valores de pH acima de 6,7, a estabilidade diminui devido à dissociação da κ -caseína micelar, reduzindo assim o efeito estabilizador desta proteína. As micelas depletadas de κ -caseína são sensíveis ao íon cálcio. Portanto, o mínimo no perfil HCT-pH é resultado da coagulação de micelas desprovidas de κ -caseína, na presença de íons cálcio. Em pH mais alto, embora a dissociação da κ -caseína se estenda, o HCT aumenta devido ao incremento da carga líquida e à baixa atividade de íons cálcio. Além disso, é possível que a κ -caseína dissociada possa se reassociar durante o aquecimento prolongado (DEETH; LEWIS, 2017).

Outro método muito comum para avaliar estabilidade coloidal do leite é o teste do álcool. Por ser simples, barato e rápido, é amplamente utilizado no Brasil. A estabilidade do leite ao etanol é definida como a mínima concentração de solução de álcool capaz de causar coagulação do leite quando adicionada em volume igual ao da amostra. A agregação das micelas ocorre na presença de etanol por causa da redução na constante dielétrica da solução que gera o colapso da κ -caseína e reduz a repulsão estérica. Essencialmente, o álcool induz um processo de precipitação isoelétrica (HORNE, 2016).

2.4.4 Principais alterações na estabilidade coloidal do leite UHT

A qualidade do leite UHT sofre influência das condições de processamento, propriedades físico-químicas e composicionais do leite (HUPPERTZ, 2016). Durante a vida de prateleira, várias mudanças químicas e físicas podem acarretar características indesejáveis no produto. As principais alterações associadas a estabilidade coloidal do leite são a sedimentação, a gelificação e a separação de gordura (ANEMA, 2019).

A gelificação é caracterizada como a formação de uma rede tridimensional seguida do aumento de viscosidade por conta da formação de um gel. O gel formado é (geralmente) fraco, tende a formar-se inicialmente na parte inferior e se estende por toda a embalagem ao longo do tempo. Ao contrário de alguns processos de separação de fases, a gelificação é irreversível e causa o fim da vida útil do produto (DEETH; LEWIS, 2017).

A gelificação pode ocorrer devido a proteases estáveis ao calor que não são inativadas durante o processamento. Estas proteases hidrolisam as proteínas durante o armazenamento, formando peptídeos e, assim, desestabilizando o sistema proteico, levando à gelificação. Esse fenômeno também pode ter natureza físico-química (ANEMA, 2019).

O processamento UHT forma micelas de caseína empobrecidas de κ -caseína que são metaestáveis. Durante o armazenamento, as micelas de caseínas que sofreram depleção de κ -caseína concentram-se lentamente na parte inferior da embalagem por meio de sedimentação gravitacional. Em determinados cenários específicos, o abaixamento de pH, os níveis de cálcio iônico e a severidade da depleção de κ -caseína promovem uma agregação que causa a gelificação. A

gelificação começa no fundo do recipiente, mas progride para o topo à medida que mais micelas se assentam e se juntam à camada gelificada (ANEMA, 2017).

A sedimentação envolve a formação de uma camada (geralmente densa) de material rico em proteínas na base da embalagem de leite UHT. Geralmente, o sedimento é formado relativamente rápido após a fabricação. Esse material é compacto, bastante robusto e não é facilmente desfeito (ANEMA, 2019).

A propensão para formação dos sedimentos depende do pH e da concentração de cálcio iônico do leite. O processamento do leite UHT causa dissociação da κ -caseína. As micelas empobrecidas de κ -caseína podem se agregar através de pontes induzidas pelo íon cálcio e formar agregados que se depositam no fundo da embalagem. Dependendo da intensidade do processo, há formação de altos níveis de sedimentos (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

A separação de gordura é a formação de uma camada rica em lipídios que se acumula no topo da embalagem. Esse acúmulo excessivo de gordura é geralmente devido a um processo de homogeneização deficiente e ou à floculação de glóbulos que formam partículas maiores. A velocidade do processo de separação de gordura é determinada pelo tamanho dos glóbulos e pela diferença de densidade entre as partículas e a fase contínua, processo descrito pela lei de Stokes (ANEMA, 2019).

O processo de homogeneização é fundamental para controlar a separação de gordura. O objetivo principal dessa operação é diminuir o diâmetro das partículas, a fim de reduzir a taxa de separação. A homogeneização é realizada em temperaturas mais elevadas, o que permite que a gordura do leite esteja no estado líquido. Geralmente, a homogeneização é empregada por meio de dois estágios com pressão combinada (DEETH; LEWIS, 2017).

O primeiro estágio tem como objetivo de romper os glóbulos de gordura originais para reduzir o tamanho. No entanto, pode ocorrer alguma agregação dos glóbulos homogeneizados com micelas de caseína por meio de associações não covalentes. Como esses agregados são de tamanho grande, eles podem subir rapidamente. Portanto, o segundo estágio de homogeneização é projetado com o intuito de desfazer agregados que possam ter se formado após o primeiro estágio (ANEMA, 2019).

2.5 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE MÉTODOS ANALÍTICOS

Um cenário bastante comum nos ambientes acadêmico e industrial é o estudo de diferentes formas de avaliar uma medida quantitativa. A razão para isso é a busca por alternativas que sejam rápidas, baratas, gerem pouco distúrbio no meio, mas, que acima de tudo, forneçam um resultado confiável.

Para avaliar se duas medidas são equivalentes, ou seja, se existe uma concordância entre elas, é necessário avaliar os dados sob a ótica estatística. A avaliação da concordância entre métodos muitas vezes é realizada utilizando o coeficiente de correlação, porém esta técnica avalia a associação e não a concordância entre os dados (HIRAKATA; CAMEY, 2009)

A metodologia proposta por Bland e Altman avalia a concordância entre dois instrumentos a partir da visualização gráfica da relação entre a diferença entre os dados medidos por eles e a média desses dados. A partir desses valores é possível inferir o quanto as diferenças se afastam do valor zero, a dispersão das diferenças ao redor da média, além de *outliers*, tendências e viés de proporção (BLAND; ALTMAN, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar e comparar a estabilidade coloidal de leites UHT comerciais, por meio das análises de pH, concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol, tempo de coagulação por calor, massa de sedimentos, potencial zeta, percentual de partículas com diâmetro $< 1\mu\text{m}$ e o parâmetro D90 (diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90%).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade coloidal de leites UHT comerciais
- Comparar os sistemas coloidais de leites UHT comerciais produzidos com e sem adição de estabilizantes;
- Comparar os sistemas coloidais de leites UHT comerciais produzidos com e sem adição de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$);
- Avaliar a concordância entre dois eletrodos de íon seletivo na determinação da concentração de cálcio iônico em leites UHT comerciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Química e Tecnologia – QUIMTEC – do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As análises laboratoriais foram executadas durante o período compreendido entre 13 de junho e 30 de junho de 2022.

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As quarenta amostras comerciais de leite UHT em embalagens cartonadas de 1000 ml foram adquiridas em supermercados localizados em São Paulo - SP, Belo Horizonte - MG, Juiz de Fora - MG e Porto Alegre - RS, no período compreendido entre 2 e 12 de junho de 2022. As amostras são provenientes de oito marcas comerciais dos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul e suas datas de fabricação variam de 13 a 31 de maio de 2022. As amostras foram agrupadas conforme o teor de gordura, adição de estabilizantes e adição de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição das amostras conforme o teor de gordura, região, adição de estabilizantes e adição de fosfato tricálcico

Teor de Gordura		Região		Adição de estabilizantes		Adição de fosfato tricálcico	
Desnatado	16	Sul	5	Sem adição	1	Sem adição	8
		Sudeste	11	Com adição	15	Com adição	8
Semidesnatado	12	Sul	4	Sem adição	1	Sem adição	8
		Sudeste	8	Com adição	11	Com adição	4
Integral	12	Sul	4	Sem adição	1	Sem adição	9
		Sudeste	8	Com adição	11	Com adição	3

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2 CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO IÔNICO

O teor de cálcio iônico foi determinado através da técnica de potenciometria por meio de eletrodo de íon seletivo para Ca^{2+} (MASOTTI *et al.*, 2020). A concentração de

cálcio iônico foi avaliada no pH original da amostra. As análises foram realizadas em dois instrumentos (eletrodo portátil e eletrodo referência) com objetivo de analisar a concordância entre eles.

