

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA  
E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE  
ORIGEM ANIMAL**

**LEIDE ROBERTA BARBOZA DE MELO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE UHT:  
ASPECTOS BACTERIOLÓGICOS, FÍSICO-  
QUÍMICOS, AVALIAÇÃO DE EMBALAGENS E  
ROTULAGENS**

**NITERÓI  
2015**

**LEIDE ROBERTA BARBOZA DE MELO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE UHT: ASPECTOS  
BACTERIOLÓGICOS, FÍSICO-QUÍMICOS , AVALIAÇÃO DE  
EMBALAGENS E ROTULAGENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador:

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Coorientadores:

Prof. Dr. MARCO ANTONIO SLOBODA CORTEZ

Profa. Dra. LUCIANA MARIA RAMIRES ESPER

Niterói  
2015

**LEIDE ROBERTA BARBOZA DE MELO**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE UHT: ASPECTOS  
BACTERIOLÓGICOS, FÍSICO-QUÍMICOS , AVALIAÇÃO DE  
EMBALAGENS E ROTULAGENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Maria Ramirez Ésper - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carmela Kasnowski Holanda - FMUV

Niterói  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal Fluminense e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de aperfeiçoamento e pela concessão de bolsa de estudo e apoio a pesquisa.

Ao meu orientador e mentor Robson Maia Franco, pelo apoio, ensinamentos, orientação e por sempre me forçar a ser melhor.

À minha Co-orientadora Luciana Maria Ramirez Éesper, pela imensa ajuda, dedicação e amizade. Obrigada por estar disponível além do tempo.

Ao meu Co-orientador e marido Marco Antonio Sloboda Cortez, por toda a dedicação, apoio, ensinamentos, paciência, compreensão e companheirismo nesse período de trabalho intenso. Obrigada por sempre incentivar, me fazer crescer e por dividir principalmente os momentos de tensão.

Aos colegas e amigos que participaram, direta ou indiretamente, deste período de pesquisa pela convivência, ajuda, companhia e ensinamentos, em especial para Raphael Barros, Raquel Sant`Anna de Oliveira e Gilberto Fellows, que tornaram essa jornada muito mais divertida e interessante.

À minha mãe Bernadete Regina Barboza de Melo por sempre me incentivar e acreditar em mim, obrigada pela imensa força, dedicação e apoio, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Obrigada por ser meu esteio e por me amar além da vida.

Ao meu pai Roberto Leite de Melo, pelo incentivo, dedicação, carinho e apoio em todos os momentos, obrigada por apostar no meu sucesso e fazer de mim a pessoa que sou hoje.

À minha irmã querida Renata Barboza de Melo que está sempre disposta a me ajudar, e foi responsável por parte da lapidação deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha construção de caráter e por dividir minhas alegrias.

## RESUMO

O leite “Ultra High Temperature” (UHT) possui grande importância mercadológica, sendo o leite de maior consumo no Brasil. Objetivou-se com este trabalho pesquisar os aspectos de qualidade do leite UHT, pela avaliação da contaminação bacteriológica, verificação da integridade das embalagens e das informações da rotulagem, determinação da composição física e química e da ocorrência de fraudes. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram crioscopia, densidade, sólidos totais, acidez titulável, composição (teor de lactose, gordura, proteína e minerais) e a presença de fraudes (amido, cloreto, neutralizante de acidez, cloro e hipoclorito). As embalagens foram verificadas quanto à qualidade das soldas transversais e longitudinais, além da avaliação da presença de microfuros. A avaliação das informações das rotulagens seguiu o determinado na legislação. As análises bacteriológicas foram enumeração de Bactérias Heterotróficas Aeróbias e Mesófilas (BHAM), contagem de *Clostridium* Sulfito Redutores, contagem de bactérias psicrotróficas e contagem de *Bacillus* spp.. A interpretação dos resultados obtidos permitiu uma análise mais crítica da real conjuntura da qualidade do leite UHT no Brasil, possibilitando a adequação do processo de elaboração e mesmo a re-avaliação dos padrões legais propostos.

Palavras-chave:

Leite UHT; Contaminação; Controle de qualidade; Leite Longa Vida

## ABSTRACT

The *Ultra High Temperature* (UHT) milk is of great importance in the Brazilian market as it is the most consumed type of milk among Brazilians. The objective of this project was to explore UHT milk's quality standards, by evaluating the level of bacteriological contamination, as well as by verifying the packaging integrity and accuracy of the label information, by determining the chemical composition and by identifying any fraud occurrence. Chemical parameters evaluated were cryoscopic index, density, total solid, titratable acidity, composition (lactose, fat, protein and minerals content) and by verifying the existence of frauds (sucrose, chloride, acidity neutralizers, chlorine and hypochlorite). The packaging were examined by checking the quality of the transversal and longitudinal welds as well as by looking for the presence of micro holes. The label information followed the instructions determined by the specific law. The bacterial analysis were mesophilic aerobic heterotrophic bacteria enumeration, clostridium sulphite reducers, psychrotrophic bacterias and *Bacillus* spp counting. The study of the results obtained enabled a more thorough analysis of the overall quality of UHT milk in Brasil, creating an opportunity to improve its conception process as well as re-evaluation of the current legal standards in place.

Key Words:

UHT Milk; Contamination; Quality control; Long Life Milk

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig.1 Diagrama esquemático do processo UHT, p. 13
- Fig.2 Counts of Strict and facultative aerobic mesophilic in UHT Whole and Skimmed Milk, p. 35
- Fig.3 Counts of *B. sporothermodurans* in UHT Whole and Skimmed Milk, p. 35
- Fig.4 Counts of Sulphite Reducing Clostridia in UHT Whole and Skimmed Milk, p.36
- Fig.5 Counts of presumptive *Bacillus cereus* in UHT Whole and Skimmed Milk, p.36
- Fig.6 Results of packaging analysis in comparison with mesophilic growth, p. 46
- Fig.7 Counts of Strict and facultative aerobic mesophilic in UHT Milk for First and Last Month, p. 46
- Fig.8 Counts of *B. sporothermodurans* in UHT Milk for First and Last Month, p. 47
- Fig.9 Counts of Psychrotrophic bacteria in UHT Milk for First and Last Month, p. 47
- Fig.10 Counts of presumptive *Bacillus cereus* in UHT Milk for First and Last Month, p. 48

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Parâmetros de qualidade do leite UHT, p. 15

TABELA 2 - Evaluation of the results of the physicochemical analyses, pH, acidity (% Lactic acid), Freezing point (°H), Fat (%), Density (g.ml-1), Total Solids % TS), Nonfat Solids (% NS), Lactose (%), Protein (%) and Minerals (%), in 16 samples of whole milk (W) and 16 samples of skimmed milk (S), p. 37

TABELA 3 - Analysis results of Acidity (% Lactic acid), Fat content (Fat %), Freezing point (°H), TS content (TS%), from 20 UHT milk brands, in first and last months of expiry date, p. 44

TABELA 4 - Analysis results of Density (g.ml-1), Lactose, Protein e Minerals contents (Lactose (%), Protein (%) and Minerals (%)), from 20 UTH milk brands, in first and last months of expiry date, p. 45



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BceT	Enterotoxina T
BHAM	Bactéria Heterotróficas Aeróbias Mesófilas
CFU	Colony-forming Unit
CytK	Enterotoxina K
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ENH	Enterotoxina Não Hemolítica
HBL	Hemolisina BL
PCR	Polimerase Chain Reaction
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHT	Ultra High Temperature

## SUMÁRIO

**RESUMO**, p. 4

**ABSTRACT**, p. 5

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, p. 6

**LISTA DE TABELAS**, p. 7

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, p. 8

**1 INTRODUÇÃO**, p. 10

**2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**, p. 12

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO, p. 12

2.2 QUALIDADE NUTRIIONAL DO LEITE UHT, p. 14

2.3 PARÂMETROS LEGAIS DO LEITE UHT, p.14

2.4 CONTAMINAÇÃO DO LEITE UHT, p. 16

**2.4.1 Contaminação Bacteriológica**, p. 17

**2.4.2 Contaminação Química**, p. 19

**3 DESENVOLVIMENTO**, p. 21

3.1 ASSESSMENT OF BACTERIOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL, PACKAGING AND LABELING QUALITY OF COMMERCIAL UHT MILK, p. 21

3.2 QUALITY EVALUATION OF UHT MILK THOUGHOUT ITS SHELF LIFE, p. 39

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**, p. 58

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p.59

**6 ANEXOS**, p. 67

6.1 COMPROVANTE DE ENVIO DO ATIGO:

ASSESSMENT OF BACTERIOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL, PACKAGING AND LABELING QUALITY OF COMMERCIAL UHT MILK, p. 67

6.2 COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO:

QUALITY EVALUATION OF UHT MILK THOUGHOUT ITS SHELF LIFE, p. 67

## 1 INTRODUÇÃO

O leite UHT é caracterizado pelo aquecimento do produto a temperaturas entre 130-150°C, no período de dois a quatro segundos, seguido de rápido resfriamento. É um dos principais produtos lácteos comercializados no Brasil, especialmente em virtude da estabilidade comercial, que é conferida pelo processamento, embalagem, as propriedades físico-químicas e microbiológicas. No entanto, alterações físicas e químicas, fraudes e modificações causadas por microrganismos são ocorrências frequentes, descaracterizando a qualidade do produto.

O processo térmico de ultra alta temperatura foi desenvolvido para eliminar microrganismos patogênicos, inclusive quando estão na forma esporulada, porém mesmo sendo um tratamento drástico, se a microbiota inicial for muito elevada, a aplicação do processo térmico pode não ser suficiente para destruir a totalidade dos microrganismos, tornando-se possível a sobrevivência de formas esporuladas, microrganismos termodúricos, além de não inativar enzimas termorresistentes pré formadas. Estes microrganismos e enzimas são capazes de desenvolver alterações no leite UHT durante a validade comercial, além da possibilidade de serem potencialmente patogênicos.

Dentre as bactérias de importância destacam-se a *Pseudomonas* spp. e o *Bacillus sporothermodurans*. A *Pseudomonas* spp. é um microrganismo psicrotrófico que apesar de ser destruído durante o processamento, produz enzimas proteolíticas termorresistentes durante o período de refrigeração do leite. Entretanto o *Bacillus sporothermodurans* produz esporos que sobrevivem a altas temperaturas, e mesmo não sendo patogênico, o leite contaminado não atende aos padrões da legislação, no qual é fixado o limite de contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em 100 UFC/mL. Outros microrganismos de importância na contagem de microrganismos no leite UHT são os Clostrídios Sulfito Redutores e os *Bacillus* spp., por serem formadores de esporos, e poderem expressar genes de características enterotoxigênicas, causando grande dano ao consumidor, principalmente quando o leite contaminado é ingerido por grupos de risco.

Visando a padronização dos métodos analíticos para produtos lácteos líquidos, foi preconizado pela Instrução normativa nº62 (BRASIL, 2003) que seja

feita a diferenciação do *B. sporothermodurans* durante a contagem de bactérias heterotróficas, aeróbias e mesófilas, a contagem de *Clostridium* Sulfito Redutor e *Clostridium perfringens*, e contagem de *Bacillus cereus*.

Uma vez isolada uma estirpe típica de *B. cereus* pelos testes bioquímicos é interessante que se questione a capacidade enterotoxigênica por técnicas de biologia molecular, avaliando os genes que conferem tais características, atualmente as enterotoxinas produzidas relacionadas a surtos de doenças veiculadas por alimentos, mais detectadas são: hemolisina BL e enterotoxina não hemolítica.

Outro aspecto fundamental da qualidade do leite UHT é a composição físico-química, que pode estar modificada em casos de fraudes e em virtude de ação do metabolismo microbiano. Entre as principais fraudes, destacam-se a adição de reconstituintes de densidade e água. Em decorrência de fraudes, as informações nutricionais constantes nos rótulos podem não representar a real composição do leite, sendo um aspecto que deve ser observado em relação à qualidade do leite. Também, a avaliação das embalagens, que devem ser hermeticamente fechadas, é outro ponto fundamental, devendo observar a presença de microfuros e problemas das soldas transversais e longitudinais, que poderiam possibilitar a contaminação do leite.

Com este trabalho objetivou-se analisar qualitativamente, por aspectos bacteriológicos e físico-químicos, amostras de leite UHT comercializados no estado do Rio de Janeiro, obtendo-se uma avaliação realista do produto que é comumente consumido.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

O leite é o segundo principal produto de consumo mundial, girando, no ano de 2011, um capital de mais de 183 milhões de dólares com a produção mundial de mais de 614 milhões de mega toneladas, deixando o Brasil em quarto lugar dentre os 20 principais produtores de leite, com a produção anual média de 32 milhões de toneladas (FAO, 2013). No Brasil, a produção de leite vem crescendo progressivamente, sendo que no ano de 2012 foi aproximadamente de 32 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2013).

O leite UHT, também conhecido como longa vida, é o produto final do processo de ultra alta temperatura ou “Ultra High Temperature” (UHT), no qual é submetido a temperatura de 130 a 150°C, por dois a quatro segundos, seguidos de rápido resfriamento em temperatura inferior a 32°C, com subsequente homogeneização asséptica, processo no qual os glóbulos de gordura são diminuídos de tamanho e tem sua membrana parcialmente destruída, melhorando a dispersão dos mesmos na porção aquosa do leite e evitando a coalescência da gordura (TRONCO, 2008), e posterior envase asséptico. O produto pode ter diferentes características com relação ao teor de gordura, sendo classificado em desnatado, semi desnatado e integral (BRASIL, 1997). A matéria prima que dá origem ao leite UHT é o leite cru refrigerado, cujos padrões de qualidade estão descritos na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011), com destaque para o controle da acidificação, que é um fator fundamental para viabilizar o tratamento térmico drástico determinante do processo UHT (CORTEZ; CORTEZ, 2010), de forma que a matéria prima trabalhada possua boa estabilidade das micelas de caseína. Na Figura 1 estão dispostas as etapas do fluxograma básico de produção do leite UHT.

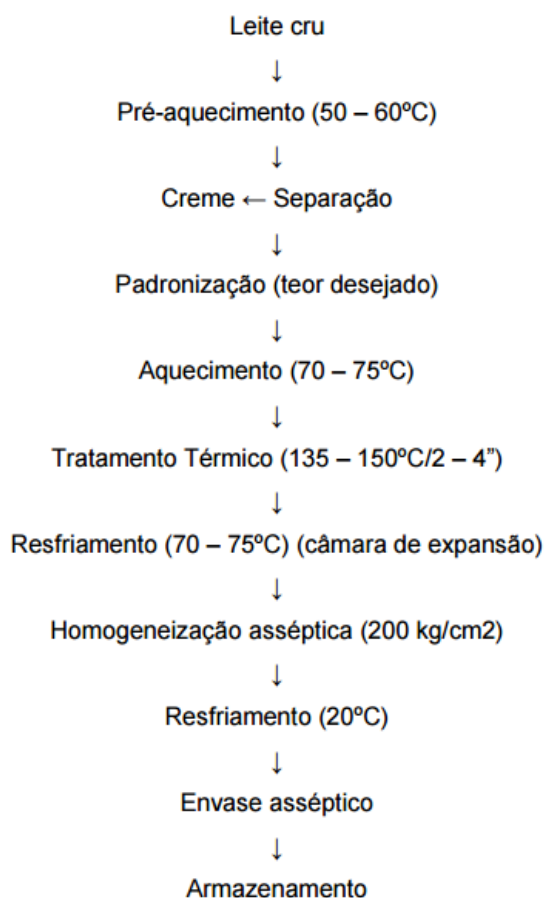


Figura 1: Diagrama esquemático do processo UHT (Fonte: TRONCO, 2008).

