

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DA ESTABILIDADE DA MICELA DE CASEINA EM  
LEITE ESTÁVEL E INSTÁVEL NÃO ÁCIDO**

**LELIS APARECIDA PETRINI FORTUNA**

Caxias do Sul

2015

**LELIS APARECIDA PETRINI FORTUNA**

**ESTUDO DA ESTABILIDADE DA MICELA DE CASEINA  
EM LEITE ESTÁVEL E INSTÁVEL NÃO ÁCIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

**Co-orientadores:** Prof<sup>a</sup> Dra. Anna Celia Silva Arruda

Dra. Ana Cristina Krolow

Caxias do Sul

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

F745e Fortuna, Lelis Aparecida Petrini, 1962-  
Estudo da estabilidade da micela de caseína em leite estável e instável  
não ácido / Lelis Aparecida Petrini Fortuna. – 2015.  
146 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, 2015.  
Orientação: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray ; Coorientação: Profa. Dra.  
Anna Celia Silva Arruda, Dra. Ana Cristina Krolow.

1. Caseína. 2. Leite. I. Título.

CDU 2.ed.: 637.147.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. Caseína	637.147.2
2. Leite	637.12

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Paula Fernanda Fedatto Leal – CRB 10/2291

## **LELIS APARECIDA PETRINI FORTUNA**

### **ESTUDO DA ESTABILIDADE DA MICELA DE CASEÍNA EM LEITE ESTÁVEL E INSTÁVEL NÃO ÁCIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Co-orientadores: Profa. Dra. Anna Celia Silva Arruda

Dra. Ana Cristina Ritche Krolow

TESE APROVADA EM 16 DE MARÇO DE 2015.



---

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna



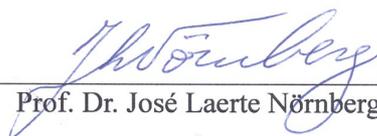
---

Profa. Dra. Anna Célia Silva Arruda



---

Profa. Dra. Vivian Fischer



---

Prof. Dr. José Laerte Nörnberg



---

Profa. Dra. Mirian Salvador

*Desistir?  
Eu já pensei seriamente isso,  
mas nunca me levei a sério.  
É que tem mais chão nos meus olhos do que  
o cansaço nas minhas pernas, mais  
esperança nos meus passos, do que tristeza nos  
meus ombros, mais estrada no meu  
coração do que medo na minha cabeça.*

Cora Coralina

*“Compra a verdade e não a vendas;  
compra a sabedoria,  
a instrução e o entendimento.”*

(Pv 23.23)

Dedico este trabalho com muito amor à minha mãe Teresa Maria Petrini e ao meu Pai Orlando Petrini (*in memoriam*), exemplos de perseverança, dedicaram suas vidas para a formação dos seus filhos. Parabéns a eles, meu pai e minha mamãe, mulher guerreira, exemplo de honestidade, dedicação e amor.

Ao meu querido irmão José Alberto Petrini meu grande amigo e incentivador.

Ao meu esposo Valdecir Fortuna, pela paciência e o apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por me dar saúde, sabedoria e disposição para que eu pudesse realizar este sonho.

À **Universidade de Caxias do Sul** e ao programa de **Pós-Graduação em Biotecnologia** pela oportunidade de concluir o curso de pós-graduação.

Aos meus pais **Tesera Maria Petrini** e **Orlando Petrini** pela educação e dedicação, foram meus exemplos de perseverança e, por todo amor.

Ao meu irmão **José Alberto Petrini** pela amizade, incentivo, carinho e apoio.

À minha irmã do coração **Neusa Ferro**, por ser verdadeiramente a irmã que não tive, pela presença nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo e amigo **Valdecir Antônio Fortuna** pela compreensão, paciência e apoio durante este trabalho.

Ao meu orientador professor **Dr. Sergio Echeverrigaray** e a **Dra. Ana Paula Longaray Delamare** pela dedicação e confiança nestes anos que trabalhamos juntos neste projeto.

Ao professor **Dr. Aldo José Pinheiro Dillon** meu agradecimento especial pelo apoio, incentivo e amizade.