O eletrodo referência, Thermo Scientific Orion ISE meter/9720BNWP (Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, Estados Unidos), foi calibrado previamente com soluções padrões (4, 40 e 4000 ppm). As análises foram realizadas em duplicata e em temperatura ambiente ($25,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$).

O eletrodo portátil, LAQUAtwin B-751 (Horiba Instruments, Inc., Irvine, Estados Unidos), foi calibrado previamente com soluções padrões (150 e 2000 ppm). As análises foram realizadas em duplicata e em temperatura ambiente ($25,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$).

4.3 TEMPO DE COAGULAÇÃO POR CALOR (HCT)

A determinação do tempo de coagulação do leite por calor foi realizada submetendo 10 ml de amostra em um frasco fechado ao banho de óleo a 155 °C (DUMPLER; KULOZIK, 2015). Foi determinado o tempo, em segundos, transcorrido desde o início do banho até o momento da formação dos primeiros coágulos. As análises foram realizadas em duplicata.

4.4 ESTABILIDADE AO ETANOL

As soluções de etanol e água foram preparadas em concentrações variando de 72% (v/v) a 96% (v/v), em intervalos de duas unidades percentuais. As graduações alcoólicas foram padronizadas com auxílio de um densímetro digital DENSITO 30P (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça). O pH das soluções foi avaliado com auxílio do potenciômetro PG2000 (GEHAKA, São Paulo, Brasil) e ajustado por meio de adição de solução de ácido láctico 0,2 mol/l ou hidróxido de sódio 0,2 mol/l com o objetivo de padronizar o pH em 6,7.

O teste do álcool foi realizado em placas de Petri. Foram adicionados 2ml da solução alcóolica e 2 ml de amostra de leite UHT em temperatura ambiente ($25,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$). Foi avaliada a formação de coágulos nas amostras em cada concentração de etanol. As análises foram realizadas em duplicata (COSTA, 2016).

4.5 MASSA DE SEDIMENTOS

A determinação da massa de sedimentos foi realizada a partir da retirada do conteúdo líquido da embalagem.

Posteriormente, foi utilizada uma tesoura para abrir completamente a embalagem a uma distância de 14 cm da base. Após essa etapa, a embalagem foi invertida e mantida na posição vertical por 1 minuto, a fim de permitir o escoamento do leite das paredes internas e do fundo.

A embalagem foi pesada para determinar a massa do cartonado acrescida da massa de sedimentos.

Após essa etapa, as abas da base da embalagem foram abertas para permitir que o resíduo sólido aderido ao fundo fosse lavado e removido. Novamente, o conjunto foi invertido e mantido na posição vertical por 1 minuto, a fim de escoar a água presente nas paredes internas.

Por fim, a embalagem sem resíduo foi pesada e a massa de sedimentos foi determinada a partir da diferença entre a primeira e a segunda pesagem. O resultado foi expresso em gramas.

4.6 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

O pH das amostras foi determinado através do potenciômetro PG2000 (GEHAKA, São Paulo, Brasil). As análises foram realizadas em temperatura ambiente ($25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$). O eletrodo foi calibrado previamente com soluções padrões (pH 4,0 e 7,0) (BRASIL, 2006).

4.7 PARÂMETRO D90 E PERCENTUAL DE PARTÍCULAS COM TAMANHO $<1\text{ }\mu\text{M}$

A análise de distribuição de tamanho das partículas dos leites UHT foi realizada por meio do analisador de partículas por difração a laser LS 12 320 (Beckman Coulter Inc., Miami, Estados Unidos), acoplado ao módulo de análise líquida Aqueous liquid module (Beckman Coulter Inc., Miami, Estados Unidos). Os resultados das amostras em temperatura ambiente ($25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram obtidos utilizando índice de refração de 1,332 para o meio dispersante (água), 1,47 para gordura e 1,57 para as micelas de caseína. A partir das curvas de distribuição granulométrica foi obtido o

parâmetro D90 (diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90%) e o percentual de partículas com diâmetro $<1 \mu\text{m}$. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.8 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta foi determinado através do analisador Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltda, Malvern, Reino Unido). As amostras de leites UHT em temperatura ambiente ($25,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$) foram previamente diluídas em uma razão de 1:500, em água deionizada. Em seguida, as amostras diluídas foram injetadas em cubetas e analisadas em duplicata. Além disso, o equipamento Zetasizer Nano ZS90 realizou automaticamente três medidas para cada amostra nele inserida.

4.9 CONCORDÂNCIA ENTRE OS ELETRODOS DE ÍON SELETIVO

A concordância entre os eletrodos Thermo Scientific Orion ISE meter/9720BNWP (Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, Estados Unidos) e LAQUAtwin B-751 (Horiba Instruments, Inc., Irvine, Estados Unidos) na determinação da concentração de cálcio iônico no pH original das quarenta amostras de leites UHT comerciais foi avaliada segundo o método de Bland-Altman (HIRAKATA; CAMEY, 2009).

Também foi avaliada a hipótese de os métodos apresentarem diferenças estatisticamente significativas entre si. Os valores das diferenças entre os resultados foram avaliados por meio do teste t com significância de 5%.

O viés de proporção (concentração de valores acima ou abaixo da média) foi calculado por meio da análise de regressão linear entre a médias dos resultados dos métodos e a diferença entre eles, com significância de 5% para os valores da média.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas através do software Sigmaplot (versão 14.5.0.101, Munique, Alemanha).

A normalidade dos dados foi testada através do teste de Shapiro-Wilk com significância de 5%. Para a determinação das correlações foi utilizado o teste de Spearman com significância de 5%.

O teste utilizado para comparar 2 grupos independentes avaliados por meio de uma variável quantitativa com distribuição normal foi o teste t de Student com significância de 5%. O teste utilizado para comparar 2 grupos independentes avaliados por meio de uma variável quantitativa sem distribuição normal foi o teste Mann-Whitney com significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS SISTEMAS COLOIDAIIS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE LEITES UHT

A Tabela 7 apresenta a estatística descritiva obtida a partir dos dados das análises de pH, concentração de cálcio iônico, estabilidade ao etanol, HCT, massa de sedimentos, potencial zeta, percentual de partículas menores que um micrometro e o parâmetro D90, provenientes das quarenta amostras analisadas.

Tabela 7 – Estatística descritiva dos dados das análises físico-químicas das amostras de leites UHT

	Ca ²⁺ (mM)	pH	HCT (s)	Estabilidade ao etanol (% v/v)	Massa de sedimentos (g)	Potencial zeta (mV)	<1 µm (%)	D90 (µm)
Número de amostras	40	40	40	40	40	40	40	40
Média	1,78	6,70	441	90	1,05	-29,40	94,60	0,651
Desvio Padrão	0,17	0,05	171	4	1,16	2,36	6,86	0,366
Erro padrão da média	0,03	0,01	27	1	0,18	0,37	1,08	0,058
Amplitude	0,75	0,18	701	16	4,60	8,83	23,90	1,040
Mediana	1,75	6,72	435	90	0,45	-29,80	97,90	0,708
Mínimo	1,25	6,62	150	82	0,05	-32,90	76,10	0,206
Máximo	2,00	6,80	851	98	4,65	-24,10	100	1,246
Percentil 25º	1,75	6,65	299	88	0,22	-30,50	90,90	0,229
Percentil 50º	1,75	6,72	435	90	0,45	-29,80	97,90	0,708
Percentil 75º	2,00	6,74	519	94	1,83	-28,40	99,80	0,977

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O teor de cálcio iônico das quarentas amostras de leites UHT comerciais variou entre 1,25 e 2,00 mM. Os valores encontrados estão condizentes com os dados reportados na literatura.