O leite UHT é um dos produtos lácteos mais produzidos e comercializados no Brasil, obtendo um crescimento de 70% ao longo de vinte anos. No ano de 2012 foram produzidos seis bilhões de litros, representando aproximadamente 76% de todo o leite consumido no país, o que indica um consumo *per capita* de 172 litros por ano (ABLV, 2014).

O tratamento térmico UHT tem como objetivo a utilização de um processo térmico rápido, visando a eliminação de microrganismos em fase vegetativa e esporulada, mantendo as características nutricionais do leite com mínimas alterações, porém algumas espécies de bactérias mesofílicas e termofílicas formadoras de esporos podem sobreviver ao processamento provocando posterior deterioração do produto, além de desnaturar as proteínas do soro (FRANCO et al. 2008; JELEN, 1983). Uma das principais características do leite UHT é extensa

validade comercial sem refrigeração, período no qual o produto tem que possuir características bacteriológicas, sensoriais, físicas e químicas aceitáveis.

## 2.2 QUALIDADE NUTRICIONAL DO LEITE UHT

O leite é considerado um dos alimentos mais completos, destacando o alto valor nutricional por conter proteínas de alta qualidade, ser fonte de gordura e vitaminas e minerais importantes para o desenvolvimento animal, sendo o cálcio e o fósforo fornecidos pelo leite, componentes indispensáveis para a formação e manutenção dos ossos e dentes (ANTUNES; PACHECO, 2009). A composição dos elementos constituintes no leite varia em conformidade com os diversos fatores como a espécie, a idade, o intervalo de ordenha, os fatores climáticos, a alimentação e a saúde do animal. O leite e seus derivados possuem compostos naturais de ação específica, como às imunoglobulinas, o fator complemento, os macrófagos e os linfócitos, e de forma inespecífica, como o sistema lactoperoxidase e a lactoferrina, que tem a capacidade de inibir, retardar ou até de impedir a multiplicação microbiana. Leites e produtos lácteos podem ajudar a reduzir o risco de desordens crônicas como hipertensão, osteoporose, excesso de peso, gordura corporal e câncer de cólon (HUTH; DIRIENZO; MILLER, 2006).

## 2.3 PARÂMETROS LEGAIS DO LEITE UHT

As informações nutricionais e sobre a composição do leite UHT contidas nos rótulos dos produtos devem ser descritas conforme as exigências da Instrução Normativa 22, de 24 de novembro de 2005 (BRASIL, 2005), e da Resolução RDC 360 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003). Na legislação consta a normatização da produção e parâmetros físico-químicos de qualidade do leite UHT conforme a Portaria nº 370 de 1997 (Tabela 1). Para garantir maior inocuidade do produto, na Instrução Normativa nº 68 de 2006 estão inseridas as técnicas para a detecção de fraudes do leite UHT (BRASIL, 2006).

Tabela 1: Parâmetros mínimos de qualidade do leite UHT.

Requisitos	Leite Integral	Leite Semi Desnatado	Leite Desnatado
Matéria Gorda % m/v	Min. 3,0	0,6 a 2,9	Máx. 0,5
Acidez g ac. Láctico/100 ml	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18	0,14 a 0,18
Estabilidade ao Etanol 68% v/v	Estável	Estável	Estável
Extrato Seco Desengordurado (m/m)	% Mín. 8.2	Mín. 8.3	Mín. 8.4

Fonte: modificado de Portaria nº 370, 4 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997).

Também na Portaria nº 370, constam os critérios microbiológicos do leite UHT, onde há a exigência de que o produto deva ser isento de microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição, e que após incubação na embalagem fechada a 35-37°C, o limite de aeróbios mesófilos seja 100 UFC/ml (BRASIL, 1997). Diferentemente, na RDC nº 12 (BRASIL, 2001), consta que após sete dias de incubação a 35-37°C, o leite UHT não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e sensoriais do produto, em condições normais de armazenamento. Além disso, na Instrução Normativa nº 62 de agosto de 2003, foram inseridos os métodos de análise de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis, com detecção do *Bacillus sporothermodurans*, contagem de *Clostridium* sulfito redutor e *Clostridium perfringens*, e contagem de *Bacillus cereus* (BRASIL, 2003), que devem ser utilizados para análise de produtos lácteos líquidos UHT.

Em 2002 na Instrução Normativa nº51 foi determinado o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, hoje regularizado pela Instrução Normativa nº62, onde consta que a estocagem do leite cru sob refrigeração, ainda na propriedade rural (BRASIL, 2002; BRASIL 2011), reduzindo consideravelmente a quantidade de bactérias mesofílicas, que possuem atividade acidificante promovendo a deterioração do leite (ZENI et al., 2013). Porém a refrigeração prolongada da matéria prima favorece a proliferação de bactérias psicrotóxicas, que produzem enzimas termorresistentes capazes de provocarem alteração no leite mesmo após o processamento térmico (NÖMBERG et al., 2008; TOPÇU et al., 2006).



## 2.4 CONTAMINAÇÃO DO LEITE UHT

A contaminação do leite UHT pode ser proveniente de matéria prima de baixa qualidade bacteriológica, condições inadequadas de armazenamento ou de erros no controle no processamento tecnológico (WESTHOFF, 1981). No Brasil o leite cru tem sido detectado como fora dos padrões microbiológicos e físico-químicos (MARTINS et al, 2008; NERO et al., 2005; PINTO et al., 2006; ZENI et al. 2013). A maioria dos casos de contaminação pós-processamento, por microrganismos deteriorantes, está relacionada com falhas no processo de envase e contato com equipamentos contaminados (PUJOL; ALBERT, 2013; TAMINE, 2009). A falta de controle de biofilmes gera uma fonte significativa de enzimas resultando na degradação de produtos lácteos (TEH et al., 2014).

Outros fatores associados à contaminação do leite UHT, são problemas relacionados a embalagens, onde a presença de microfuros ou erros de hermeticidade do fechamento podem gerar contaminação cruzada do produto. Apesar da importância comercial e nutricional que o leite UHT desempenha no mercado brasileiro, podem ser encontradas irregularidades técnicas neste produto, quando comparados resultados de análises microbiológicas e físico-químicas aos padrões da legislação vigente (BERSOT et al., 2010).

Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, em razão da sua contaminação principalmente pelas bactérias psicotróficas formadoras ou não de esporos, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases), que rapidamente alteram o produto gerando perdas econômicas e problemas tecnológicos para a indústria (ZENI et al., 2013). Muitas dessas enzimas proteolíticas são termorresistentes, mantendo sua atividade após a pasteurização, resultando na perda de qualidade e na redução da validade comercial do leite e de outros produtos lácteos, provocando alteração no sabor e odor, perda de consistência e gelatinização (NÖMBERG et al., 2009). A gelatinização é considerada um dos principais problemas relacionado à qualidade do leite UHT, esta alteração ocorre inicialmente pela ação das proteases termorresistentes produzidas por bactérias psicotróficas do leite, que degradam as caseínas e promovem agregação das micelas do leite (ZENI et AL., 2013) aumentando a viscosidade do produto.

### 2.4.1 Contaminação Bacteriológica

Os principais gêneros envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Serratia*, *Corynebacterium* e *Clostridium*, em que *Pseudomonas* e *Bacillus* se destacam, sendo *Pseudomonas* em razão do curto tempo de geração a temperaturas de refrigeração (SHIRAI, 2010). O tratamento UHT independente de ser considerado um tratamento térmico drástico e eficaz, caso a matéria prima esteja com carga microbiana muito alta, a consequência do processamento pode ser um produto contaminado por células injuriadas ou esporos. É apontado como frequente a sobrevivência de algumas espécies de *Bacillus*, como *Bacillus sporothermodurans* que tem resistência ao calor aplicado no processamento UHT, podendo ser isolado com aplicação de calor entre 130 e 140°C (HUEMER et al., 1998; MARTINS et al., 1999), os esporos de *B. sporothermodurans* sofrem alterações insignificantes após serem submetidos a 130°C por quatro minutos, havendo desnaturação proteica letal somente após 12 minutos de submissão ao calor (TABIT; BUYS, 2010). Ademais bactérias psicrótroficas, mesófilas e termófilas, encontradas no leite cru, podem também ser aprisionadas nos biofilmes, e as populações dentro destes biofilmes podem se deslocar para favorecer o crescimento de bactérias mesófilas e termófilas na fábrica de laticínios (TEH et al., 2014). A germinação dos esporos de *B. sporothermodurans* culmina na produção de proteinases, conferindo características sensoriais adversas gerando um produto inaceitável para o consumo (VAEREWIJCK et al., 2001). O *Bacillus sporothermodurans* é frequentemente estudado por ser um microrganismo formador de esporo, mesofílico não patogênico, capaz de provocar alterações no leite (MOATSOU, 2013).

A mesma característica proteolítica é apresentada pelas estirpes de *Pseudomonas* spp., bactéria psicrótrofica que se desenvolve durante o período de estocagem do leite cru nos tanques de refrigeração. A estocagem por mais de 72h promove a produção de proteinases termorresistentes que, além de conferir gosto amargo e denegrir a qualidade nutricional, diminuem significativamente a validade comercial do produto (TOPÇU et al., 2006).

Se bactérias formadoras de esporos estiverem presentes em número suficiente nos produtos lácteos, podem causar deterioração ou levar a doenças

como resultado a produção de toxinas (DOYLE et al., 2015). Os gêneros formadores de esporos mais importantes para leite UHT e produtos lácteos são *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. Esporos pertencentes ao gênero *Clostridium* são de relevância significativa para a indústria de laticínios, uma vez que este gênero contém conhecidos patógenos humanos além de bactérias envolvidas na deterioração dos produtos lácteos (DOYLE et al., 2015). As espécies de *Bacillus* têm sido relacionadas com a deterioração do leite cru, pasteurizado e leite UHT (MARTH; STEELE, 2001). A principal fonte de esporos presentes no leite é a alimentação animal, o ambiente de ordenha (principalmente via solo) e água contaminada. Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* compõem um grupo de agentes proteolíticos com espécies que podem ter potencial patogênico.

O grupo dos Clostrídios se destaca como um grupo de bactérias esporoformes, anaeróbias e fermentadoras, capazes de produzir 20% das toxinas bacterianas conhecidas, contendo 15 espécies patogênicas, duas se destacam como desencadeadores de doenças veiculadas por alimentos, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. A origem da formação das toxinas relacionadas com esse grupo é incerta, porém existe a hipótese de que essas toxinas têm atividade enzimática, e são provenientes de enzimas hidrolíticas (POPOFF; BOUVET, 2013)

O *Bacillus cereus* é um microrganismo formador de esporo resistente ao calor, desidratação e alterações físico-químicas, tem importância destacada na indústria de alimentos por ser capaz de produzir toxinas, que podem ser responsáveis por provocar doenças alimentares nas formas eméticas e diarreicas, cepas enterotoxigênicas de *B. cereus* foram isoladas a partir de 180 amostras de leite UHT (VIDAL-MARTINS et al., 2006). São conhecidas quatro enterotoxinas produzidas por *B. cereus*: a Hemolisina BL (HBL), a enterotoxina não-hemolítica (ENH), a enterotoxina K (CytK) e enterotoxina T (BceT). As três primeiras são complexos proteicos diretamente ligados com expressões genéticas e já foram identificadas em surtos alimentares sendo relacionadas com a síndrome diarreica, diferentemente da síndrome emética, que é desencadeada pela ligação do cereulide, polipeptídeo sintetizado enzimaticamente durante a multiplicação bacteriana, em receptores do nervo vago aferente, provocando crises eméticas e impedindo a oxidação hepática de ácidos graxos, e conseqüentemente gerando

insuficiência hepática (BARRETO, 2012). Para melhor compreensão dos estudos das espécies de *Bacillus*, várias técnicas baseadas em biologia molecular têm sido desenvolvidas e aplicadas tanto para a diferenciação das espécies como para a caracterização das enterotoxinas (ESPER, 2006). Estas técnicas, como por exemplo, fagotipagem, amplificação randômica do DNA polimórfico e reação em cadeia polimerase, “Polimerase Chain Reaction” (PCR), tem sido importantes instrumentos para o estudo e diferenciação destes microrganismos (GUELARDI et al., 2002).

#### **2.4.2 Contaminação Química**

Outra questão a ser considerada é a presença de substâncias químicas indevidas que podem ser adicionadas ao leite cru, gerando alteração da composição do produto final, sendo considerados como produtos fraudados, que podem provocar prejuízos econômicos e danos à saúde do consumidor. A detecção da ocorrência de leites fraudados é importante para assegurar a qualidade do produto a ser consumido e garantir boas condições de rendimento no processamento de derivados (ROBIM et al., 2012). Recentemente pesquisadores propuseram a formação de um novo índice de qualidade, Índice Q, que correlaciona variáveis dos principais componentes com análises de resíduos, para diferenciar o leite adulterado do inadulterado (LIU et al., 2015). Existem quatro tipos de fraudes, por alteração, por adulteração, por falsificação e fraude por sofisticação (EVANGELISTA, 1989). Na legislação brasileira é considerado fraudado, adulterado ou falsificado o leite com adição de água; subtração de um dos componentes; adição de substâncias conservadoras ou de substâncias não permitidas; rotulado como categoria superior; estiver cru e for vendido como pasteurizado; e, for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 2008). A mais comum das fraudes é a fraude por aguagem, geralmente com águas de rio ou de outras fontes não controladas, que altera as condições de qualidade nutricional do produto além de poder veicular patógenos. Igualmente importante é a pesquisa por adição de amido, cloreto, neutralizante de acidez, cloro e hipoclorito, substâncias que podem ser adicionadas ao leite cru visando principalmente mascarar a qualidade inferior da matéria prima e impedir a detecção de alterações físico-químicas pelos métodos analíticos de rotina das indústrias. O aumento nas detecções de fraudes em leite

UHT entre os anos de 2013 e 2014, se deve ao aumento de fiscalização do produto e não propriamente ao aumento do número de casos incidentes de leites fraudados (BRASIL, 2014). A presença de fraudes além de provocar prejuízos econômicos, pode causar graves danos à saúde do consumidor.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 ASSESSMENT OF BACTERIOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL, PACKAGING AND LABELING QUALITY OF COMMERCIAL UHT MILK

##### **Assessment of bacteriological, physicochemical, packaging and labeling quality of commercial UHT MILK**

MELO<sup>1\*</sup>, L.R.B.; BARROS<sup>1</sup>, R.F.; FRASÃO<sup>1</sup>, B.S.; ESPER<sup>2</sup>, L.M.R.; CORTEZ<sup>1</sup>, M. A. S. FRANCO<sup>1</sup>, R. M.

<sup>1</sup> Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, n36. Niterói, Brazil

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia. Universidade Federal Fluminense. Rua Dr. Mario Viana, 523. Niterói, Brazil

**Key words:** Quality Control. Dairy Products. Food Safety. Pathogens.

\* Author for correspondence: Tel: (+55 21) 996961999.