À professora **Dra. Anna Celia Arruda**, grande admiração por ser a pessoa que és, pelo incentivo, carinho, amizade e também, pelas orientações, para que este trabalho fosse realizado. Não poderia deixar de dizer! Você foi à luz para meus pés nesta caminhada, exemplo de profissional e ser humano.

À **Dra. Ana Krolow**, pelo apoio e amizade.

À minha colaboradora **Dra. Luciana Bavaresco Andrade Touguinha** meu agradecimento especial, por fazer a diferença: ser além de colega amiga, por acreditar quando muitos desacreditaram.

À minha colaboradora e grande amiga **Dra. Maria Edi Rocha Ribeiro** - Líder do Projeto LINA na Embrapa, pela oportunidade e confiança, sem a sua ajuda não teria sido possível esse trabalho. Sempre me dizia seras eternamente reponsável por aquilo que cativas, embora separadas fisicamente estamos unidas espiritualmente.

Ao **Dr. Antônio Egito** pelo carinho e ajuda disponibilizada.

A banca de acompanhamento **Dra. Mirian Salvador e Dr. Mauricio Moura da Silveira** por terem contribuído com seus conhecimentos desde o princípio até a finalização dessa tese.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada

**Maurício Schiavo, Jucimar Zacaria e Ronize Rohr dos Santos** os quais me ajudaram na concretização desse trabalho e a todos que passaram na minha vida e deixaram um pouco de si e que, de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À **Embrapa Clima temperado de Pelotas**, pela oportunidade de estágio, e participação em muitos trabalhos de pesquisa.

**MUITO OBRIGADA!**

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 O Setor Leiteiro Nacional: uma Visão Geral .....	3
2.2 Normas de Qualidade do Leite.....	4
2.3 Composição e Características Físico-Químicas do Leite Bovino.....	7
2.4 Componentes não Protéicos do Leite: gordura, lactose e sais.....	8
2.5 Considerações Gerais Sobre as Proteínas do Leite.....	10
2.5.1 Classificação das Proteínas no Leite.....	12
2.5.1.1 Proteínas do Soro de Leite.....	12
2.5.1.2 Caseínas.....	13
2.5.2 Desnaturação e Precipitação das Proteínas.....	18
2.6 Caracterização Quantitativa e Qualitativa das Proteínas do Leite .....	22
2.7 Estabilidade do Leite.....	26
2.7.1 Fatores Extrínsecos: efeito na Estabilidade do Leite.....	27
2.7.1.1 Contaminação Microbiana.....	27
2.7.1.2 Mastite: principal problema sanitário na produção láctea.....	30
2.7.1.3 pH.....	32
2.7.1.4 Temperatura.....	33
2.7.1.5 Raça Bovina, Estádio de Lactação, Alimentação, Variação Sazonal.	34
2.7.2 Fatores Intrínsecos: efeito na Estabilidade do Leite.....	35
2.7.2.1 Desequilíbrio Salino.....	36
2.7.2.2 Cálcio Iônico.....	37
2.7.2.3 Citrato.....	38
2.7.2.4 Fosfato.....	38
2.8 Características Físico-Químicas do Leite Instável não Ácido.....	39

2.9 Ocorrência do leite Instável não Ácido.....	40
2.10 Influência do leite Instável não Ácido na Indústria.....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Coleta das Amostras: leite Estável e LINA.....	45
3.2 Caracterização de Mastite Clínica e Subclínica.....	46
3.3 Composição Físico-Química, Contagem Bacteriana e Contagem Células Somáticas.....	47
3.4 Estabilidade ao Teste do Etanol.....	48
3.5 Determinação do pH.....	49
3.6 Determinação da Acidez Titulável em Graus Dornic (°D).....	49
3.7 Estabilidade Térmica.....	50
3.8 Avaliação dos Perfis Eletroforéticos de Caseínas Presentes em Leite Estável e LINA.....	50
3.9 Determinação de Cálcio e Fósforo em Leite Estável e LINA.....	51
3.9.1 Pré-tratamento das Amostras.....	51
3.9.2 Determinação de Cálcio.....	52
3.9.3 Determinação de Fósforo Total adotando o Método de Ácido Ascórbico....	52
3.10 Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	53
3.11 Análise Estatística.....	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1 Caracterização da Mastite Subclínica: Isolamento e Identificação dos Agentes Etiológicos de Mastite.....	54
4.2 Características Físico-Químicas, Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total do Leite Estável e LINA de Vacas da Raça Jersey e Holandês.....	57
4.3 Relações da Produção de Leite e Período de Lactação em Leite Estável e LINA de Vacas da raça Jersey e Holandês.....	59
4.4 Avaliação do Perfil Eletroforético das Caseínas de Leite Estável e LINA.....	60
 <b>CAPÍTULO I</b>	
MUDANÇA DE MECANISMO DO ETANOL NA INSTABILIDADE DA CASEÍNA EM LEITE BOVINO.....	63