O cálcio está presente no leite bovino na forma de íons livres ou complexados e distribuído entre a fase aquosa (9 mM) e coloidal (21 mM). A maior parte do cálcio

solúvel está indissociado na forma de fosfato ou citrato de cálcio (GAUCHERON, 2005). A concentração do íon cálcio livre corresponde a aproximadamente 2 mM (HUPPERTZ; NIEUWENHUIJSE, 2022).

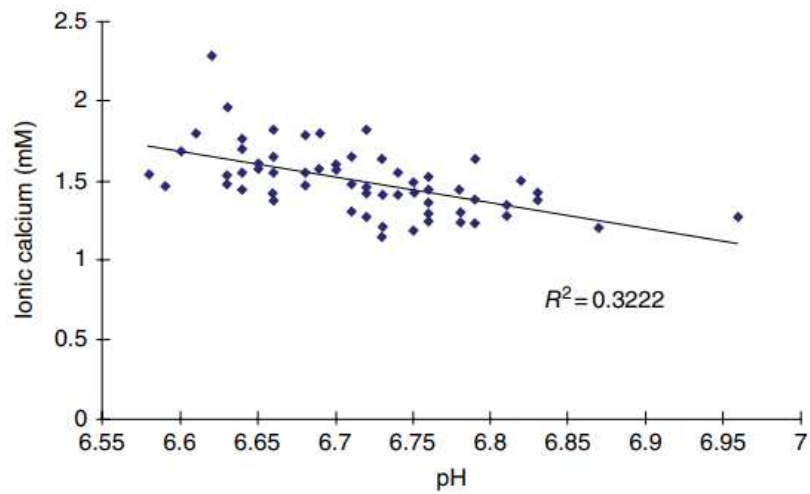
Durante o tratamento térmico, as concentrações de cálcio e fosfato na fase coloidal aumentam à medida que temperatura é elevada (ANEMA, 2021). Após o resfriamento, o cálcio iônico é parcialmente recuperado, porém esse fenômeno ocorre em uma relação logarítmica em relação ao tempo. Tsioulpas *et al.* (2010) avaliou a concentração de cálcio iônico em leite esterilizado antes do tratamento térmico (1,87 mM) e após seis meses de armazenamento (1,91 mM).

Em outro experimento, Omoarukhe *et al.* (2010) avaliou o teor de cálcio iônico em leite processado via UHT e encontrou o valor de 1,57 mM. De acordo com Gaur, Schalk e Anema (2018), a concentração de cálcio iônico em leite UHT sem adição de estabilizantes foi de 1,33 mM. Segundo Lewis (2011), o teor de cálcio iônico em leite UHT com fortificação de cálcio variou entre 1,10 e 2,23 mM.

A redução do pH promove a protonação de determinados constituintes do leite, tais como: fosfatos orgânicos e inorgânicos, citratos e resíduos carboxílicos. Conseqüentemente, o fosfato de cálcio coloidal é solubilizado, e a diminuição do pH leva ao aumento de cálcio iônico na fase solúvel (GAUCHERON, 2005).

Segundo Deeth e Lewis (2017), apesar de existir relação entre o cálcio iônico e o pH, ela não é uma correlação forte. Isso ocorre, pois, amostras com um pH específico podem ter uma ampla faixa de concentração de cálcio iônico e vice-versa. Nian *et al.* (2012) avaliou a relação entre o pH e o teor de Ca^{2+} em leite bovino e o resultado está apresentado no Gráfico 3.

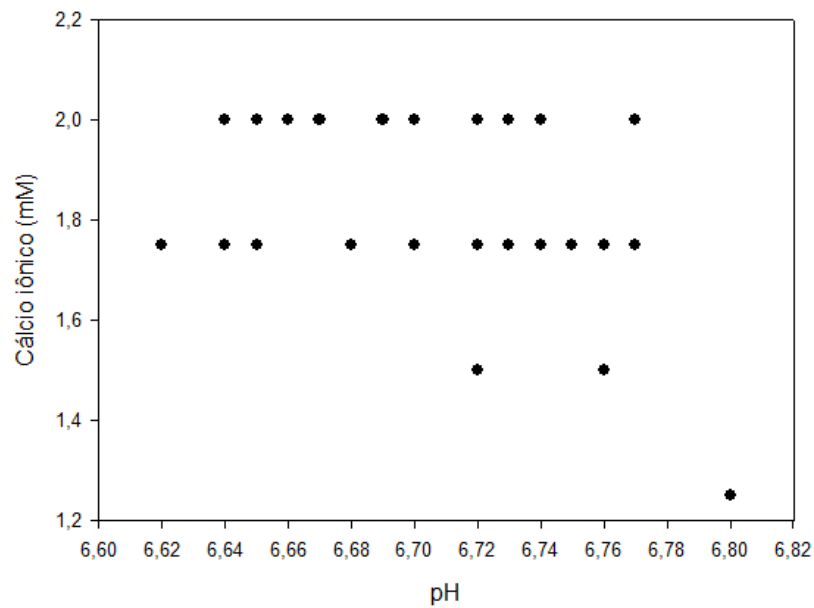
Gráfico 3 – Relação entre o teor de cálcio iônico (mM) e o pH para amostras de leite bovino



Fonte: (Nian *et al.*, 2012)

O coeficiente de correlação linear encontrado foi de 0,3222 na faixa de pH entre 6,55 e 7,0. O Gráfico 4 mostra a relação entre a concentração de cálcio iônico e o pH para as quarenta amostras de leites UHT comerciais analisadas.

Gráfico 4 – Concentração de cálcio iônico em função do pH para as amostras de leite UHT



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

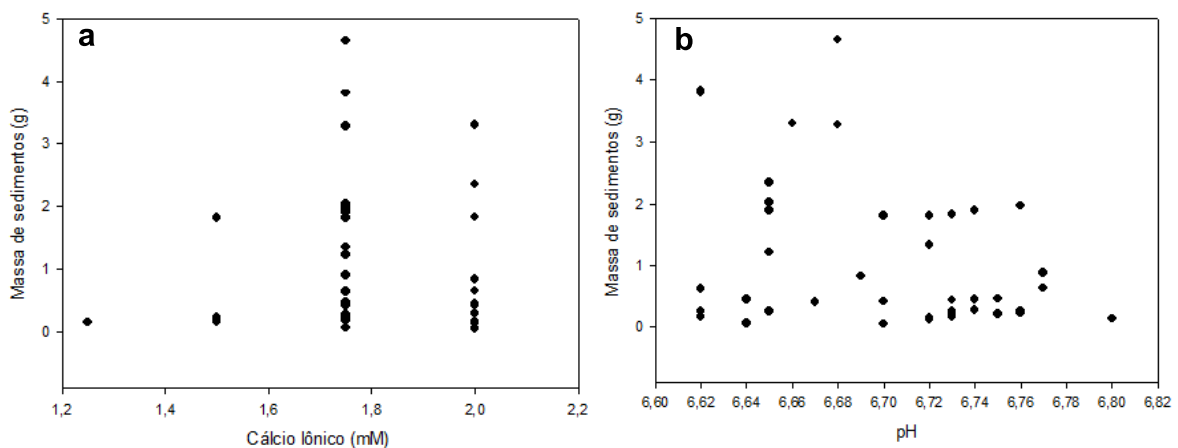
Não foi observada correlação significativa ($R^2 = 0,0479$) entre o cálcio iônico e o pH. Esse fato também pode ser explicado pela adição de estabilizantes em grande parte das amostras de leites UHT. Os sais estabilizadores (citratos e fosfatos) reduzem a concentração de cálcio iônico no meio, pois agem como agentes quelantes (DEETH; LEWIS, 2015).