E-mail: rmelo.vet@gmail.com

## ABSTRACT

To assess the quality of commercial UHT milk, 32 samples collected at retail stores were evaluated for mesophilic bacteria, *Bacillus* spp. and sulphite reducing clostridia as well as pH, titratable acidity, freezing point, density, total solids and nonfat solids contents and presence of fraud (corn starch, sodium chloride, ethanol, acid neutralizing agents, chlorine and hypochlorite). Also, the integrity of the packaging and labeling information were verified. From all analyzed samples, 26 (81.25%) had growth of mesophilic bacteria and three (9.37%) had growth of up to  $1.3 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> (5.13 log CFU.ml<sup>-1</sup>); nine (28.12%) had growth of sulphite reducing clostridia, varying from <10 to  $6.1 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>; 24 (75%) had a growth of *B. cereus* from <10 to  $9.8 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> (5.11 log CFU.ml<sup>-1</sup>). Only eight samples (25%) had satisfactory results for bacteriological analyzes based in Brazilian legislation for UHT milk, however three of them showed positive results for the *B. cereus* and sulphite reducing clostridia counting. Out of 32 samples evaluated, four (12.5%) were not in agreement to current Brazilian legislation for acidity, with values slightly above 0.18g of lactic acid in 100 ml of milk (0.184, 0.193, 0.187 and 0.184). All other results of physicochemical analyzes were according to legal standards. Regarding package testing (micro holes and welds) and the verification of labels, no defects or errors were found. From the obtained data, it was concluded that there is a need for better processes control involved in the production of UHT milk to ensure a better quality product, mainly in aspects related to bacteriological characteristics.

Brazil is the world's fourth largest milk producer, with an annual production of 32 million tons in 2012 (17). One of the main destinations of Brazilians' raw milk is Ultra High Temperature (UHT) processing, whose production increased about 70% over the last twenty years. In 2012, six billion liters were produced, representing approximately 76% of all milk consumed in the country (3). UHT milk is the final product of the heat treatment varying from 130 to 150° C, for about two to four seconds, followed by cooling to 32° C and aseptic packing (9). The untreated material used is the refrigerated raw milk whose quality standards are described in Instruction Normative N° 62 (5), with emphasis to acidification control as a factor to make heat treatment possible (14).

The objective of the UHT process is to eliminate viable cells with minimal nutritional changes (19, 23). Although it is a drastic heat treatment, it may not be efficient when applied to highly contaminated milk, resulting in the survival of microorganisms. The survival of some *Bacillus* species such *B. sporothermodurans*, which has resistance to heat applied to UHT processing, has been noticed by literature (21, 26). The UHT milk contamination may occur due to low quality raw material and errors during production. In Brazil, reaserches evaluating the raw milk used to UHT production, concluded that the analyzed matrix were outside of microbiological and physicochemical standards (25, 28, 30, 43). In cases of post-processing contamination, microorganisms have been mostly related to failures during the filling process and contact with contaminated surfaces (34, 39).

The main genera involved in the deterioration of milk are *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Serratia*, *Corynebacterium* and *Clostridium* (36). For UHT milk, the most significant genres capable of spore formation are *Bacillus* spp. and *Clostridium* spp. *Bacillus* species have been related to the modifications of fluid milk (24). The main source of spores is animal feed, environment and water using to production and sanitary proposes. *Bacillus* and *Clostridium* are proteolytic agents, but some species are pathogenic. *B. sporothermodurans* is often studied as a result of its characteristic to be a spore-forming microorganism and mesophilic non-pathogenic, which can cause changes in food (27).

The presence of frauds capable to cause economic losses and damage to consumer health is another factor to be considered. Fraud detection is imperative to ensure product quality and guarantee an ideal yield during processing (34). The presence of microholes in the structure of packing material can cause cross contamination, which is also associated to deficient quality of UHT milk.



This study aimed to evaluate the physicochemical and bacteriological quality as well the conditions of labeling and packaging of UHT milk.

## MATERIALS AND METHODS

Samples of 32 UHT milk from 16 different brands were purchased in the retail market in the cities of Rio de Janeiro and Niteroi (Brazil), being 16 samples of low fat (0.5 to 2.9% of fat) and 16 of whole milk (at least 3.0% of fat). The samples were incubated to 36°C, in the original packing, for seven days, for verification of alterations in bacteriological and physicochemical characteristics (6, 8).

The averages of the results obtained were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 program (GraphPad Software, San Diego California USES), by Student t test (5% of significance).

The nutritional information and components concentration of UHT milk described in products labels were evaluated by observing the conformity with the requirements of laws (6, 7), by comparison of real product content, described labels information and the respective calculations of daily ingestion.

The packs were tested by evaluation of the traverse solders through manual force applied to lateral junction and by search for micro holes presence, by the method of electrons conductivity (pH meter Smart I, model FT-360TR). To this analytical procedure, the milk packing was vertically cut in the middle and had both half sides filled with saline solution. This combination was put inside of a vat also with saline solution. Then, using a pH meter with respective disposed electrodes, one inside the box and the other inside of the vat, the presence of holes were tested. Any hole or problem in the solders would let electrons to pass, indicating a spot of non-conformity in the packing. To test the longitudinal solders it was used the technique of the colorant injection in the reentrance formed by the junction of the two sides of the pack. Any leaking indicated bent or not adequate solders and a considered point of contamination.

For physicochemical characteristics determination and frauds detection, the techniques were: freezing point analyses, density, total and nonfat solids, % of latic acid, fat content and the presence of corn starch, sodium chloride, ethanol, acid neutralizing agents and chlorine (8). All quantitative analyses were accomplished in three times. For the microbial analyses, strict and facultative aerobic mesophilic counts with identification of *B. sporothermodurans*, counts of Sulphite Reducing Clostridia and *Bacillus cereus* were performed according to Brazilian official methods recommendations (6).

## RESULTS AND DISCUSSION

In Table 1, the results of the physicochemical analyses accomplished in the 32 samples of whole and skimmed UHT milk are related (means, standard deviations, minimum and maximum values).

Of the 32 samples, four samples (12.5%) ranged from 0.14 to 0.18% of lactic acid, these samples presented values of 0.193% for the sample of whole milk and 0.184, 0.187 and 0.184%, for the three samples of skimmed milk. Four samples (12.5%) were not in conformity in regards to acidity (Table 1), with values above the acceptable maximum for the legislation (ranging from 0.14 to 0.18% of lactic acid) (9), the highest values of acidity suggest bacterial metabolism, with use of the lactose and formation of lactic acid as a metabolic product, what determined the increase of acidity of studied samples. However, this factor was not decisive to alter milk stability during the ethanol test, since all samples were stable to ethanol 68% (v/v). Contrary to this experiment, researchers using 100 samples of milk UHT obtained in the city of Rio de Janeiro/Brazil found 10% (10) of the samples with acidity values lower than the described in the legislation, concluding the possible presence of fraud for addition of acid neutralizing agents such as bicarbonates, hydroxides and carbonates de sodium (2).

The pH values found in this experiment varied from 6.60 to 6.91, with general mean of 6.77. The pH values obtained in this experiment agree with results obtained in samples obtained in Foz de Iguazú, Brazil and Puerto Iguazú, Argentina (15).

In relation to fat values, all samples of whole milk presented contents higher than 3% (m/v), with  $3.35 \pm 0.36\%$  (m/v) of mean. The minimum fat value found was 3.05 and the maximum was 4.6% (m/v) (Table 1). In consonance with the results of this experiment, 58 samples of UHT milk were evaluated in 2012 and was verified that 100% of the samples were inside of the patterns for fat values (34). In this experiment, just one sample presented a higher concentration of fat, with content of 4.6% (m/v). Those results were in accordance to legislation, which defined the fat content of whole milk as at least 3.0% (m/v) (9). Two samples (6.25%) of whole milk presented freezing point values of  $-0.553$  and  $-0.554^{\circ}$  H. Seven samples (21.87%) had density values above  $1.034 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , varying from 1.035 to  $1.036 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . All of them were skimmed milk. In relation to freezing point, although two samples ( $-0.553$  and  $-0.554^{\circ}$  H) were below  $-0.550^{\circ}$  H (Table 1), the minimum values determined for raw and pasteurized milk (5), there is no specified requirement in the legislation to UHT milk (9). During UHT milk processing, stabilizers agents (phosphates and citrates of sodium) are added as a convectional

ingredient. This addition might have been responsible for the increase need of cold temperature to freeze the milk samples, due to the increment of solution ionic force as a result of dissociation of these salts. Then, the values obtained in this experiment (-0.553 and -0.554° H) did not necessarily characterize a fraud occurrence, but a technological characteristic of UHT milk (14).

In general, the average results for density was  $1.030 \pm 0.001 \text{ g.ml}^{-1}$  for the samples of whole milk and  $1.034 \pm 0.001 \text{ g.ml}^{-1}$  for the samples of skimmed milk, being statistically different ( $p > 0,05$ ) (Table 1). The highest values of density for the samples in which the fat was removed was due to the low density of milk fat ( $0.93 \text{ g.ml}^{-1}$ ), and its removal lead to an increase of milk density (37). For the nonfat solids, all the averages obtained in this experiment were above the defined values by legislation as conformity, which is 8.2% for whole and 8.4% for skimmed milk (9). The differences found in the results of the composition analyses between whole and skimmed milk were observed due to centrifugal process to remove fat content and not because a technological problem or a fraud.

Regarding lactose content means values, whole and skimmed milk respectively presented  $4.18 \pm 0.07\%$  (m/v) and  $4.59 \pm 0.09\%$  (m/v), being statistically different ( $p > 0.05$ ). Of the 16 samples of whole milk, 15 (94%) presented values between 4.05 and 4.28% (m/v). All samples presented protein contents higher than 2.9%. The means of whole and skimmed were statistically different ( $p > 0.05$ ). For whole milk, the mean was  $3.18 \pm 0.06\%$  (m/v); for skimmed, it was  $3.51 \pm 0.07\%$  (m/v). In relation to minerals content, averages of  $0.62 \pm 0.01\%$  were observed (m/v) for the samples of whole milk and  $0.71 \pm 0.01$  for the samples of skimmed milk, being statistically different ( $p > 0.05$ ).

Verifying the differences between whole and skimmed milks (Table 1) can be observed that the variables pH, acidity and freezing point did not present significant differences between the two types of milk ( $p > 0.05$ ). These milk characteristics are related with intrinsic chemical balance, mainly in the relationship between water and all soluble components, such as minerals, lactose and acids (18, 42). Then, the removal of fat didn't influence pH values, acidity and freezing point. The inverse behavior was observed in regards to parameters related to milk composition, once as a certain component is removed, the perceptual value for the other components should be increased, to assure the balance of the final composition, as noted for lactose, protein and minerals values.

However, observing the medium values for each physicochemical analysis studied requirement, it can be assumed that from 32 samples analyzed, 28 (87.5%) were in accordance to Brazilian requirements for UHT milk (9). The results out of conformity were regarding acidity, with

levels lightly above the normality. These results are different to the ones described in a research, that found 100% of conformity and similar to a study performed in Brazil, that out of 100 studied samples, one sample presented acidity out of normal range (2, 34). In relation to the total solids, the means were statistically different ( $p>0.05$ ), being  $11.92 \pm 0.48\%$  (m/v) for whole milk and  $9.25 \pm 0.27\%$  (m/v) for skimmed. The minimum values were 11.40 and 8.7%, respectively for whole and skimmed.

In regards to frauds detection, none of these following substances were detected: corn starch, ethanol, sodium chloride, acid neutralizing agents, chlorine and hypochlorite, corroborating with the data described in a research done with 58 samples of milk UHT obtained in the city of Rio de Janeiro in 2012 (34). In the packaging tests, no problems were diagnosed. All UHT milk packaging of milk UHT were in perfect condition neither micro holes nor solder trouble presence. The information supplied in the labels was in accordance with the effective legislations and all of the composition information corresponded with the results obtained in the analyses.

The results of the bacteriological analysis of whole and skimmed milk are shown on figures 1, 2, 3 and 4. Of the analyzed samples, 26 (81.25%) had growth of mesophilic bacteria in which three (9.37%) of them was up to  $1.3 \times 10^5$  CFU.m $l^{-1}$  ( $5.13 \log$  CFU.m $l^{-1}$ ). Only eight samples were with acceptable counts of mesophilic bacteria according to Brazilian legislation ( $<10^2$  CFU/ml) (11), however three of them showed positive results for the *B. cereus* and sulphite reducing clostridia counting. Those criteria have not been established by the legislation but it could be a cause of food borne disease. Enumeration of Aerobic mesophilic bacteria is the main quality and hygiene parameter for milk products (4, 20). Also, changes related to UHT milk can be attributed to the survival of microorganisms, especially of the genus *Bacillus* (43).

Regarding UHT milk, some faults (high counts) might be seen due to the usage of microbiologically or physicochemically abnormal raw milk and improper processing. The high counts of strict and facultative aerobic mesophilic in this study with values above the acceptable maximum for the legislation in 24 (75%) samples (Figure 1) shows the poor quality of this product at retail, highlighting the importance of processing control as well the quality of raw milk. Similar to this study, researchers found that 18 (50%) of 36 samples with counts varying from 1.1 to 5.9 log CFU.m $l^{-1}$  (1). Differently, others researchers that found out that all samples (30) of UHT milk obtained from heat treatment of raw milk collected from two dairy factories were in compliance with legal, microbiological

and physicochemical standards (40). These samples were processed by the researchers and were not acquired at retail, showing that the right processing is meaningful for the quality of final product.

Twelve samples (37.5%) obtained growth from  $<10$  to  $1.1 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> for *B. sporothermodurans*. The facultative thermophiles belong to the *Bacillus* genus and tend to grow at both mesophilic and thermophilic temperatures, depending on the strain. *Bacillus sporothermodurans* is an example of *Bacillus* species. Although these contaminants do not constitute a health risk to the consumer, they are used as an index of hygienic measurement (1). 13 samples showed counts of *B. sporothermodurans* reinforcing the poor quality of the product (Figure 2). In a research with UHT milk, 54.5% contamination (approximately 48 samples), concluding that the *B. sporothermodurans* resists at time and temperature conditions employed in the UHT system (13). However an experiment showed that spores of *B. sporothermodurans* had insignificant changes after being subjected to 130° C for four minutes, at this temperature the significant structural damage appeared only after eight minutes, with lethal protein denaturation only after 12 minutes of heat submission, agreeing with the results of spores survival when submitted to UHT treatment (38).

28.12% of samples (nine) were positive for sulphite reducing clostridia, ranging from  $<10$  to  $6.1 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Clostridia are the anaerobic bacteria most frequently associated with foods. The complete group of sulphite reducing clostridia (SRC) may be used as index organisms for *C. botulinum* or *C. perfringens*. The group can also be used as a marker for General Hygiene Practices, raw material quality or processing deficiencies. Spores of some strains of *C. perfringens* are resistant to temperatures as high as 100°C for more than 1 h. Their presence in foods may cause food poisoning and food spoilage (12, 33). The high counts found in this experiment (Figure 3) deserve great attention due the risks to quality and safety of product; also these results are not common at the scientific literature. In a survey of 100 samples of UHT goat milk in the South and Southeast of Brazil, the researchers did not detected *Clostridium* spp. growth (31).

Counts ranging from  $<10$  to  $9,8 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup> of *Bacillus cereus* at 75% (24) of samples were detected (Figure 4). The presence of large numbers of *B. cereus* (greater than  $10^6$  organisms per gram) in a food is indicative of active growth and proliferation of the organism and is consistent with a potential hazard to health (16), indicating that there is a great risk to the population by the presence of these pathogens. In an experiment where strains of *B. cereus* were isolated from 24 samples of UHT milk, it was showed that 75% (18) of them were positive to enterotoxin production

(41). In another experiment, *B. cereus* were isolated from 13 samples of UHT milk with 61.53% (eight) of them had enterotoxigenic potential (35). Those results indicated a potential hazard and may put at risk the health of consumers of these products. While in a study analyzed 1,300 samples of 5 different processing plants of Brazilian UHT milk and did not find any contamination with *B. cereus* (29). Another study showed that changes in UHT milk (proteolysis) depended on *Bacillus cereus*, deteriorating sensory properties of milk, corresponding with the lipolysis and proteolysis progress, were observed in the samples with non-inactivated spores of *B.cereus*, stored at 24 °C (22).