## **CAPÍTULO II**

MECANISMO DE INSTABILIDADE DA $\alpha$ , $\beta$ e $\kappa$ -CASEÍNA AO TESTE DO ETANOL MEDIADA POR INTERAÇÕES DE CÁLCIO EM LEITE BOVINO.....	88
---	----

## **CAPÍTULO III**

PATENTE DESENVOLVIDA.....	121
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>129</b>
<b>6. CONSIDERAÇÃO FINAIS.....</b>	<b>131</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Disposição legal vigente sobre requisitos dos padrões de qualidade do leite cru refrigerado para processamento às empresas lácteas no Brasil .....	6
Tabela 2- Composição média do leite bovino .....	8
Tabela 3- Minerais mais abundantes no leite bovino .....	9
Tabela 4- Composição média em porcentagem (%) dos componentes não protéicos do leite de diferentes raças bovinas.....	10
Tabela 5- Aminoácidos essenciais, e não essenciais nos mamíferos .....	11
Tabela 6- Composição proteica média do leite bovino (porcentagem do nitrogênio total).....	12
Tabela 7- Composição média das micelas de caseína .....	15
Tabela 8 - Influência da refrigeração sobre a composição da caseína solúvel .....	20
Tabela 9- Resultados das análises microbiológicas de amostras de leite de vacas da raça Jersey com CMT positivo.....	55
Tabela 10- Resultados das análises microbiológicas de amostras de leite de vacas da raça Jersey com CMT positivo agrupadas segundo a categoria de patógeno .....	57
Tabela 11- Média e desvio padrão das características de composição físico-química, CCS, CBT, período de lactação e produção de leite/dia em Leite estável e LINA comparadas dentro de cada raça Jersey e Holandês.....	58

## LISTA DE FIGURA

Figura 1- Estrutura exibindo a micela de caseína (caseína - $\text{PO}_4^{3-}$ - $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{PO}_4^{3-}$ - caseína).....	14
Figura 2- Modelos sugeridos para as micelas de caseína (A) modelo em roseta e (B) associação das subunidades. ....	18
Figura 3- Comparação das caseínas de leite de diferentes espécies, através da eletroforese para a detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca obtido pelos métodos uréia-PAGE (A) e SDS-PAGE (B). As indicações ao lado das “bandas” se referem ao tipo de caseína ( $\alpha_{s1}$ , $\beta$ , $\kappa$ ou $\gamma$ ); CNe - caseína de égua; CNv - caseína de vaca; CNh - caseína humana; CNc - caseína de cabra; CNp - caseína de porca; CNca - caseína de camela.....	24
Figura 4- Curva de estabilidade do leite ao etanol em relação ao pH .....	33
Figura 5- Armazenamento das amostras .....	48
Figura 6-Somacount 300 da Bentley® .....	48
Figura 7- Subclasses de estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol de acordo com a intensidade da coagulação, classificadas como: (A) intensidade 1 (caseína estável sem coagulação); (B) intensidade 2 (coagulação fraca); (C) intensidade 3 (coagulação média); (D) intensidade 4 (coagulação intensa); (E) intensidade 5 (coagulação muito intensa). ....	49
Figura 8- Perfil eletroforético das frações proteicas de amostras individuais de leite estável (N) e LINA (L) de vacas da raça Jersey. ....	61
Figura 9- Perfil eletroforético das frações proteicas de amostras de leite estável (N) e LINA (L) de vacas da raça Holandês. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BALs</b>	Bactérias ácido lácticas
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CCS</b>	Contagem de células somáticas
<b>CBT</b>	Contagem Total de Bactérias
<b>CBB</b>	Corante Comassie Brilliant Blue
<b>CMT</b>	<i>California Mastitis Test</i>
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>UHT</b>	<i>Ultra High Temperature</i>
<b>IN51</b>	Instrução Normativa 51
<b>IN62</b>	Instrução Normativa 62
<b>LINA</b>	Leite Instável Não Ácido
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>PNMQL</b>	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
<b>P-ser</b>	Radical Fosfato Ligado a Serina
<b>SILA</b>	Síndrome do Leite Anormal
<b>SISPEL</b>	Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pesquisa Leiteira
<b>UNAM</b>	Unstable non-acid milk
<b><math>\alpha</math>-La</b>	$\alpha$ -lactoalbumina
<b><math>\beta</math>-Lg/<math>\kappa</math>-caseína</b>	Complexo $\beta$ lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína
<b><math>\beta</math>-Lg</b>	$\beta$ -lactoglobulina
<b>GMP</b>	Glicomacropéptido
<b><math>\kappa</math>-CN</b>	Kapa-Caseína