O pH do leite UHT exerce efeito relevante na sedimentação. A redução do pH ($< 6,55$) pode aumentar acentuadamente os níveis de sedimentação. Outro fator preponderante, que claramente implica em aumento da massa de sedimentos, é o teor de cálcio iônico. O aumento da concentração desse íon ($> 2,0$ mM) eleva o risco de sedimentação (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

O processamento UHT causa uma dissociação significativa de κ -caseína das micelas. Devido a isso, as micelas com depleção de κ -caseína são instáveis e podem formar agregados via ponte de cálcio, se o pH do leite estiver abaixo dos níveis críticos e/ou o cálcio iônico estiver acima dos níveis críticos (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

O Gráfico 5 mostra as relações entre a sedimentação e a concentração de cálcio iônico e entre a sedimentação e o pH, para as quarenta amostras de leites UHT comerciais analisadas. Não foi observada correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a massa de sedimentos e o pH e entre a massa de sedimentos e o cálcio iônico. Uma possível explicação para isso é que nas amostras analisadas não foram verificados valores de pH inferiores a 6,55 e as concentrações de cálcio iônico não foram superiores a 2,0 mM.

Gráfico 5 – Relação entre a concentração de cálcio iônico e massa de sedimentos (a) e entre o pH e massa de sedimentos (b) das amostras de leites UHT

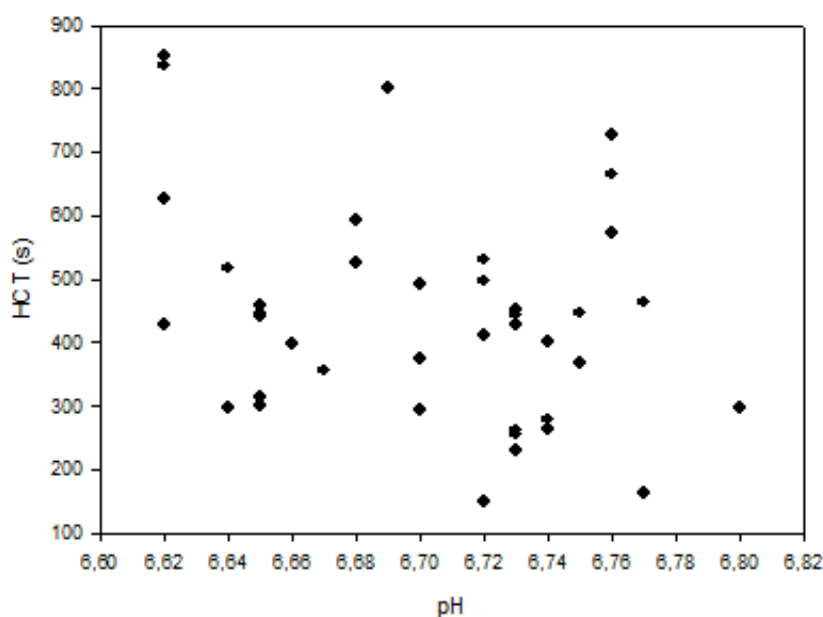


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O método mais utilizado para determinar a estabilidade do leite ao calor é o tempo de coagulação ao submeter a amostra a uma determinada temperatura (HCT). Assim como no caso da sedimentação, o pH e a concentração de cálcio iônico exercem alta influência na estabilidade térmica das micelas de caseína (HUPPERTZ, 2016).

O HCT aumenta à medida que o pH é elevado, até que atinja o valor máximo em pH natural do leite (6,6 - 6,7). Entre pH 6,7 e 7,0, os valores de HCT decrescem (HUPPERTZ, 2016). Sievanen *et al.* (2008) estudaram a adição de CaCl_2 em leite termicamente tratado e observaram que o HCT aumentou entre pH 6,4 e 6,8 e reduziu na faixa de pH entre 6,8 e 7,2. O Gráfico 6 mostra a relação entre o pH e o tempo de coagulação pelo calor para as quarenta amostras de leites UHT comerciais.

Gráfico 6 - Perfil pH-HCT das amostras de leites UHT

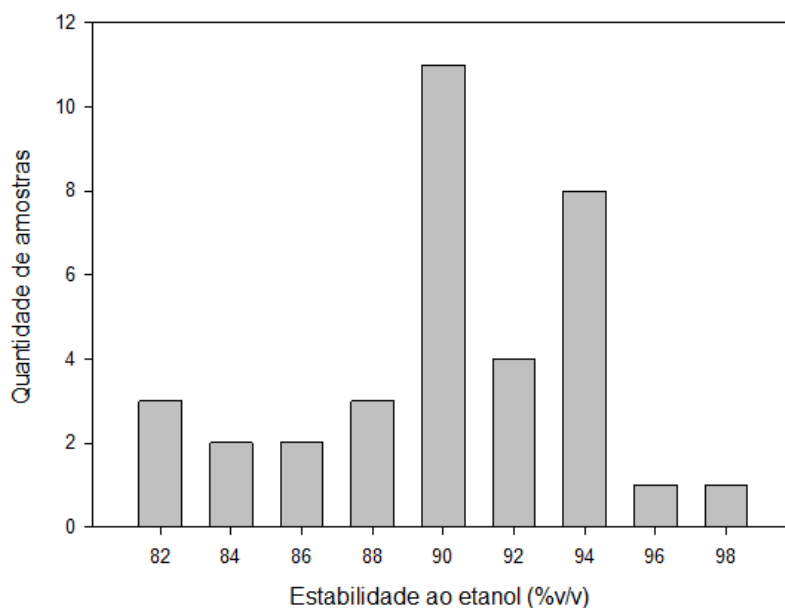


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para a faixa de pH (6,62 - 6,80) na qual se encontram as amostras do experimento, não foi observada correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o HCT e o pH. Uma possível explicação é que o leite nessa faixa de pH e nas concentrações de cálcio iônico das amostras (1,25 - 2,00 mM) apresenta alta estabilidade térmica.

A estabilidade ao etanol é um teste amplamente utilizado no Brasil para previsão da estabilidade térmica do leite (COSTA, 2016). O Gráfico 7 apresenta a distribuição das amostras segundo a graduação alcoólica.

Gráfico 7 - Quantidade de amostras de leites UHT em relação a graduação alcoólica do teste de estabilidade ao etanol



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Segundo Brasil (1997), o leite UHT após incubação a 35 - 37 °C durante sete dias deve ser estável ao etanol 68%. Pode-se observar que os resultados variaram entre 82% e 98% e foram muito superiores ao mínimo estabelecido pela legislação brasileira.

Karlsson *et al.* (2019) testou a estabilidade ao etanol para leites UHT sem estabilizantes durante a vida de prateleira. Imediatamente após o processamento, a amostra apresentou o valor de 80%. Após 52 semanas armazenado a 20 °C, o valor encontrado foi de 60%.

Costa (2016) avaliou a estabilidade ao etanol para leites pasteurizados com a adição de diferentes sais estabilizadores. Os valores encontrados variaram entre 82% e 96%.

As matrizes alimentares contêm partículas eletricamente carregadas, que interagem umas com as outras e com o meio. O potencial zeta tem o objetivo de avaliar a estabilidade do leite a partir da determinação da carga elétrica líquida do

sistema (CANO-SARMIENTO *et al.*, 2018). Os constituintes que têm o maior fator de contribuição são as micelas de caseína e a membrana do glóbulo de gordura (GAUCHER *et al.*, 2008). Os leites desnatado e integral em pH natural do leite apresentam os potenciais zeta de -18 mV e -22 mV, respectivamente.