This study points out that important quality parameters of UHT milk, thus far considered a stable and safe product by the heat treatment, proved to be deficient. It is noteworthy that greater attention should be taken by the productive sector to improve product quality in accordance to the legislation in order to ensure quality and product safety to the population.

## REFERENCES

1. ABD, A. A.; ABDULA'AL, N. I.; ABOOD, A. S. 2014. Prevalence of Thermophiles and Mesophiles in Raw and UHT Milk. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 6:(1)23-27.
2. ARRUDA, P. M.; CRUZ, A. G.; ZOELLNER, S. S.; SILVA, R.; SOARES, M. M.; FERNANDES, V. S.; GALVÃO, A. P. G. L. K. 2007. Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite UAT comercializados na cidade do Rio de Janeiro. *Rev. I. A.L.* 66:(2)126-129.
3. Associação Brasileira de Leite Longa Vida. Processo de leite longa vida. Available at: <http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=sob-proc> Accessed 19 february 2014.
4. BORGES, L. R.; FONSECA, L. M.; MARTINS, R. T.; OLIVEIRA, M. C. P. P. 2013. Milk Quality According to the Daily Range in Farm Production in the Mesoregion Central Mineira and Oeste of Minas Gerais regions, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65:(4)1239-1246.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera o caput, excluir o parágrafo único e inserir os 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas

- para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 24 de novembro de 2005. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 82.006. 14 dez. 2005. Seção 1.
  8. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 82.006. 14 dez. 2006. Seção 1.
  9. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão do Citrato de Sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 19.700, 08 set. 1997. Seção 1.
  10. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25/06/1962, nº 1.236 de 02/09/1994, nº 1.812 de 08/02/1996, nº 2.244 de 04/06/1997 e nº 6385 de 27/02/2008. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 27 fev. 2008.
  11. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001.
  12. BREDIUS, M. W. J.; REE, E. M. 2003. Media for the detection and enumeration of clostridia in foods, p. 14-30. In: CORRY et al. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier Science B.V. Germany.
  13. BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIAN, R. L. 2005. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT integral e desnatado. *Cien. Tec. Alim.* 25:(3)408-411
  14. CORTEZ, M. A. S.; CORTEZ, N. M. S. 2010. *Introdução à Tecnologia de Leite e Derivados*. Instituto Pão Açúcar, São Paulo.

15. DOMARESKI, J.L.; BANDIERA, N. S; SATO, R.T.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E.H.W. 2010. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Arch. Lat. Nut.* 60:(3)261-269.
16. Food and Drug Administration, U. S. 2012. Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, BBB - *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Available at <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070492.htm> Accessed 5 february 2015.
17. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Top Production - Cow Milk, Whole, Fresh. 2014. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> Accessed 6 sept. 2014.
18. FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic e Professional, London.
19. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. 2008. Microbiologia dos alimentos. Atheneu, São Paulo.
20. GUNASEKERA, T.S; ATTFIELD, P.V.; VEAL, D.A. 2000. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Ap. Env. Microb.* 66:1228-1232.
21. HUEMER, I. A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, H. W. J; LANGEVELD, L. P. M. 1998. Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. *Int. D. J.* 8:851-855.
22. JANASTOVÁ, B.; DRACKOVÁ, M.; VORLOVÁ, L. 2006. Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on the Milk Quality followig Ultra High Temperature Processing. *Acta Vet. BRNO.* 75:601-609.
23. JELEN, P. 1983. Review of Basic Technical Principles and Current Research in UHT Processing of Foods. *Can. Inst. Food Scien. Tec.* 6:159-166,1983.
24. MARTH, E. H.; STEELE, J. L. 2001. Aplied Dairy Microbiology. 2 ed. New York.
25. MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. 2008. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. *Cien. Tec. Alim.*28:(2)295-298.
26. MARTINS, R. S.; SANTOS, C. V.; TEIXEIRA, S. R. 1999. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. *Org.Rur. Agro.*1:(2)55-69.



27. MOATSOU, G. 2013. Sanitary Procedures, Heat Treatments and Packaging, p.288-309 In: PARK, Y.W.; HAENLEIN, G.F.W. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *Wiley-Blackwell: United Kingdom*.
28. NERO, L. A.; MATTOS M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. 2005. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Cien. Tec. Alim.* 25:(1)191-195.
29. PACHECO – SANCHES, C. P.; MASSAGUER, P. R. 2007. *Bacillus Cereus* in brazilian ultra high temperature Milk. *Cien. Agr.* 62:(2)152-161.
30. PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. 2006. Qualidade microbiológica de leite cru e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Cien. Tec. Alim.*26:(3)645-651.
31. POPOFF, M. R.; BOUVET, P. 2013. Genetic characteristics of toxigenic clostridia and toxin gene evolution. *Institut Pasteur*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003> Accessed in 20 december 2013.
32. PUJOL, L.; ALBERT, I. 2013. Potential application of quantitative microbiological risk assessment techniques to an aseptic-UHT process in the food industry. *Int. J. Food Microb.*162:(3)283-296.
33. RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. Bacteriological Analytical Manual: *Clostridium perfringens*. 5 feb. 2015. Available at <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070878.htm>
34. ROBIM, M. S.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, A. C. O.; FILHO, R. A. T.; GEMAL, N. H.; NOGUEIRA, E. B. 2012. Pesquisa de Fraude no Leite UAT Integral Comercializado no Estado do Rio de Janeiro e Comparação Entre Métodos de Análises Físico-Químicas Oficiais e o Método de Ultrassom. *Rev. Inst. Lat. C.T.* 67:43-50.
35. REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR., O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. 2007. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:(6)1563-1569.
36. SHIRAI, M. A. 2010. Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. Universidade Federal do Pará. 2010. Available at <http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/DissertaMarianne.pdf> Accessed in 05 february 2014.

37. SPEER, E. 1991. Lactogia Industrial. Acribia, Espanha.
38. TABIT, F. T.; BUYS, E. 2010. The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores. *Int. J. Food Microb.* 140:207–213.
39. TAMINE, A. Y. 2009. Milk Processing and Quality Management. Blackwell Publishing Ltda, United Kingdom.
40. TELLES, E. O.; BALIAN, S. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; PRATA, L. F.; FILHO, A. N.; TAVOLARO, P.; SILVA, P. H. F.; PANETTA, J. C. 2007. Leite Uht Integral: Avaliação De Alguns Parâmetros De Qualidade Dos Leites Cru E Processado. *Vet. Zootec.* 14:(2)282-290.
41. VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JÚNIOR, O> D.; BÜRGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; SALOTTI, B> M.; CORTEZ, A. L. L. 2006. *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do leite UAT. *Rev. Bras. Cien. Vet.* 13:32-36.
42. WONG, N. P. 1988. Fundamentals of Dairy Chemistry. Chapman e Hall, New York.
43. ZACARCHENCO, P. B.; LEITÃO, M. F. F.; DESTRO, M. T.; ANDRIGHETO, C. 2000. O ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. *Cien. Tec. Alim.* 20:(3)271-178.
44. ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. 2013. Influência dos micorganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. *Unoesc e Ciência - ACET.* 4:61-70.

**Figure Legends**

FIGURE 1. Counts of Strict and facultative aerobic mesophilic in UHT Whole and Skimmed Milk

FIGURE 2. Counts of *B. sporothermodurans* in UHT Whole and Skimmed Milk.

FIGURE 3. Counts of Sulphite Reducing Clostridia in UHT Whole and Skimmed Milk.

FIGURE 4. Counts of presumptive *Bacillus cereus* in UHT Whole and Skimmed Milk.

Figure 1

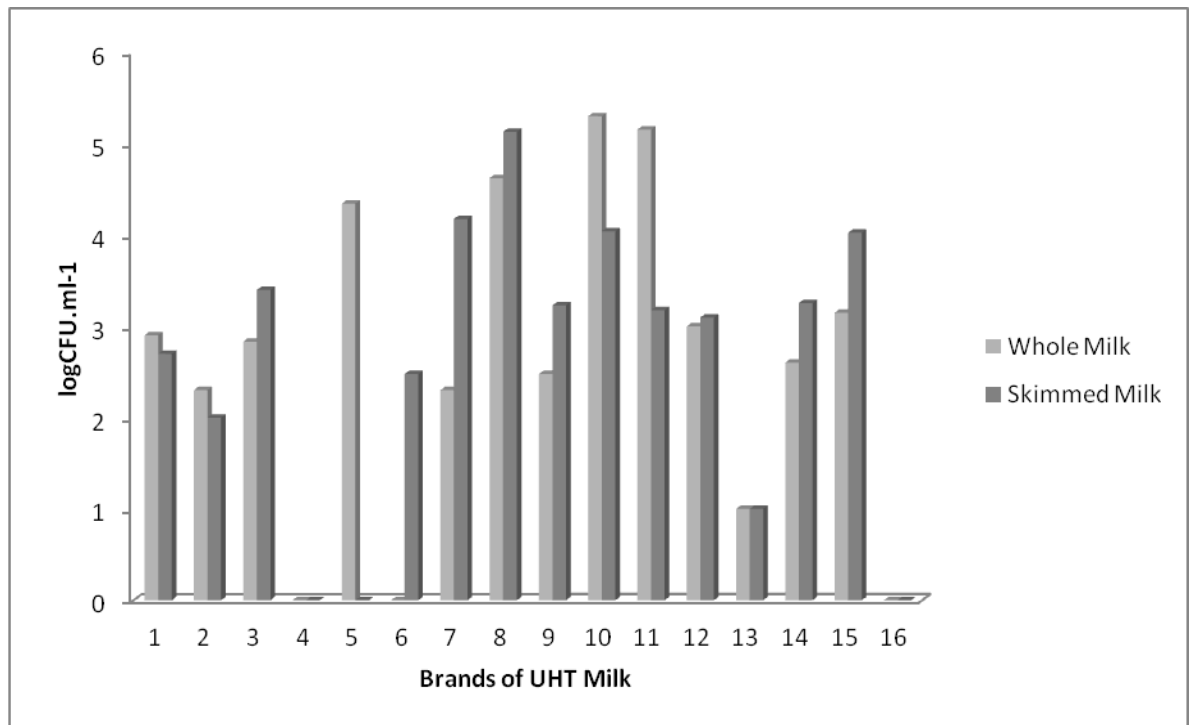


Figure 2

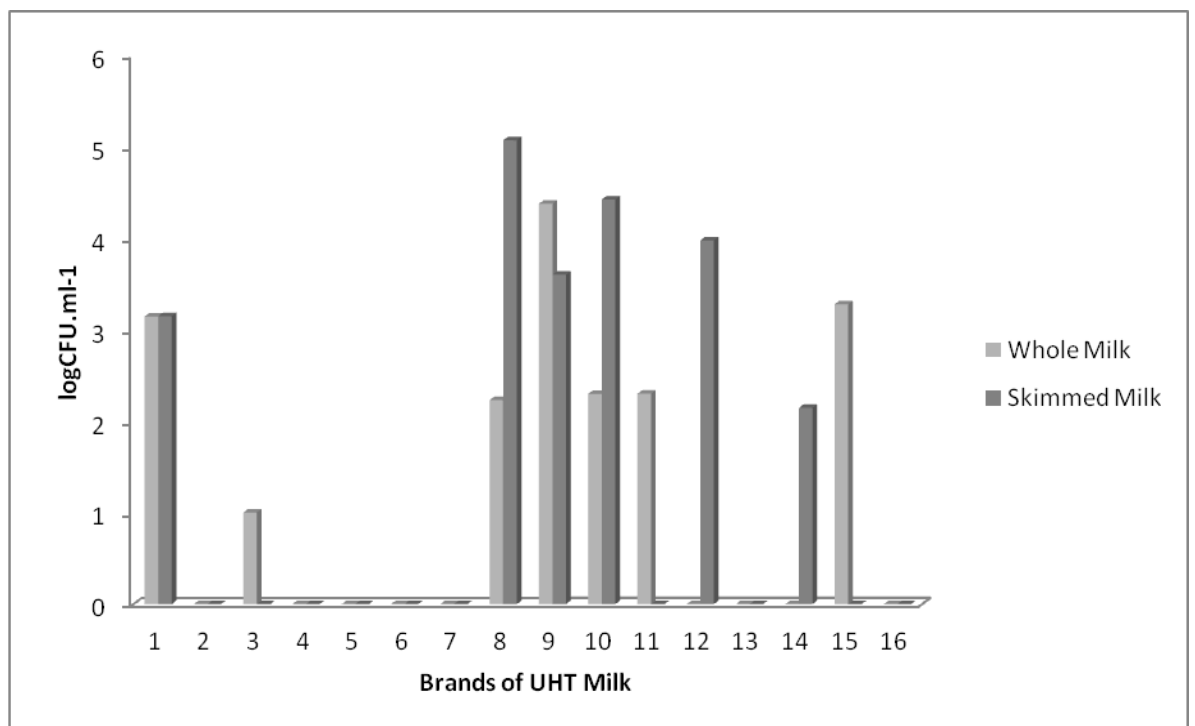


Figure 3

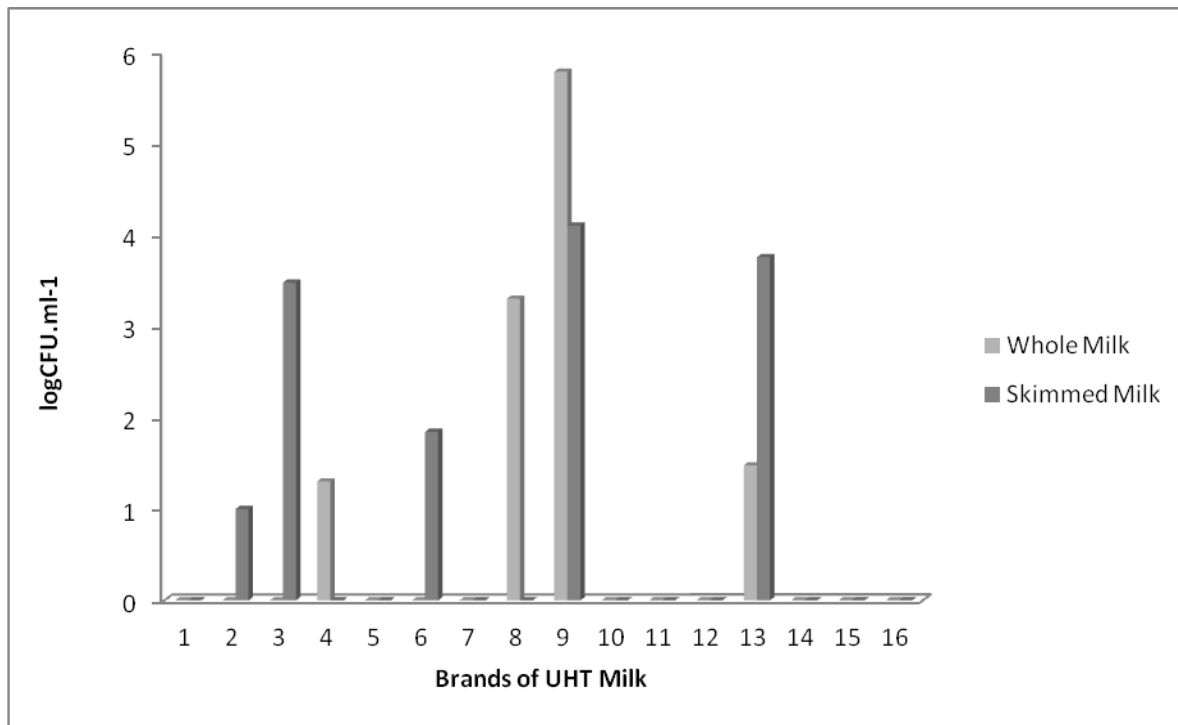


Figure 4

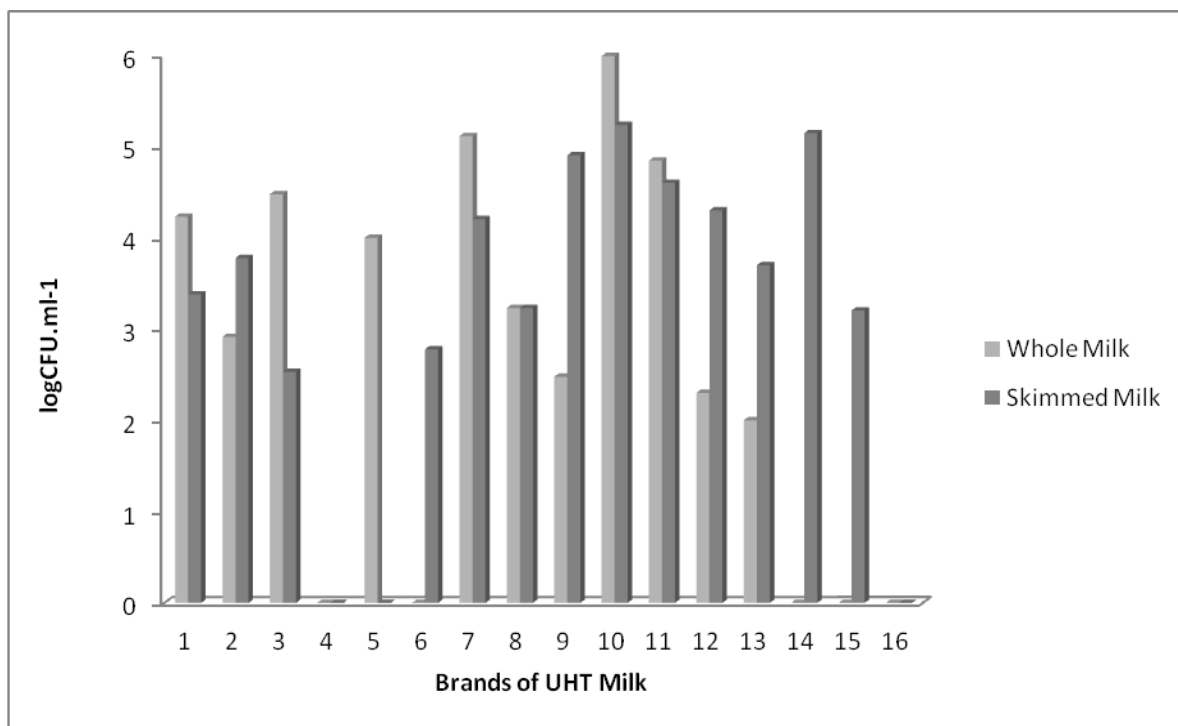


Table 1. Evaluation of the results of the physicochemical analyses, pH, acidity (% Lactic acid), Freezing point ( $^{\circ}$ H), Fat (%), Density (g.ml<sup>-1</sup>), Total Solids (% TS), Nonfat Solids (% NS), Lactose (%), Protein (%) and Minerals (%), in 16 samples of whole milk (W) and 16 samples of skimmed milk (S).

	<b>pH (W)</b>	<b>pH (S)</b>	<b>Acidity (W) (% Lactic acid)</b>	<b>Acidity (S) (% Lactic acid)</b>
<b>Mean</b>	6.77 ns	6.77 ns	0.168 ns	0.168 ns
<b>SD</b>	0.09	0.09	0.01	0.01
<b>Maximum values</b>	6.89	6.91	0.193	0.187
<b>Minimum values</b>	6.60	6.62	0.151	0.154
	<b>Freezing point (W) (<math>^{\circ}</math>H)</b>	<b>Freezing point (S) (<math>^{\circ}</math>H)</b>	<b>Density (W) (g.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Density (S) (g.ml<sup>-1</sup>)</b>
<b>Mean</b>	-0.541ns	-0.538ns	1.030*	1.034*
<b>SD</b>	0.007	0.004	0.001	0.001
<b>Maximum values</b>	-0.530	-0.532	1.032	1.036
<b>Minimum values</b>	-0.554	-0.544	1.029	1.033
	<b>Fat (W) (%)</b>	<b>Fat (S) (%)</b>	<b>Lactose (W) (%)</b>	<b>Lactose (S) (%)</b>
<b>Mean</b>	3.35*	0.29*	4.18*	4.59*
<b>SD</b>	0.36	0.16	0.07	0.09
<b>Maximum values</b>	4.60	0.50	4.33	4.75
<b>Minimum values</b>	3.05	0.10	4.05	4.42
	<b>Protein (W) (%)</b>	<b>Protein (S) (%)</b>	<b>Minerais (W) (%)</b>	<b>Minerais (S) (%)</b>
<b>Mean</b>	3.18*	3.51*	0.62*	0.71*
<b>SD</b>	0.06	0.07	0.01	0.01
<b>Maximum values</b>	3.29	3.63	0.64	0.73
<b>Minimum values</b>	3.08	3.38	0.60	0.68

	TS (W) (%)	TS (S) (%)	NS (W) (%)	NS (S) (%)
<b>Mean</b>	11.92*	9.25*	8.57*	8.95*
<b>SD</b>	0.48	0.27	0.25	0.20
<b>Maximum values</b>	13,43	9,81	8,94	9,32
<b>Minimum values</b>	11,40	8,7	8,21	8,5

To each tested parameter, the means from whole and skimmed milk were compared using Student t test (0.05% of significance).

ns – not significant at 0.05% (Student t test)

\* - significant at 0.05% (Student t test)

SD = standard deviation

### 3.2 QUALITY EVALUATION OF UHT MILK THROUGHOUT ITS SHELF LIFE.

#### **Quality evaluation of Ultra High Temperature milk throughout its shelf life**

MELO<sup>1\*</sup>, L. R. B.; OLIVEIRA<sup>1</sup>, R. S. S.; SOBRAL<sup>1</sup>, V. S.; ESPER<sup>2</sup>, L. M. R.; CORTEZ<sup>1</sup>, M. A. S.; FRANCO<sup>1</sup>, R. M.

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine. Fluminense Federal University . St Vital Brasil Filho, n36.  
Niterói, Brazil

<sup>2</sup> College of Pharmacy. Fluminense Federal University. St Dr. Mario Viana, 523. Niterói, Brazil

\* Author for correspondence: Tel: (+55 21) 996961999.

E-mail: rmelo.vet@gmail.com



### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate some quality aspects of UHT milk. Strict and facultative aerobic mesophilic, Sulphite Reducing Clostridia, *Bacillus* spp. and psychrotrophic bacteria were analyzed. Furthermore, the integrity of packaging, physicochemical properties and fraud presence were also verified. 60 samples of whole milk were collected between March to May of 2014 and analyzed during the first and last month of the shelf life. From the samples evaluated, 44 (73.33%) had growth of mesophilic bacteria and 22 (36.66%) of them had growth of up to 5 log CFU.mL<sup>-1</sup>. 12 (20%) had growth of *B. sporothermodurans* from <10 to 2.6x10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. 41.66% (25 samples) had growth of *B. cereus* that ranged 1.0x10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> (6 log CFU.mL<sup>-1</sup>), varying throughout the time. No sulphite reducing clostridia was detected; however 6.6% (4 samples) had growth of psychrotrophic bacteria on the fourth month. Only 10% (6) had satisfactory results for bacteriological analyzes based on Brazilian legislation for UHT milk during the shelf life, however three of them showed positive results for the *B. cereus*, absent parameter in the legislation for this product. During storage period, one sample showed an increasing in acidity, due to microorganisms metabolism. 78.33% (47 samples) showed some kind of defect regarding to packaging material. Based on the obtained data, it was concluded that the final product analyzed showed low quality and changes to the production process control are required in order to ensure its quality improvement, especially when it comes to the microbiological characteristics through storage period.

**Key words:** Quality control. Dairy Product. Food Safety. *B. cereus*. Pathogens.

## INTRODUCTION

The safety of UHT milk is depending from several factors, mainly raw material, process and hygiene control and, aseptic packing. Although UHT milk is subjected to drastic heat treatment (130 to 150°C, for about two to four seconds, followed by cooling to 32°C and aseptic packaging) (Brasil, 1997), some microorganisms and spores forms can survive in the product, capable to alter quality characteristics during storage period (Auadhi et al., 2015), besides have a pathogenic potential. Some *Bacillus* species such as *B. sporothermodurans*, which is resistant to UHT processing, has been found in this product (Huemer et al, 1998; Martins et al 1999).

The major reasons for UHT milk contamination may occur due to low quality of raw material, with problems in microbiological and physical-chemical characteristics (Nero et al., 2005; Pinto et al., 2006; Martins et al, 2008; Zeni et al., 2013). In addition, post-processing contamination is other factor related to poor UHT quality and microorganisms presence, mostly as a result of inadequate machinery sanitizing procedure (Tamine, 2009; Pujol et al 2013.).

Another factor related to UHT milk is the presence of enzymes produced by psychrotrophic bacteria that may have multiplied during cooling at the farm or transportation. These enzymes are related to economical and technological losses to industry (Zeni et al., 2013). Many of these enzymes are heat resistant, maintaining their activity after heating treatment, resulting in change in taste, odor and viscosity during the storage period (Nomberg et al. 2009). Despite the commercial and nutritious importance that UHT milk carries the Brazilian market, product irregularities are usually found (Bersot et al., 2010).

The genera *Pseudomonas* and *Bacillus* some of the principal deterioration agents in milk (Shirai, 2010), and *Bacillus* assume an importance due to spore forming capacity. Species of *Bacillus* have been related to deterioration of raw, pasteurized and UHT milk (Marth et al., 2001; Montanhini et al., 2011).

The gender *Bacillus* constitutes an important group of proteolytic agents with species that can be pathogenic. *B. cereus* are related to the diarrhea syndrome, provoked by an enterotoxin produced in the intestine of the host, and the emetic syndrome, intoxication attributed to the preformed toxin in the food (Wijnands et al., 2002; Senesi et al, 2010). The mesophilic *B. sporothermodurans* is frequently studied due to its capacity to form spores, though non-pathogenic, can produce alterations (Moatsou, 2013).

Another factor to be considered is the importance of packaging integrity, since it protects the milk against external risks, preserving product safety during storage period. The presence of microholes in the packages or errors during closing can generate crossed contamination, what is also associated to the deficiency in the final quality of the UHT milk.

This experiment aimed to evaluate the physicochemical and bacteriological quality and the conditions of UHT milk packaging, accompanying the period of commercial validity.

## MATERIALS AND METHODS

During the months of March to May of 2014, 60 samples of whole milk were obtained in the retail market in the city of Niterói/Brazil. The samples were divided into two groups (first and last month), where 3 samples of the same group belonged to a unique lot for 10 different brands. Then, the respective groups were analyzed in the first and in the last months of shelf life. To perform the analysis, samples were incubated at 36°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), in the original packing, for seven days, for verification of the occurrence of visible alterations, bacteriological and physicochemical characteristics (Brasil, 1997; Brasil, 2003).

The average results obtained were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 program (GraphPad Software, San Diego California USES), by ANOVA ( $p < 0.05$ ) to test variance and Tukey test ( $p < 0.05$ ) to compare means.

For physicochemical characteristics determination and search of frauds, the applied techniques were: freezing point analyses, density, total and nonfat solids, % of lactic acid, fat content and the presence of corn starch, sodium chloride, ethanol, acid neutralizing agents and chlorine (Brasil, 2006). All quantitative analyses were repeated three times. The packaging was tested by evaluating the quality of traversal closing (solders) through manual traction of the lateral solders, and searching microholes presence using the potentiometer method. For this analytical procedure, the packaging of milk was cut in half, with both halves filled up with saline solution and put inside of a vat also with saline solution, using a potentiometer, with the respective disposed electrodes, an inside of the box and other inside of the vat. Any microhole or problem in the solders would lead to pass electrons, indicating a point of non-conformity in the packing.

For the microbial analyses, strict and facultative aerobic mesophilic counts with identification of *B. sporothermodurans*, counts of Sulphite Reducing Clostridia and *Bacillus cereus* were performed

according to the Brazilian official recommended methods recommendations (Brasil, 2003). Psychrotrophic bacteria growth was analyzed following the modified technique of Oliveira (2013) Food Science and Technology PhD Thesis, that was determinate by spreading 0.1 mL of milk and its dilutions in 1% Milk Agar, then incubated between 4° and 10°C for 7 to 10 days. In this technique were conducted countings and detection of a clear circle around the colonies in order to identify proteolytic action of microorganisms.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In Tables 1 and 2, the results of physicochemical analyses completed in the 60 samples of whole UHT milk are related. The low coefficient of variation for all results demonstrated a low variation between brands.

Table 1. Analysis results of Acidity (% Lactic acid), Fat content (Fat %), Freezing point (°H), TS content (TS%), from 20 UHT milk brands, in first and last months of expiry date.

Brands*	Acidity (%Lactic acid)	Fat (%)	Freezing point (°H)	TS (%)
A (1 <sup>st</sup> )	0,166 ns	3,23 ns	<b>-0,5621 ns</b>	11,97 ns
A (4 <sup>th</sup> )	0,166 ns	3,17 ns	<b>-0,5620 ns</b>	11,91 ns
B (1 <sup>st</sup> )	0,160 ns	3,07 **	-0,5431 ns	11,68 **
B (4 <sup>th</sup> )	0,164 ns	<b>2,42 **</b>	-0,5455 ns	<b>10,97 **</b>
C (1 <sup>st</sup> )	<b>0,183 ns</b>	3,19 ns	<b>-0,5200 **</b>	<b>11,33 ns</b>
C (4 <sup>th</sup> )	<b>0,191 ns</b>	3,13 ns	-0,5362 **	<b>11,28 ns</b>
D (1 <sup>st</sup> )	0,176 ns	3,03 ns	<b>-0,5292 **</b>	<b>11,05 ns</b>
D (4 <sup>th</sup> )	0,173 ns	3,06 ns	-0,5480 **	<b>11,14 ns</b>
E (1 <sup>st</sup> )	0,142 **	3,16 ns	-0,5305 **	11,57 ns
E(4 <sup>th</sup> )	0,178 **	3,05 ns	-0,5480 **	<b>11,18 ns</b>
F (1 <sup>st</sup> )	0,158 **	3,04 ns	-0,5332 **	11,51 ns
F (4 <sup>th</sup> )	0,179 **	3,12 ns	-0,5457 **	<b>11,38 ns</b>
G (1 <sup>st</sup> )	0,149 **	3,03 ns	-0,5319 **	11,46 ns
G (4 <sup>th</sup> )	0,159 **	3,00 ns	-0,5471 **	<b>11,22 ns</b>
H (1 <sup>st</sup> )	0,147 **	3,02ns	-0,5391 **	<b>11,21 ns</b>
H (4 <sup>th</sup> )	0,159 **	<b>2,94 ns</b>	-0,5463 **	11,59 ns
I (1 <sup>st</sup> )	<b>0,135 ns</b>	<b>2,93 ns</b>	-0,5333 ns	<b>11,27 ns</b>
I (4 <sup>th</sup> )	<b>0,130 ns</b>	3,01 ns	-0,5349 ns	11,47 ns
J (1 <sup>st</sup> )	0,139 ns	3,37 ns	-0,5335 ns	12,01 ns
J (4 <sup>th</sup> )	0,140 ns	3,28 ns	-0,5350 ns	11,82 ns
Average	0,160	3,06	<b>-0,5403</b>	<b>11,45</b>
SD	0,02	0,19	0,01	0,31
CV	0,0011	0,0006	0,0002	0,0003

\* Brands code and time of analysis (first and last months)

\*\* For each brand, between months, the analysis results were verified and showed up statistically different by Tukey test ( $P > 0,05$ )

SD = standard derivation

CV = coefficient of variation (%)

Values in bold means out of normally range

Table 2. Analysis results of Density (g.ml<sup>-1</sup>), Lactose, Protein e Minerals contents (Lactose (%), Protein (%) and Minerals (%)), from 20 UTH milk brands, in first and last months of expiry date.