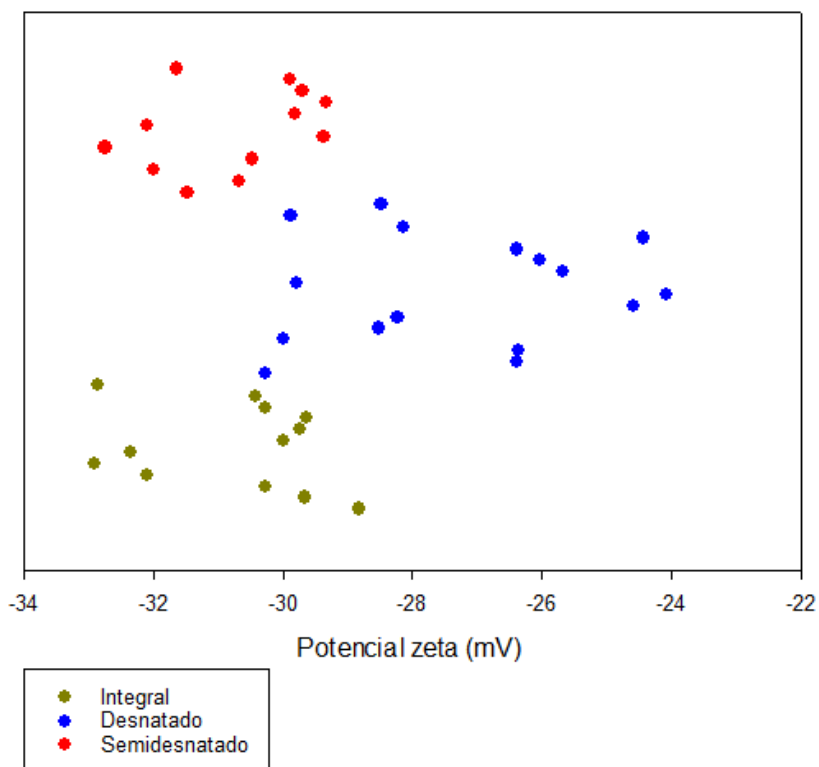
Determinados fatores como pH, tratamento térmico, concentração de cálcio iônico e homogeneização podem afetar a carga elétrica líquida do leite (CANO-SARMIENTO *et al.*, 2018).

Gaucher *et al.* (2008) avaliaram o potencial zeta de amostras de leite UHT semidesnatado que não foram homogeneizadas e encontraram valores entre -18 mV e -22 mV. Anema (2017) avaliou amostras de leite UHT desnatado e não homogeneizado e obteve valores entre -14 mV e -16 mV. Em outro experimento, Tsioulpas *et al.* (2010) testou o efeito da adição de sais estabilizadores em leite desnatado, esterilizado, não homogeneizado e após seis meses de produção, encontrando valores de potencial zeta entre -26,0 mV e -28,7 mV.

O Gráfico 8 mostra a distribuição das amostras de leites UHT comerciais de acordo com o potencial zeta. A partir do gráfico, pode-se observar que os valores de potencial zeta variaram entre -24,10 mV e -32,9 mV. Os resultados encontrados diferem daqueles reportados na literatura. Uma possível explicação está relacionada ao processo de homogeneização das amostras de leite UHT comerciais.

A homogeneização leva a diminuição do potencial zeta dos glóbulos de gordura devido a adsorção de proteínas do soro e micelas de caseína na superfície do glóbulo (MICHALSKI *et al.*, 2001).

Gráfico 8 - Potencial zeta das amostras de leites UHT



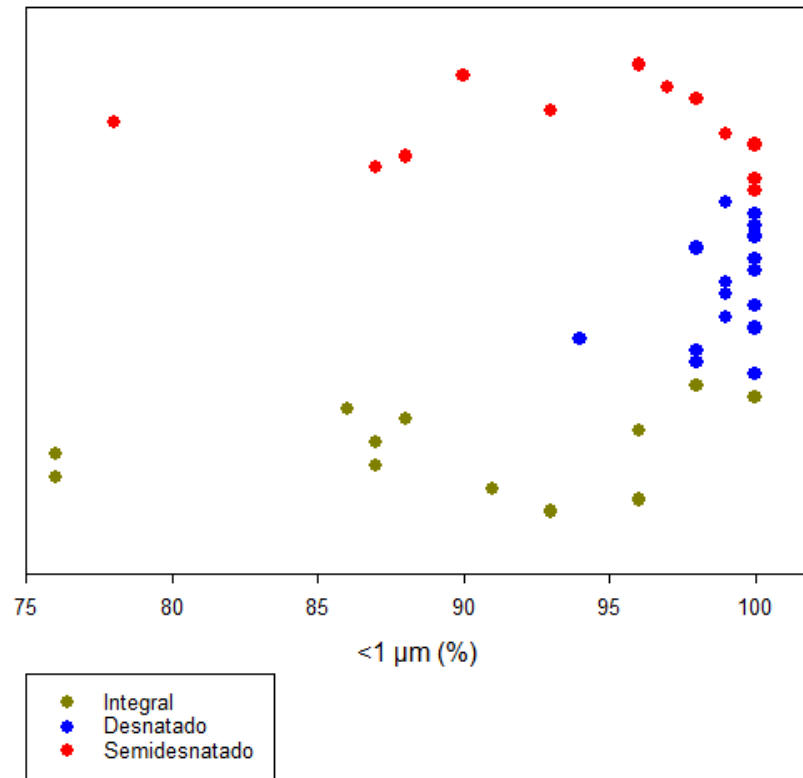
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A gordura encontra-se dispersa no leite na forma de glóbulos esféricos visíveis no microscópio, com diâmetro de 1,5 a 10 μm , em média 3-5 μm . Por sua vez, as micelas de caseína apresentam formato esférico com diâmetro entre 40 e 300 nm, em média 200 nm (DEETH; LEWIS, 2017).

Obeid *et al.* (2019) estudou o efeito da homogeneização (20 MPa) sobre a distribuição de tamanho das partículas. Os glóbulos de gordura apresentaram distribuição bimodal para o diâmetro (0,17 e 0,6 μm). As micelas de caseínas apresentaram o diâmetro médio de 173 nm.

O Gráfico 9 apresenta o percentual de partículas da amostra com tamanhos menores que um micrometro, para as quarenta amostras de leites UHT comerciais. Pelo gráfico, pode-se notar que 37 amostras apresentaram pelo menos 85% das partículas com tamanhos inferiores a um micrometro. Além disso, 30 das 40 amostras apresentaram pelo menos 90% das partículas com tamanho inferior a esta referência.

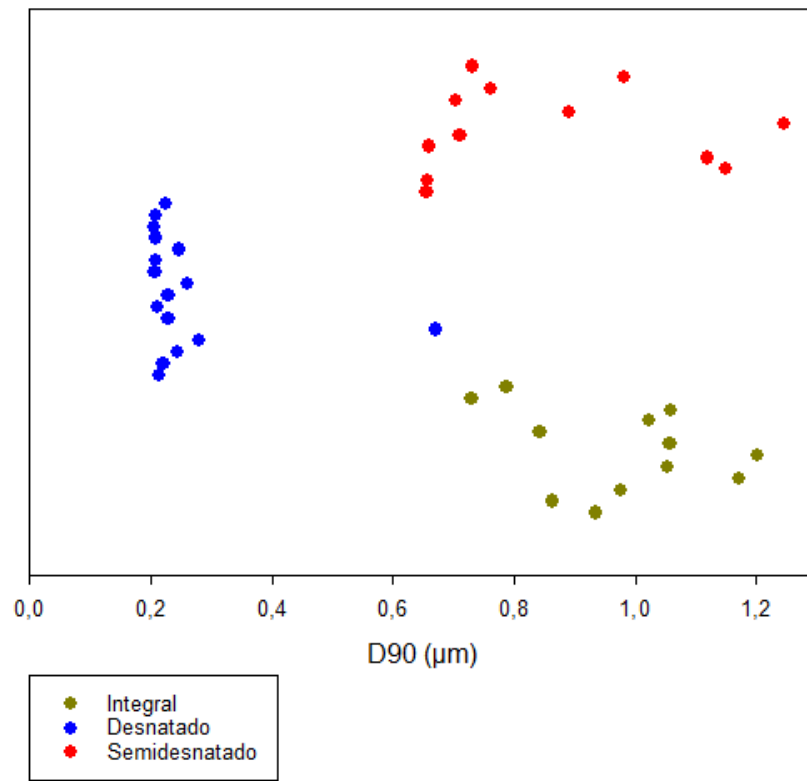
Gráfico 9 - Percentual de partículas com tamanho $<1 \mu\text{m}$ nas amostras de leites UHT



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Segundo Deeth e Lewis (2017), não deve haver um número apreciável de partículas com tamanho superior a um micrometro, a fim de evitar a separação da gordura durante o armazenamento. Se a análise de tamanho de partícula demonstra que existem alguns glóbulos de gordura maiores que um micrometro, estes são os que tendem a se separar, indicando um processo de homogeneização deficiente. O Gráfico 10 mostra os valores do parâmetro D90 das amostras de leites UHT comerciais.