Brands*	Density (g.ml <sup>-1</sup> )	Lactose(%)	Protein (%)	Minerals (%)
A (1 <sup>st</sup> )	1,031 ns	<b>4,21 *</b>	3,22 *	0,60 ns
A (4 <sup>th</sup> )	1,031 ns	<b>4,31 *</b>	3,27 *	0,64 ns
B (1 <sup>st</sup> )	1,031 ns	<b>4,21 *</b>	3,22 *	0,60 ns
B (4 <sup>th</sup> )	1,031 ns	<b>4,28*</b>	3,26 *	0,64 ns
C (1 <sup>st</sup> )	1,029 ns	<b>4,07 *</b>	3,11 *	0,60 ns
C (4 <sup>th</sup> )	1,029 ns	<b>4,17 *</b>	3,17 *	0,62 ns
D (1 <sup>st</sup> )	1,029 ns	<b>4,03 *</b>	3,08 *	0,60 ns
D (4 <sup>th</sup> )	1,029 ns	<b>4,14 *</b>	3,15*	0,61 ns
E (1 <sup>st</sup> )	1,030 ns	<b>4,11 ns</b>	3,13 ns	0,61 ns
E(4 <sup>th</sup> )	1,029 ns	<b>4,12 ns</b>	3,14 ns	0,61 ns
F (1 <sup>st</sup> )	1,030 *	<b>4,07 *</b>	3,10 ns	0,60 ns
F (4 <sup>th</sup> )	1,028 *	<b>3,97 *</b>	3,02 ns	0,60 ns
G (1 <sup>st</sup> )	1,030 ns	<b>4,08 ns</b>	3,11 ns	0,61 ns
G (4 <sup>th</sup> )	1,029 ns	<b>4,09 ns</b>	3,12 ns	0,60 ns
H (1 <sup>st</sup> )	1,029 *	<b>4,23 ns</b>	3,22 ns	0,63 ns
H (4 <sup>th</sup> )	1,031 *	<b>4,15 ns</b>	3,16 ns	0,61 ns
I (1 <sup>st</sup> )	1,030 ns	<b>4,23 ns</b>	3,23 ns	0,63 ns
I (4 <sup>th</sup> )	1,030 ns	<b>4,23 ns</b>	3,23 ns	0,62 ns
J (1 <sup>st</sup> )	1,031 ns	<b>4,19 ns</b>	3,18 ns	0,62 ns
J(4 <sup>th</sup> )	1,031 ns	<b>4,21 ns</b>	3,20 ns	0,62 ns
<b>Average</b>	<b>1,0300</b>	<b>4,16</b>	<b>3,17</b>	<b>0,61</b>
<b>SD</b>	<b>0,001</b>	<b>0,09</b>	<b>0,07</b>	<b>0,02</b>
<b>CV</b>	<b>9,282E-06</b>	<b>2,076E-04</b>	<b>2,076E-04</b>	<b>3,234E-04</b>

\* Brands code and time of analysis (first and last months)

\*\* For each brand, between months, the analysis results were verified and showed up statistically different by Tukey test (P>0,05)

SD = standard derivation

CV = coefficient of variation (%)

Values in bold means out of normally range

The results of the Packaging and bacteriological analysis of the UHT milk for first and last month of analysis are shown at the figures 1, 2, 3, 4 and 5.

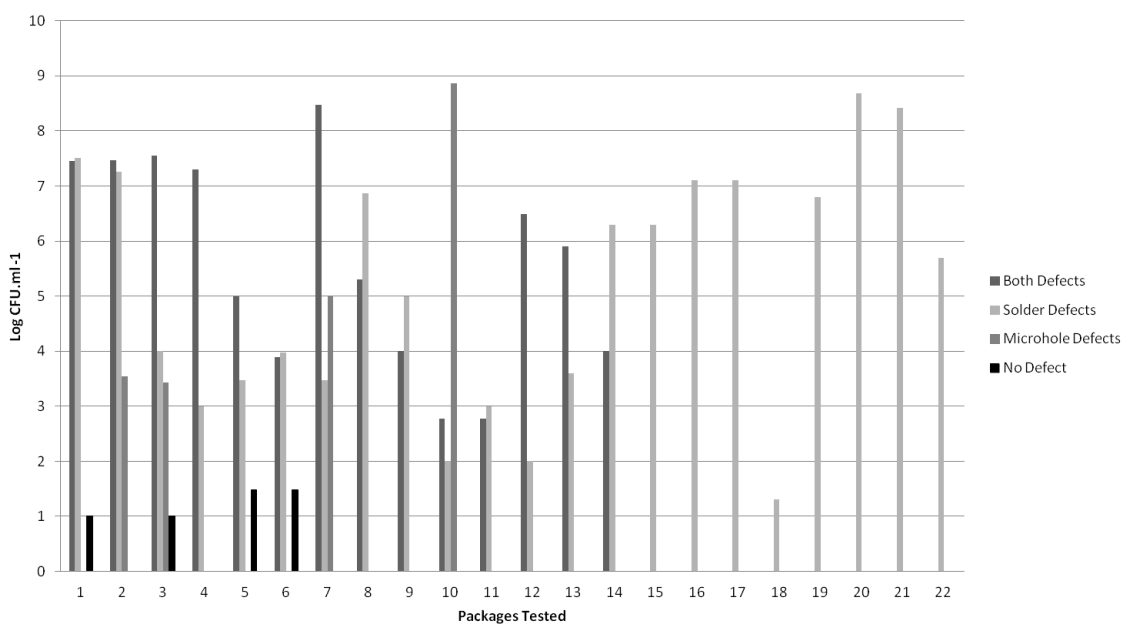


Figure 1. Results of packaging analysis in comparison with mesophilic growth.

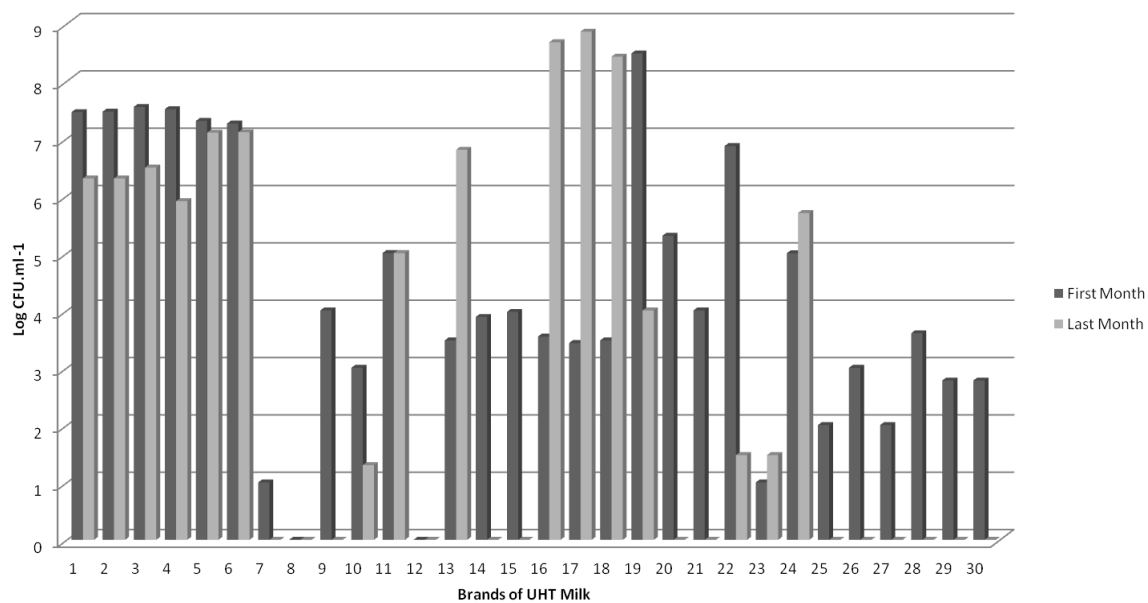


Figure 2. Counts of Strict and facultative aerobic mesophilic in UHT Milk for First and Last Month.

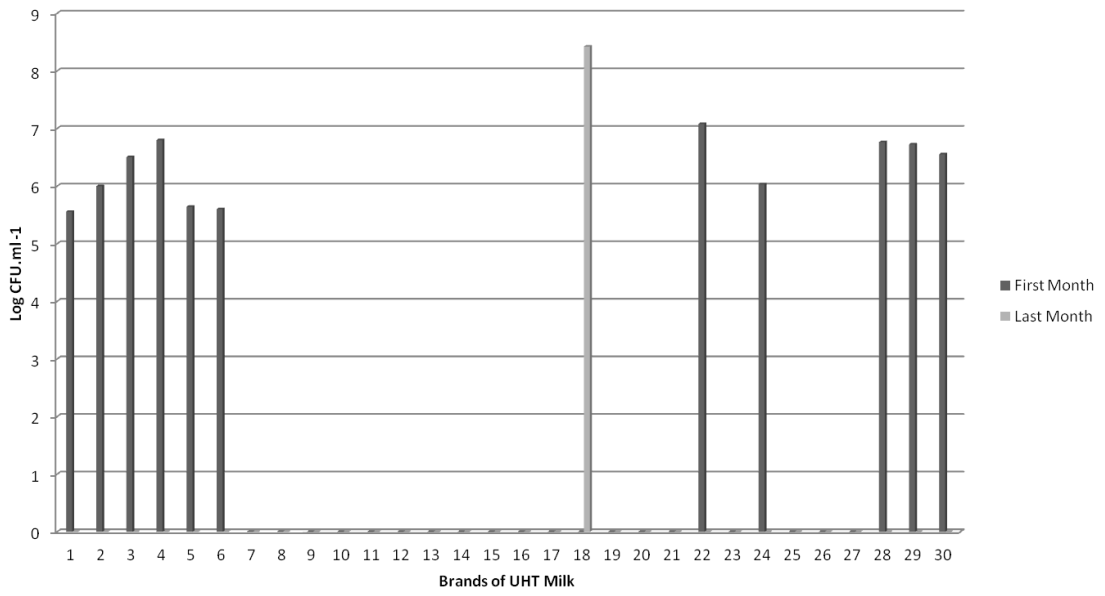


Figure 3. Counts of *B. sporothermodurans* in UHT Milk for First and Last Month.

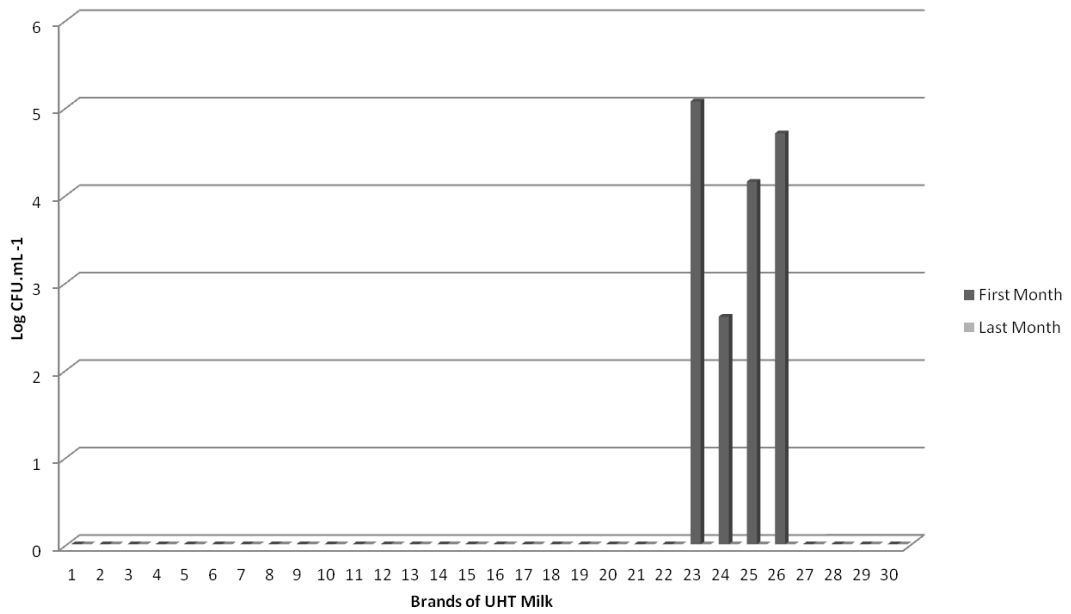


Figure 4. Counts of Psychrotrophic bacteria in UHT Milk for First and Last Month.



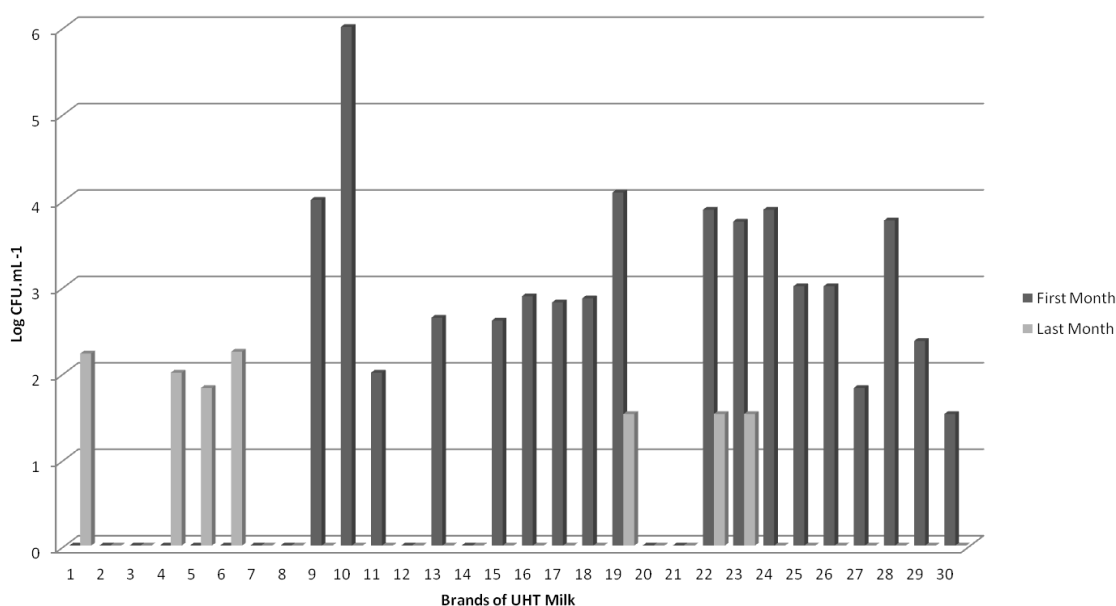


Figure 5. Counts of presumptive *Bacillus cereus* in UHT Milk for First and Last Month.

Of the 60 samples, four brands (24 samples) had a significant increase in acidity ( $p < 0,05$ ) during the four months of shelf life (Table 1). The acidity increase is related to with microbial metabolism, which uses lactose and produces lactic acid. Brands A and F also had high counts of bacteria, moreover even when counts are low, some bacteria have high potential of acidity like *Streptococcus* spp. (Dualdo et al., 2010). In the city of Rio de Janeiro/Brazil, researchers using 100 samples of UHT milk found 10% of them with acidity values lower than the described in the legislation, concluding the possible presence of fraud for addition of acid neutralizing agents such as bicarbonates, hydroxides and sodium carbonates (Arruda et al. 2007).

Despite the differences in fat results, only one brand (B) had a significant reduction of its content between the shelf life months, however brands H and I also had low fat results below the limits established by the Brazilian legislation (3.0%) (Brasil, 1997), on the fourth month of analyzes (Table 1). The reduction of fat concentration may have been observed due to the coalescence of fat, with formation of a concentrated layer of fat (cream) on the inner wall of the packaging. This might be related to inefficient homogenization process (low pressure between stages, inadequate temperature or equipment errors) which has the function of making changes in the structure of the fat globules and make milk more stable (Srinivasan et al., 2008).

Brands C, D, E, F, G and H showed significant differences in their freezing point results when comparing first and fourth months of shelf life (Table 1). The differences of freezing point are probably related to the accuracy of the test, which can detect small modifications in the intrinsic balance of minerals, acids and other components in ionic dissolution; thus increasing or decreasing the value of the freezing point. For example, brand C that had an increase in acidity between the months (0.18 to 0.19) also showed an increase of freezing point because of greater amount of lactic acid that dissociates with the release of hydrogen ions. Brand A, for the first and last month (-0,5621 and -0,5620 °H), was below -0.550 °H (Table 1), the minimum values determined for raw and pasteurized milk (Brasil, 2011), there is no specified requirement in the legislation for UHT milk (Brasil, 1997). During UHT milk processing, stabilizer agents (phosphates and citrates of sodium) are added as a convectional ingredient. This addition might have been responsible for the increased need of cold temperature to freeze the milk samples, due to the increment of solution ionic force as a result of dissociation of these salts. Then, the values obtained in this experiment did not necessarily characterize a fraud occurrence, but a technological characteristic of UHT milk (Cortez and Cortez, 2010).

Only brand B had significant results for reduction of total solids that were 11.68 on the first month and 10.97 on the last month of shelf life, concomitantly this brand had reduction in fat content as well, which was responsible for the decrease observed in the total solids. The fat reduction can also provoke changes to density, increasing the values due to low density of milk fat ( $0.93 \text{ g.mL}^{-1}$ ) (Speer, 1991). In general, the average result for density was  $1.030 \pm 0.001 \text{ g.mL}^{-1}$  (Table 2) all according to the legal parameters (Brasil, 1997). For lactose results there were some differences between the months of analyzes, all samples showed values below 4,5% which is the index for fluid milk in the Brazilian legislation (Brasil, 2011), however this index doesn't exist in the legislation for UHT milk (Brasil, 1997). Both protein and minerals values did not show significant differences, their means were, respectively, above than 3.0% and 0.6% (Table 2) representing no technological or nutritional importance.

The low coefficient of variation for all results demonstrated a low variation between brands (Tables 1 and 2). These results are different to the ones described in a research that found 100% of conformity, and similar to a study performed in Brazil, in which out of 100 studied samples, one sample presented acidity out of normal range (Arruda et al., 2007; Robim et al., 2012).

In relation to frauds detection, none of these following substances were detected: corn starch, ethanol, sodium chloride, acid neutralizing agents, chlorine and hypochlorite, corroborating with the data described in a research done with 58 samples of UHT milk obtained in the city of Rio de Janeiro in 2012 (Robim et al., 2012). Nonetheless, many frauds are made with purpose of evading qualitative tests for milk and producing false negative results (Cardoso and Cruz, 2012). In regards to packaging, only 13 (21.66%) didn't present any problems, 14 (23.33%) presented problems with microholes and transversal solders, 11 (18.33%) only had microholes problems and 22 (36.66%) of the samples had defect in the transversal solders. The results of packaging analysis in comparison with mesophilic growth are shown at figure 1. All packages that had any problem were associated with a high number of mesophilic bacteria counting especially when the packages presented more than one defect. The extreme opposite happened when packages showed no problems and their counting were lower than  $1.47 \log.\text{mL}^{-1}$ . This study confirms that defects in the packaging can provide cross-contamination, decreasing the product quality.

Of analyzed samples, 44 (73.33%) had growth of mesophilic bacteria that ranged from  $<10$  to  $3.0 \times 10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$  on the first month and from  $<10$  to  $7.3 \times 10^8 \text{ ufc.mL}^{-1}$  on the last month of shelf life (Figure 2), 22 (36,66%) of them was up  $1.0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . According to the bacteriological results, only six samples (10%) attended to the standards established by the Brazilian legislation ( $<10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) of mesophilic bacteria (Brasil, 2001). However three of them showed positive results for the *B. cereus* counting. Those criteria (*B. cereus*) are not established by the legislation but it could be a cause of food-borne disease, deserving more attention. Enumeration of Aerobic mesophilic bacteria is the main parameter for milk products, because elevating bacterial counts can be related to low hygiene and low milk quality (Gunasekera et al., 2000; Borges et al., 2013). The high counts of mesophilic bacterias obtained in this study (Figure 2) shows the poor quality of this product at retail stores, highlighting the importance of processing control as well the quality of raw milk, once 90% of the samples (70) had values above the acceptable maximum by the legislation. Despite the commercial and nutritional importance of UHT milk, it can be found technical irregularities in this product, when compared results of microbiological and physico-chemical analysis to current legislation standards (Bersot et al., 2010). The majority of cases of post-processing contamination by spoilage of micro-organisms, is related to failures in the filling process and contact with contaminated equipment (Pujol et al., 2013; Tamine et al., 2009) One of the problems associated with contamination of UHT

milk are packaging problems, such as the presence of microholes or tightness of closing errors, that can result in cross-contamination of the product which may increase the bacterial count. This result can be observed in Figure 1.

Twelve samples (20%) obtained growth from  $<10$  to  $2.6 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> for *B. sporothermodurans* (Figure 3). This stains importance is related with deterioration of UHT milk, although does not present pathogenic potential, are used as an index of hygienic measurement (Abd et al., 2014). This microorganism is also responsible for proteinase release that makes the product inappropriate for consumption (Vaerewijck et al., 2001). The survival of *B. sporothermodurans* demonstrated in this experiment (Figure 3), shows failures in the quality of the product ready for consumption. Tabit and Buys (2010) demonstrated that *B. sporothermodurans* spores can survive at 130°C for four minutes, and only have significant protein denaturation after 12 minutes of high heat, according to the survival results of those strains after being submitted of UHT treatment.

No sulphite reducing clostridia were detected in this experiment, however clostridia are the anaerobic bacteria most frequently associated with foods. Agreeing with a study made with UHT goat milk in the South and Southeast of Brazil, that tested 100 samples and didn't found stains of *Clostridium* spp. (Popoff and Bouvet, 2013). Spores belonging to the genus *Clostridium* are of significant relevance to the dairy industry, as this genus contains known human pathogens as well as bacteria involved in the spoilage of milk products (Doyle et al., 2015).

6.6% of samples (four) were positive for psychrotrophic bacteria counting, ranging from  $<100$  to  $1.0 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Existence of psychrotrophic bacteria was detected only on the last month of shelf life (Figure 4). Those bacteria also have proteolytic properties that are developed in the refrigerated storage of raw milk after 72h of storage, giving the product an off-flavor and bad nutrition quality (Topçu et al., 2006).

25 samples (41.66%) had counts until  $1.0 \times 10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> of presuntive *Bacillus cereus* (Figure 5), this group contains strains that has serious pathogenic potential. In an experiment, 135 enterotoxigenic strains of *B. cereus* (75%) were detected from 180 samples of UHT milk (Vidal-Martins et al., 2006). In another study 1300 samples of 5 different processing plants of Brazilian UHT milk were analyzed, and no stains of *B. cereus* group were found (Pacheco-Sanchez et al., 2007). The presence of numbers of *B. cereus* greater than  $10^6$  organisms per gram in food indicates active growth and proliferation of the organism and is consistent with a potential hazard to health (Fda, 20012). A

study showed that changes in UHT milk (proteolysis) were dependent on *Bacillus cereus*, deteriorating sensory properties of milk, corresponding with the lipolysis and proteolysis progress, were observed in the samples with non-inactivated spores of *B.cereus*, stored at 24 °C (Janastová, 2006). Montanhini et al. (2012) in a study with 260 samples of dairy products, showed that 16.4% of the samples (18) from 110 samples of UHT milk had counts of *B. cereus*, but only after a pre enrichment step, concluding that those strains could be present in the products even if countings were below the capacity of detection on the direct plate method.

### CONCLUSION

With the showed results it can be concluded that the UHT milk analyzed, despite all the nutritional and technological importance, presented a poor quality and might present potential hazards to health, besides it can be consumed without the expected nutrition properties. Furthermore more attention in the raw material quality and in steps in the processing plant, like cleaning, filling and storage, are required in order to ensure its safety and good quality product to the population.

### REFERENCES

- Abd AA, Abdula'al NI, Abood AS (2014) Prevalence of Thermophiles and Mesophiles in Raw and UHT Milk. *Int J Anim Vet Adv* 6:23-27.
- Aouadi C, Mjri S, Maaroufi A (2015) Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *Bacillus sporothermodurans* in milk. *Food Microbiol* 46:40-45.
- Arruda PM, Cruz AG, Zoellner SS, Silva R, Soares MM, Fernandes VS, Galvão APGLK (2007) Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite ultra alta temperatura comercializados na cidade do Rio de Janeiro. *Rev Inst AL* 66:126-129.
- Bersot LS, Galvão JA, Raymundo NKL, Barcellos VC, Pinto JPAN, Maziero MT (2010) Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. *Semina: Cienc Ag* 31:645-652.

Borges LR, Fonseca LM, Martins RT, Oliveira MCPP (2013) Milk Quality According to the Daily Range in Farm Production in the Mesoregion Central Mineira and Oeste of Minas Gerais regions, Brazil. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.* 65:1239-1246, 2013.

Brasil (1997) Portaria nº 370.

Brasil (2001) Resolução da Diretoria Colegiada nº 12.

Brasil (2003) Instrução Normativa nº 62.

Brasil (2008) Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.

Brasil (2011) Instrução Normativa nº 62.

Cardoso CF, Cruz AG, Pinto UM, Faria JAF (2012) Investigating the adulteration of UHT milk in Brazil. In: HOORFAR, J. *Case Studies in Food Safety and Authenticity*. Woodhead Publishing, Cambridge, 301-307.

Cortez MAS, Cortes NMS (2010) *Introdução à Tecnologia de Leite e Derivados*. Instituto Pão Açúcar, São Paulo.

Cronin UP, Wilkinson MG (2008) *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and lowtemperature storage. *Food Microbiol* 25:235-243.

Doyle CJ, Gleeson D, Jordan K, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2015) Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *Int J Food Microbiol* 197:77–87.

Dualdo LCS, Casaroti SN, Paula AT, Melo RT (2010) Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema compact dry® tc durante

estocagem refrigerada de iogurtes. Rev Inst LCT 65:33-40.

Food and Agriculture Organization (2015) Top Production - Cow Milk, Whole, Fresh. Available at: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Accessed 6 January 2015.

Franco BDM, Landgraf M (2008) Microbiologia dos alimentos. Atheneu, São Paulo.

Huemer IA, Klijn N, Vogelsang HWL, Langeveld LPM (1998) Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. Int D J 8:851-855.

Janastová B, Dracková M, Vorlová L, (2006) Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on the Milk Quality following Ultra High Temperature Processing. Acta Vet. BRNO. 75:601-609.

Marth EH, Steele JL (2001) Applied Dairy Microbiology. Marcel Dekker, New York.

Martins AMCV, Rossi Júnior OD, Salotti BM, Cortez ALL, Cardoso MV (2008) Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. Cien Tec Alm 28:295-298.

Martins RS, Santos CV, Teixeira SR (1999) Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. Org Rur Agroind 1:55-69, 1999.

Moatsou G (20013) Sanitary Procedures, Heat Treatments and Packaging. In: PARK, Y.W.; HAENLEIN, G. F. W. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *Wiley-Blackwell: United Kingdom*.

Montanhini MTM, Pinto JPA, Bersot LR (2012) Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. UNOPAR Cien Cien Biol S 14:155-158.

Nero LA, Mattos, MR, Beloti V, Barros, MAF, Pinto JPAN, Andrade NJ, Silva WP, Franco BDG (2005) Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Cien Tec Alim* 25:191-195.

Pacheco–Sanches CP, Massaguer PR (2007) *Bacillus Cereus* in brazilian ultra high temperature Milk. *Cien Agr* 62:152-161.

Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD (2006) Qualidade microbiológica de leite cru e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Cien Tec Alim* 26:645-651.

Popoff MR, Bouvet P (2013) Genetic characteristics of toxigenic clostridia and toxin gene evolution. *Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines*, France. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003> Accessed 20 December 2014.

Pujol L, Albert I (2013) Potential application of quantitative microbiological risk assessment techniques to an aseptic-UHT process in the food industry. *Int J Food Microbiol* 162:283-296.

Robim MS, Cortez MAS, Silva ACO, Filho RAT, Gemal NH, Noqueira, EB (2012) Pesquisa de Fraude no Leite UAT Integral Comercializado no Estado do Rio de Janeiro e Comparação Entre Métodos de Análises Físico-Químicas Oficiais e o Método de Ultrassom. *Rev Int LCT* 67:43-50.

Senesi S, Ghelardi E (2010) Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins* 2:690-1703.

Shirai MA (2010) *Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono*. Available at: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/23520> Accessed 12 December 2015.

Speer E, (1991) *Lactogia Industrial*. Acribia, Espanha.



Srinivasan D (2008) Componentes Principais dos Alimentos, Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. In: Srinivasan, D.; Kirk, L. P.; Owen, R. F. Química de Alimentos de Fenema. Artmed, São Paulo 222.

Tabit FT, Buys E (2010) The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores. Int J Food Microbiol 140:207–213.

Tamine AY (2009) Milk Processing and Quality Management. Blackwell Publishing Ltda. United Kingdom.

Topçu A, Numanoglu E, Saldamli I (2006) Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. Int D J 16:633-638.

U S Food and Drug Administration (2012) Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, BBB - *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Available at <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070492.htm> Accessed 5 February 2015.

Vaerewijck MJ , De Vos P, Lebbe L, Scheldeman P, Hoste B, Heyndrickx M (2001) Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* And Other Aerobic Spore-Forming Species In Feed Concentrate For Dairy Cattle. Journal of Applied Microbiology. 16:1074-1084.

Vidal-Martins AMC, Rossi Júnior OD, Bürger KP, Cardozo MV, Salotti BM, Cortez ALL (2006) *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do leite UAT. Rev Bra Cien Vet 13:32-36.