Gráfico 10 - Valores de D90 referente ao tamanho de partícula das amostras de leites UHT



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Pode-se observar que o maior valor de D90 encontrado foi de 1,24 µm. Deeth e Lewis (2017) recomendaram que esse valor para leite homogeneizado não fosse superior a 1,7 µm. Além disso, um processo adequado de homogeneização deve fornecer D90 abaixo de 1,3 µm. Portanto, os valores encontrados para as amostras de leites UHT comerciais estavam dentro da faixa apropriada.

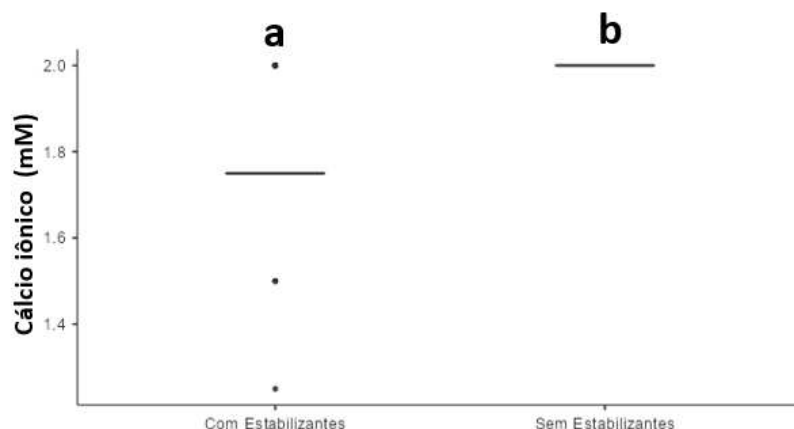
5.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ADITIVOS NA ESTABILIDADE COLOIDAL DAS AMOSTRAS DE LEITES UHT COMERCIAIS

5.2.1 Avaliação da influência da adição de sais estabilizadores na estabilidade coloidal das amostras

A adição de sais estabilizadores (citratos e fosfatos) reduz a concentração de cálcio iônico no meio, pois agem como agentes quelantes. Por isso, amostras que

sofreram adição de sais estabilizadores apresentaram menor teor de cálcio iônico (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Influência da adição de estabilizantes no teor de cálcio iônico

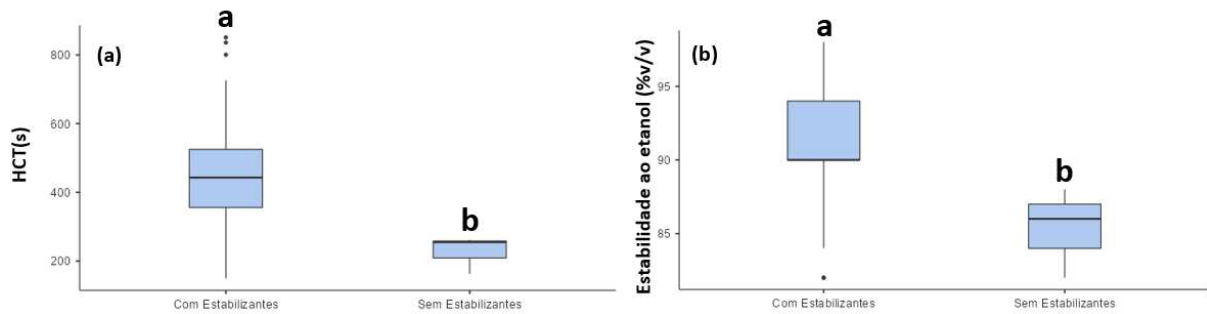


Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Gaur, Schalk e Anema (2018) avaliaram a adição de diferentes fosfatos e citratos e concluíram que os teores de cálcio iônico das amostras apresentaram redução significativa.

O aquecimento produz um arranjo micelar que tem uma estabilidade coloidal reduzida e, portanto, extremamente propenso à agregação induzida pela atividade do íon cálcio. Outra condição que afeta a estabilidade coloidal é a adição de etanol. Por isso, amostras sem estabilizantes, logo, com maior teor de cálcio iônico, indicaram menor tempo de coagulação por calor (Gráfico 12a) e menor estabilidade ao álcool (Gráfico 12b).

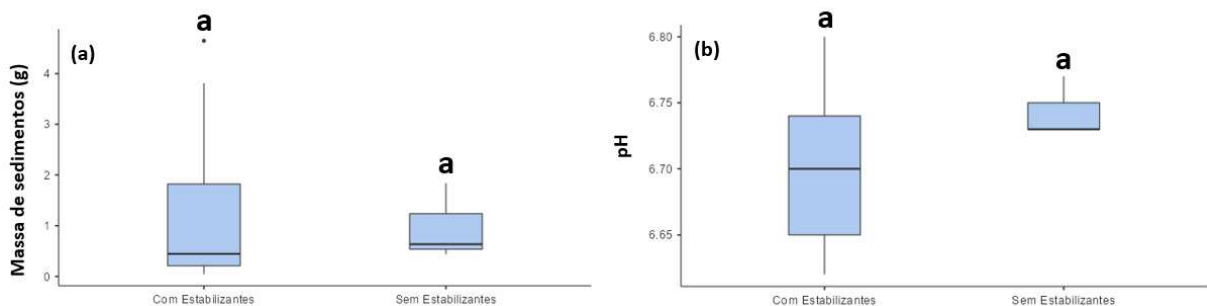
Gráfico 12 - Influência da adição de estabilizantes no HCT (a) e na estabilidade ao etanol (b)



Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As amostras com adição e sem adição de estabilizantes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na massa de sedimentos (Gráfico 13a) ou no pH (Gráfico 13b).

Gráfico 13 - Influência da adição de estabilizantes na massa de sedimentos (a) e no pH (b)



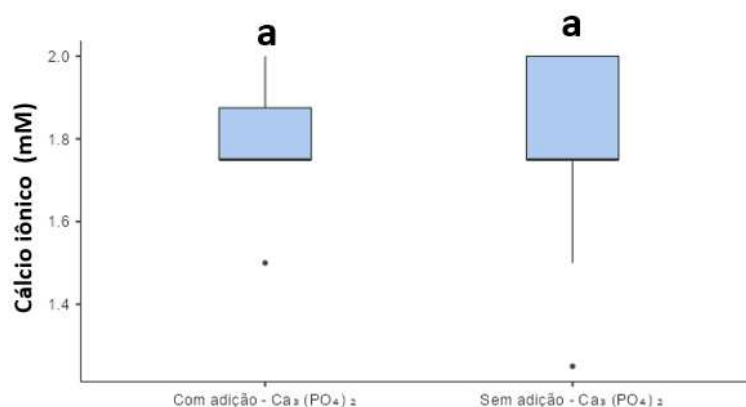
Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Isso se deve ao fato de nenhuma amostra apresentar valor de pH inferior a 6,55. Apesar de as amostras sem estabilizantes apresentarem maiores concentrações de cálcio iônico, não foram observados valores superiores a 2,0 mM, o que também explica a não existência de diferenças significativas em relação à sedimentação.