Vittori J, Schoken–Iturino RP, Poiatti ML, Pigatto C P, Chioda TP, Ribeiro CAM, Garcia GR, Ragazani AVF (2008) Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. Cien Rur 38:761-765.

Wijnands LM, Dufrenne JB, Van Leusden FM (2015) Characterization of *Bacillus cereus*, 2002. RIVM. Available at: <http://rivm.openrepository.com/rivm/handle/10029/9159> Accessed 07 January 2015.

Zeni MP, Maran MHS, Silva GPR, Carli EM, Palezi SC (2013) Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. *Unoesc e Cien - ACET* 4:61-70.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Considerando-se resultados obtidos, observa-se que ocorreram falhas no processo de produção do leite UHT, desde a rigorosidade do controle da matéria prima até a qualidade da hermeticidade em que se encontram as embalagens que contém o leite próprio para consumo durante a estocagem. Um produto de tamanha importância nutricional que é consumido em larga escala, não pode ser considerado como seguro e contraditoriamente não possui tanto rigor de fiscalização como deveria. Neste caso também seriam de grande auxílio se padrões de qualidade fossem especificamente criados para o leite UHT, deliberando melhores parâmetros e condições para o que se espera de um alimento inócuo, além de contar somente com eficiência e a segurança do tratamento térmico que, em virtude das reais condições nacionais de produção leiteira não são eficazes ao considerar-se a obtenção de uma matriz alimentícia nobre em todos os sentidos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD, A. A.; ABDULA'AL, N. I.; ABOOD, A. S. Prevalence of Thermophiles and Mesophiles in Raw and UHT Milk, *International Journal of Animal and Veterinary Advances*. v.6, n.1, p.23-27, 2014.

ANTUNES, A. C.; PACHECO, M. T. B. *Leite Para Adultos: Mitos e Fatos Frente a Ciência*. São Paulo, Livraria Varela, 2009. 457p.

ARRUDA, P. M.; CRUZ, A. G.; ZOELLNER, S. S.; SILVA, R.; SOARES, M. M.; FERNANDES, V. S.; GALVÃO, A. P. G. L. K. Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite ultra alta temperatura comercializados na cidade do Rio de Janeiro, *Revista Instituto Adolfo Lutz, Juiz de Fora*, v. 66, n. 2, p.126-129, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. *Processo de leite longa vida*. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/fixedcontent.aspx?area=sob-proc>> Acesso em: 10 dez. 2014.

BARRETO, J. M. O. *Fatores de virulência de Bacillus cereus isolado na cadeia produtiva do leite na microrregião de Viçosa, Minas Gerais*. Viçosa, 2012. 62 f. Dissertação – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2012.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V.C.; PINTO, J. P. A. N.; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná – Brasil. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p.645-652, jul./ set., 2010.

BORGES, L. R.; FONSECA, L. M.; MARTINS, R. T.; OLIVEIRA, M. C. P. P. Milk Quality According to the Daily Range in Farm Production in the Mesoregion Central Mineira and Oeste of Minas Gerais regions, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 65, n.4, p.1239-1246, mar., 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, 24 de novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico Para Rotulagem De Produto De Origem Animal Embalado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 25 nov. 2005. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera o caput, exclui o parágrafo único e inserir os 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 82.006. 14 dez. 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *MPs e Dipoa discutem procedimento de combate à fraude*. 20 nov. 2014 Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/11/mps-e-dipoa-discutem-procedimento-de-combate-a-fraude>> Acesso em: 6 jan. 2015.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão do Citrato de Sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 19.700, 08 set. 1997. Seção 1.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25/06/1962, nº 1.236 de 02/09/1994, nº 1.812 de 08/02/1996, nº 2.244 de 04/06/1997 e nº 6385 de 27/02/2008. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 27 fev. 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. nº 360, 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 26 dez. 2003.

BREDIUS, M. W. J.; REE, E. M. Media for the detection and enumeration of clostridia in foods. In: CORRY et al. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. 4 ed. New York: Taylor and Francis Group, 2003. 1957p, p. 14-30. Elsevier Science B.V. Germany. 2003

BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIAN, R. L. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT integral e desnatado, *Ciencias. e Tecnologia de Alimentos*. v. 25, n.3, p.408-411, 2005.

CARDOSO, C. F.; CRUZ, A. G. PINTO, U. M.; FARIA, J. A. F. *Investigating the adulteration of UHT milk in Brazil*. In: HOORFAR, J. *Case Studies in Food Safety and Authenticity*. Woodhead Publishing, Cambridge, 349 p. cap. 33, p.301-307, 2012.

CORTEZ, M. A. S.; CORTEZ, N. M. S. *Introdução à Tecnologia de Leite e Derivados*. São Paulo: Instituto Pão Açúcar, 2010. 118 p.

CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low temperature storage. *Food Microbiology*, v. 25, n. 2, p. 235-243, 2008.

DOMARESKI, J.L.; BANDIERA, N. S.; SATO, R.T.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E.H.W. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. v.60, n.3, p.261-269, 2010.

DOYLE, C. J.; GLEESON, D.; JORDAN, K.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, n. 197, p. 77–87, 2015.

DUALDO, L. C. S.; CASAROTI, S. N. PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema compact dry® tc durante estocagem refrigerada de iogurtes. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Maio/Jun, v. 65, n. 374, p. 33-40, 2010.

EMBRAPA. *Dados estatísticos da produção de leite*. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acesso em: 8 dez. 2014.

ESPER, L. M. R. *Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas-S.P.* Campinas, 2006. 114 f. Dissertação - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. 2006.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia de Alimentos*. Rio de Janeiro: Atheneu, p.577-584. 1989.

FAO. *Top Production - Cow Milk, Whole, Fresh*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 6 fev. 2015.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. - *World Total*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 6 set. 2013.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London, Blackie Academic e Professional, 1998, 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo, Atheneu, 2008.182 p.

GRANUM, P. E.; O' SULLIVAN, K.; LUND, T. The sequence of the non hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*.v.177,n.2,p.225-229, ago.1999.

GUNASEKERA, T.S; ATTFIELD, P.V.; VEAL, D.A. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 66, p. 1228-1232, 2000.

GUELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*, v. 208, p. 129-134, 2002.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.1, p.185-189, jan. 2001.

HUEMER, I. A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, H. W. J; LANGEVELD, L. P. M. Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. *International Dairy Journal*. Great Britain: Elsevier Science, v.8, p. 851-855, nov. 1998.

HUTH, P. J.; DIRIENZO, D. B.; MILLER, G. D. Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *Journal of dairy science*, American Dairy Science Association, n. 89, p. 1207-1221. 2006.

JANASTOVÁ, B.; DRACKOVÁ, M.; VORLOVÁ, L. Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on the Milk Quality following Ultra High Temperature Processing. *Acta Veterinaria BRNO*. v.75, p.601-609, 2006.

JELEN, P. Review of Basic Technical Principles and Current Research in UHT Processing of Foods. *Canadian Institute of Food Science Technology*. Canada: Copyright, v. 6, p. 159-166, 1983.

KABUKI, D. Y.; SOARES, C. M.; SOUZA, R. M.; KUAYE, A. Y. Avaliação da produção de enterotoxinas do complexo protéico NHE em *Bacillus cereus* isolados de produtos lácteos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. CD-ROM.

KRÜGER, C. C. H.; SILVA, C. A.; VEDANA, M. I. S.; TIENE, C.; CÂNDIDO, L. M. B. Atividade antimicrobiana de peptídeos obtidos de caseína bovina. *Alimentação e Nutrição*, v. 17, n. 1, p. 7-12, 2006.

LIU, J.; REN, J.; LIU, Z.; GUO, B. A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, China, n. 172, p. 251–256, 2015.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*. 2 ed. 744p. 2001.

MARTINS, R. S.; SANTOS, C. V.; TEIXEIRA, S. R. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil. *Organizações rurais e agroindustriais*, Lavras, v. 1, n. 2, p. 55-69, 1999.

MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta

Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 295-298, 2008.

MOATSOU, G. Sanitary Procedures, Heat Treatments and Packaging. In: PARK, Y.W.; HAENLEIN, G.F.W. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *Wiley-Blackwell: United Kingdom*. p.288-309, 2013.

MONTANHINI, M. T. M.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. R. Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 14, n. 3, p.155-158, 2012.

NERO, L. A.; MATTOS M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NÖMBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 157-163, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>>. Acesso em: 05 de fev. 2014.

OECD-FAO. *Agricultural Outlook 2011-2020, OECD Publishing and FAO*. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2011-en](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2011-en)>. Acesso em: 8 out. 2013.

OLIVEIRA, J. B. *Atividade proteolítica de bactérias psicotróficas isoladas de leite cru e implicações nos testes de adição fraudulenta de soro de queijo*. Seropédica, 2013. 163 f. Tese – Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2013.

PACHECO – SANCHES, C. P.; MASSAGUER, P. R. *Bacillus Cereus* in brazilian ultra high temperature Milk. *Ciências Agrícolas*. v. 62, n.2, p.152-161, 2007.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul./set. 2006.

POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of toxigenic clostridia and toxin gene evolution. *Institut Pasteur, Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines*, Paris, France, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003>> Acesso em dez. 2014.

PUJOL, L.; ALBERT, I. Potential application of quantitative microbiological risk assessment techniques to an aseptic-UHT process in the food industry. *International Journal of Food Microbiolog*, v.162, n.3, p.283-296, 2013.

REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR., O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade



enterotoxigênica das cepas isoladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* v. 59, n.6, p.1563-1569, 2007.

RHODEHAMEL, E. J.; HARMON, S. M. *Bacteriological Analytical Manual: Clostridium perfringens*. 5 feb. 2015. Available at:  
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070878.htm>

ROBIM, M. S.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, A. C. O.; FILHO, R. A. T.; GEMAL, N. H.; NOGUEIRA, E. B. Pesquisa de Fraude no Leite UAT Integral Comercializado no Estado do Rio de Janeiro e Comparação Entre Métodos de Análises Físico-Químicas Oficiais e o Método de Ultrassom. *Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes: EPAMIG*, v. 67, p. 43-50, nov./dez. 2012.

SENESI, S.; GHELARDI, E. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, v.2, p.1690-1703, 2010.

SHIRAI, M. A. *Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono*. Curitiba, 2010. 90 f. Dissertação – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010. Disponível em: <<http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/DissertaMarianne.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

SPEER, E. *Lactogia Industrial*. Espanha: Acribia, 1991.

SRINIVASAN, D. Componentes Principais dos Alimentos, Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. In: SRINIVASAN, D.; KIRK, L. P.; OWEN, R. F. *Química de Alimentos de Fenema*. 4 ed. São Paulo : Artmed, 2008. 875 p., p. 222.

TABIT, F. T.; BUYS, E. The effects of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores. *International Journal of Food Microbiology*, Pretoria, South Africa, n. 140, p. 207 – 213, 2010.

TAMINE, A. Y. *Milk Processing and Quality Management*. Blackwell Publishing Ltda. United Kingdom. p 58-61, 2009.

TEH, K. H.; FLINT, S. PALMER, J. ANDREWES, P. BREMER, P. LINDSAY, D. Biofilm - An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products?. *international dairy journal*, v. 34, n. 32, p. 40. 2014

TELLES, E. O.; BALIAN, S. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; PRATA, L. F.; FILHO, A. N.; TAVOLARO, P.; SILVA, P. H. F.; PANETTA, J. C. Leite Uht Integral: Avaliação De Alguns Parâmetros De Qualidade Dos Leites Cru E Processado. *Veterinária e Zootecnia*. v. 14, n.2, p.282-290, 2007.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O' DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 5987-6000, 2009. TOPÇU, A.; NUMANOGLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. *International Dairy Journal*, n.16, p.633-638, 2006.

TRONCO, V. M. *Manual para a inspeção da qualidade do leite*. 3 ed. Santa Maria: ed. UFSM. 2008. 203p.

U S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, BBB - *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. 2012 Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070492.htm> Accessed 5 February 2015.

VAEREWIJCK, M. J., DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHELDEMAN, P.; HOSTE, B.; HEYNDRICKX, M. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* And Other Aerobic Spore-Forming Species In Feed Concentrate For Dairy Cattle. *Journal of Applied Microbiology*. v. 9, n.16, p.1074-1084 dez., 2001.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B.M; JUNIOR, O. D. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do Índice Proteolítico e do Comportamento Rológico Durante a Vida de Prateleira do Leite UAT/UHT. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: SBCTA, v. 4 n.25, p. 698-704, out./dez., 2005.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JÚNIOR, O> D.; BÜRGER, K. P.; CARDOZO, M. V.; SALOTTI, B> M.; CORTEZ, A. L. L. *Bacillus cereus* enterotoxigênicos em diferentes fases do leite UAT. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, São Paulo. V.13, N.1, p.32-36, jan./abr. 2006.

VITTORI, J.; SCHOKEN – ITURINO, R. P.; POIATTI, M. L.; PIGATTO C. P.; CHIODA, T. P.; RIBEIRO, C. A. M.; GARCIA, G. R.; RAGAZANI, A. V. F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.3, p.761-765, maio/jun. 2008.

WESTHOFF, D.C. Microbiology of ultra high temperature milk. *Journal Dairy Science*, Champaign, v. 64, n. 1, p. 167-173, 1981.

WIJNANDS, L. M.; DUFRENNE, J. B.; VAN LEUSDEN, F. M. Characterization of *Bacillus cereus*, 2002. *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM*. Disponível em: <<http://rivm.openrepository.com/rivm/handle/10029/9159>> Acesso em: 07 jan. 2015.

WONG, N. P. 1988. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. New York, Chapman e Hall. 183 p, 1988.

ZACARCHENCO, P. B.; LEITÃO, M. F. F.; DESTRO, M. T.; ANDRIGHETO, C. O ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas v. 20, n. 3, p. 271-178, 2000.

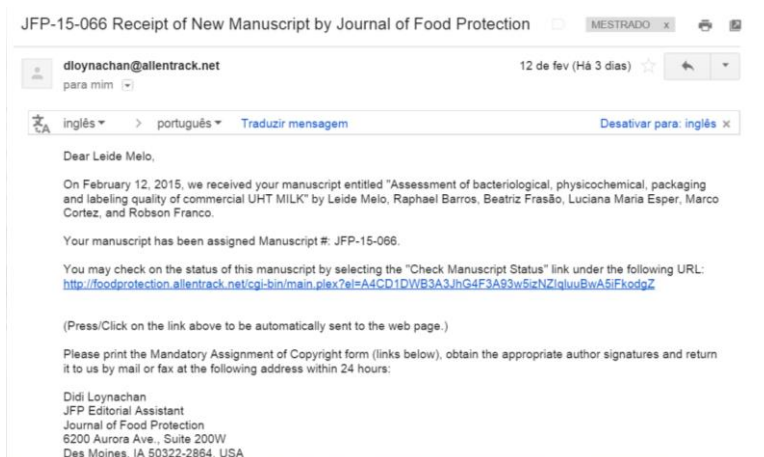
ZENI, M. P.; MARAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Infuência dos micorganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado

para produção de UHT. *Unoesc e Ciência - ACET*, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61-70 jan./jun. 2013.

## 6 ANEXOS

### 6.1 COMPROVANTE DE ENVIO DO ATIGO:

#### ASSESSMENT OF BACTERIOLOGICAL, PHYSICOCHEMICAL, PACKAGING AND LABELING QUALITY OF COMMERCIAL UHT MILK.



### 6.2 COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO:

#### QUALITY EVALUATION OF UHT MILK THROUGHOUT ITS SHELF LIFE.