5.2.2 Avaliação da influência do enriquecimento de cálcio na estabilidade coloidal das amostras

A amostras com e sem adição de fosfato tricálcico não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no teor de cálcio iônico (Gráfico 14). Apesar da adição de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, as amostras com enriquecimento não exibiram valores elevados no teor de cálcio iônico. Isso pode ser explicado devido a adição de sais estabilizantes nessas amostras.

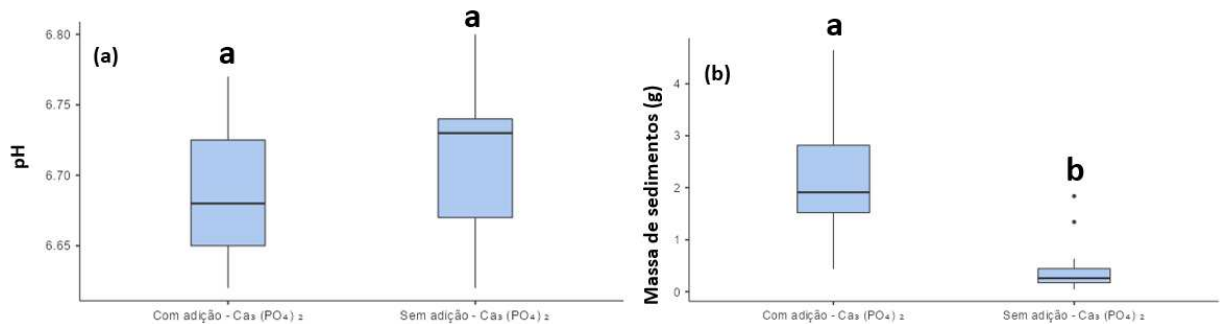
Gráfico 14 - Influência do enriquecimento de cálcio no teor cálcio iônico



Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no pH (Gráfico 15a) e no teor de cálcio iônico entre as amostras com ou sem enriquecimento de cálcio. Além disso, os valores encontrados não ultrapassaram os limites indicados pela literatura. Porém, a massa de sedimentos (Gráfico 15b) em amostras com adição de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ foi significativamente maior. A possível causa para esse fenômeno está associada à solubilidade dos aditivos alimentares fortificantes que ocorrem nessas amostras. Cabe ressaltar a presença de pirofosfato férrico, que é insolúvel em água.

Gráfico 15 - Influência do enriquecimento de cálcio no pH (a) e na massa de sedimentos (b)

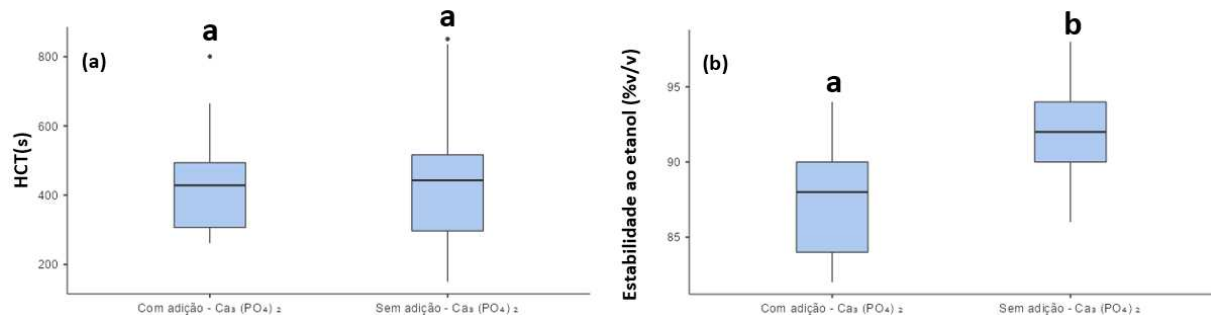


Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas no tempo de coagulação por calor (Gráfico 16a). Porém, a estabilidade ao etanol (Gráfico 16b) foi significativamente menor nas amostras com enriquecimento de cálcio.

Gráfico 16 - Influência do enriquecimento de cálcio no HCT (a) e na estabilidade ao etanol (b)



Dados identificados com a mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados que apresentam letras distintas, diferem significativamente entre si.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

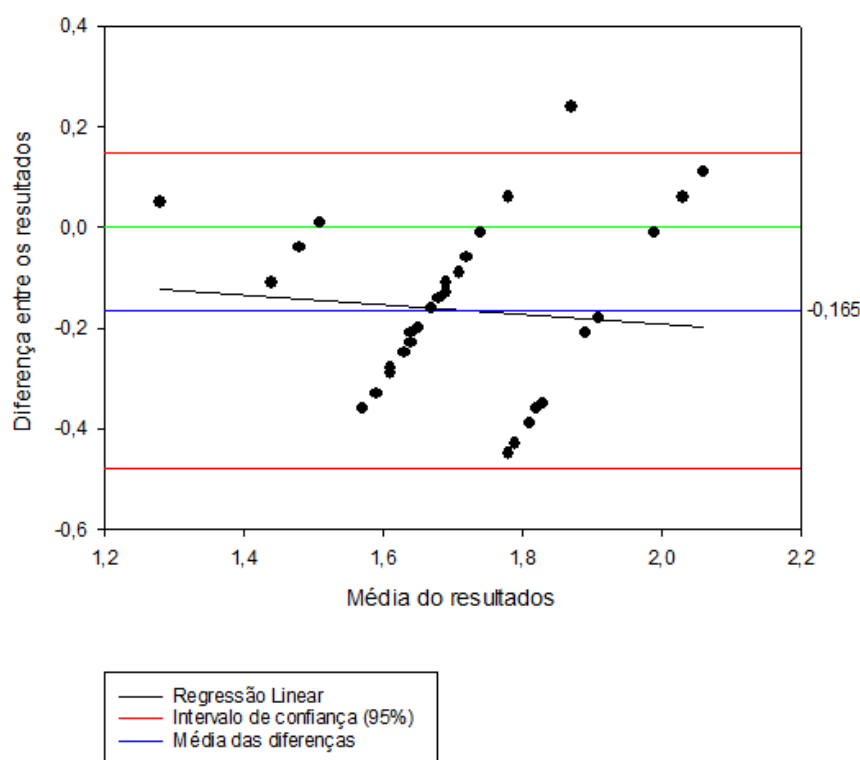
Esses dois testes de desestabilização do leite apresentam correlações quando analisados sob a ótica da disponibilidade de cálcio no meio. Porém, existem uma série de alterações induzidas pelo calor que apresentam notável influência na estabilidade coloidal. Por isso, não é adequado traçar correlações quantitativas entre os dois métodos. Segundo Anema (2019), o teste do álcool é geralmente eficaz na avaliação

de leites com qualidade excepcionalmente boa ou ruim. Porém, é menos adequado para discriminar amostras que apresentam estabilidade intermediária.

5.3 CONCORDÂNCIA ENTRE OS ELETRODOS DE ÍON SELETIVO

O Gráfico 17 apresenta o gráfico de Bland-Altman construído a partir das análises de concentração de cálcio iônico no pH original das amostras de leites UHT, realizadas nos eletrodos de íon seletivo Thermo Scientific Orion ISE meter/9720BNWP (Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, Estados Unidos) e LAQUAtwin B-751 (Horiba Instruments, Inc., Irvine, Estados Unidos).

Gráfico 17 - Avaliação da concordância entre os eletrodos íon seletivos na análise de cálcio iônico das amostras de leites UHT por meio do gráfico de Bland-Altman



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A partir do gráfico é possível perceber que o eletrodo LAQUAtwin B-751 (Horiba Instruments, Inc., Irvine, Estados Unidos) apresentou uma tendência a subestimar o resultado do eletrodo Thermo Scientific Orion ISE meter/9720BNWP (Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, Estados Unidos) em 0,165 mM. O teste t para a diferença dos

resultados apresentou valor $p < 0,05$. Portanto, os instrumentos têm uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados.

No entanto, não foi confirmado um viés de proporção, pois a distribuição espacial dos pontos no gráfico foi homogênea e não houve uma correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a média e a diferença dos resultados obtidos pelos instrumentos. Por isso, segundo Hirakata e Comey (2009), apesar de as medidas não serem concordantes, é possível somar a média das diferenças (-0,165 mM) ao valor medido pelo eletrodo LAQUAtwin B-751 (Horiba Instruments, Inc., Irvine, Estados Unidos). Essa soma realiza a compensação entre os resultados das análises de cálcio iônico obtidos por meio dos dois métodos, em leites UHT no pH original da amostra. Também é possível notar que apenas uma amostra apresentou resultado fora dos limites de confiança de 95%. Esses limites representam a região em que se encontram 95% de todos os casos estudados (BLAND; ALTMAN, 1999).

6 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do presente estudo, foi possível avaliar a estabilidade e investigar os sistemas coloidais de quarenta amostras de leites UHT comercializados nas regiões Sul e Sudeste.

O pH das amostras e a concentração de cálcio iônico apresentaram valores consoantes com os dados da literatura. As amostras não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas no que tange ao pH. Porém, em relação ao cálcio iônico, as amostras que não receberam adição de estabilizantes exibiram concentrações significativamente maiores, o que está ligado ao fato de os sais estabilizadores agirem como agentes quelantes para o íon cálcio.

Ademais, não houve correlação estatisticamente significativa entre a massa de sedimentos e o pH e entre a massa de sedimentos e o cálcio iônico. Por isso, a sedimentação observada nas amostras que sofreram fortificação pode estar relacionada com a solubilidade dos sais adicionados.

As amostras que não receberam adição de estabilizantes apresentaram menor estabilidade térmica quando comparadas às amostras que sofreram adição de sais estabilizadores. Essa diferença pode estar associada ao maior teor de cálcio iônico, que promove redução da carga líquida negativa das micelas de caseína e pode levar à agregação.

As estabilidades ao etanol das amostras apresentaram valores muito superiores aos estabelecidos pela legislação. Novamente, as amostras sem estabilizantes exibiram menor estabilidade, devido ao fato de o álcool promover colapso da estrutura estabilizadora de κ -caseína. O novo arranjo micelar tem estabilidade coloidal muito reduzida e é extremamente propenso à agregação induzida pela atividade do íon cálcio.

As análises de potencial zeta mostraram valores menores que os reportados na literatura. Uma possível explicação está relacionada ao processo de homogeneização das amostras de leite UHT comerciais.

A maioria das amostras apresentaram uma alta porcentagem de partículas menores que um micrometro. Além disso, nenhuma amostra apresentou valor de D90 maior que 1,3 μm . Esse resultado evidencia que os leites UHT foram submetidos a processos de homogeneização eficientes.

A avaliação da concordância entre os eletrodos íon seletivos utilizados para a análise de cálcio iônico das amostras de leites UHT mostrou que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos. No entanto, como não foi confirmado um viés de proporção, é possível somar a média das diferenças para realizar a compensação entre os resultados dos dois eletrodos.

REFERÊNCIAS

- ANEMA, S. G. The Whey Proteins in Milk: Thermal Denaturation, Physical Interactions, and Effects on the Functional Properties of Milk. In: **Milk Proteins**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 269-318.
- ANEMA, S. G. Storage stability and age gelation of reconstituted ultra-high temperature skim milk. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 56-67, dez. 2017.
- ANEMA, S. G. Age Gelation, Sedimentation, and Creaming in UHT Milk: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.18, p. 140-166, jan. 2019.
- ANEMA, S. G. Heat-induced changes in caseins and casein micelles, including interactions with denatured whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 122, nov. 2021.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 8, n. 2, p. 135-160, abr. 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 de dezembro de 2006, Seção 1, Página 8, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria n° 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 08 set. 1997. Seção I.
- CANO-SARMIENTO, C. et al. Zeta Potential of Food Matrices. **Food Engineering Reviews**, set. 2018.
- COSTA, C. H. F. DA. **Avaliação microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool visando procedimento UHT**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265-2272, mar. 2011.
- DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins**. 3. ed. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 233-276.
- DE KRUIF, C. G. et al. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, mar. 2012.

DEETH, H. C.; LEWIS, M. J. Practical consequences of calcium addition to and removal from milk and milk products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 1, fev. 2015.

DEETH, H. C.; LEWIS, M. J. **High temperature processing of milk and milk products**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2017.

DUMPLER, J.; KULOZIK, U. Heat stability of concentrated skim milk as a function of heating time and temperature on a laboratory scale - Improved methodology and kinetic relationship. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 111-117, out. 2015.

EISNER, M. D. Direct and indirect heating of milk – A technological perspective beyond time–temperature profiles. **International Dairy Journal**, nov. 2021.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2022**. Juiz de Fora: EMBRAPA - Gado de Leite, 2022.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2023**. Juiz de Fora: EMBRAPA - Gado de Leite, 2023.

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

GAUCHER, I. et al. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 130-143, jan. 2008.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n.4, p. 473-483, jul. 2005.

GAUR, V. **Sedimentation reduction in UHT milk**. 2017. Thesis (Doctor of Philosophy in Chemical and Process Engineering). University of Canterbury, Christchurch, 2017.

GAUR, V.; SCHALK, J.; ANEMA, S. G. Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 92-102, mar. 2018.

HINDMARSH, J. P. et al. Expanding solid-state phosphorus nuclear magnetic resonance insights into Mozzarella cheese ageing. **Journal of Food Engineering**, v. 242, p. 31-46, fev. 2019.

HIRAKATA, V. N.; CAMEY, S. A. Análise de Concordância entre Métodos de Bland-Altman. **Rev HCPA**, v. 29, n. 3, p. 261-268, 2009.

HUPPERTZ, T. Heat stability of milk. In: MCSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY J.A. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects**. 4.ed. Nova Iorque: Springer Science+Business Media, 2016. p. 179-196.

HUPPERTZ, T.; NIEUWENHUIJSE, H. Constituent fouling during heat treatment of milk: A review. **International Dairy Journal**, mar. 2022.

KARLSSON, M. A. et al. Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures. **Heliyon**, v. 5, n. 9, set. 2019.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. **International Journal of Dairy Technology**, fev. 2011.

MASOTTI, F. et al. Analytical advances in the determination of calcium in bovine milk, dairy products and milk-based infant formulas. **Trends in Food Science and Technology**, v. 103, p. 348-360, set. 2020.

HORNE, D.S. Heat stability of milk. In: MCSWEENEY, P.L.H.; O'MAHONY J.A. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects**. 4. ed. Nova lorque: Springer Science+Business Media, 2016. p. 225-246.

MICHALSKI, M.-C. et al. Apparent ζ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 23, p. 23-30, 2001.

NIEUWENHUIJSE, H.; HUPPERTZ, T. Heat-induced changes in milk salts: A review. **International Dairy Journal**, v. 126, mar. 2022.

NIAN, Y., CHEN, B., AIKMAN, P., GRANDISON., A & LEWIS, M.J. Naturally occurring variations in milk pH and ionic calcium and their effects on some properties and processing characteristics of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 490-497, nov. 2012.

OBEID, S. et al. The surface properties of milk fat globules govern their interactions with the caseins: Role of homogenization and pH probed by AFM force spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, out. 2019.

OMOARUKHE, E. D. et al. Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, p. 504-511, nov. 2010.

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

SIEVANEN, K. et al. Influence of added calcium chloride on the heat stability of unconcentrated and concentrated bovine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 2, p. 151-155, mai. 2008.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins**. 3. ed. Nova lorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 139-201.

TSIOULPAS, A. et al. Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1027-1034, out. 2010.

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

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

WANG, Q.; MA, Y. Effect of temperature and pH on salts equilibria and calcium phosphate in bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 110, nov. 2020.