## RESUMO

O leite instável não ácido (LINA) caracteriza-se pela perda da estabilidade da caseína ao teste do etanol, sem apresentar acidez acima de 18 °D. Este tipo de leite não é transportado para a indústria devido à subjetividade e imprecisão do teste do etanol, o qual não diferencia os tipos de leite, sendo eles: leite normal, LINA e o leite ácido. Este trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão dos fenômenos físico-químicos envolvidos na estabilidade e instabilidade das micelas de caseína em LINA e leite estável bovino e, desenvolver testes alternativos para a identificação e diferenciação de leite estável, ácido e LINA. Para este estudo foram utilizadas 58 vacas da raça Jersey e 130 vacas da raça Holandês em lactação. Teste de mastite subclínica para os animais da raça Jersey revelou 67% de positividade. O principal agente microbiano isolado do leite foi o *Staphylococcus* coagulase positivo. Não foi evidenciada relação entre a mastite subclínica e o LINA. Os atributos químicos do leite apresentaram diferenças significativas entre as raças avaliadas, independente da estabilidade do leite. Animais com períodos de lactação mais longos apresentaram maior instabilidade da caseína independente da raça estudada. Quanto a acidez, pH, contagem de células somáticas e contagem de bactérias totais não houve diferenças significativas para a estabilidade e raças avaliadas. O LINA apresentou todos os parâmetros avaliados dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira e não apresentando variações significativas com o leite estável. Testes de estabilidade em distintas concentrações de etanol mostrou que 72% (v/v) de etanol diferenciam claramente leite estável e o LINA. Leite estável e LINA apresentaram estabilidade térmica, mostrando que os dois testes não estão correlacionados. O perfil eletroforético das proteínas de leite estável e LINA não apresentou diferenças evidentes, indicando que a instabilidade não está associada a modificações qualitativas ou quantitativas nas caseínas do leite. Os resultados da análise de cálcio e fósforo total, micelar e solúvel, indicaram que o teor de cálcio na fração solúvel é consideravelmente maior no LINA, evidenciando que o cálcio iônico pode ser um fator importante na estabilidade do leite. Além disso, a relação Ca/P foi de 1,1/1 e 1,6/1 em leite estável e LINA, respectivamente. O maior teor de cálcio em relação ao fósforo no LINA pode contribuir para a sua desestabilização da micela de caseína na presença de etanol. O presente estudo deu origem a uma patente de invenção e sistema logístico para coleta de leite, a fim de evitar desperdícios indevidos e interpretações equivocadas acerca do tipo de leite. Particularmente, os métodos patenteados permitem que sejam realizados testes em campo que identificam e diferenciam de forma rápida e eficiente as amostras de leite estável, LINA e leite ácido.

Palavras-chave: estabilidade, caseína, leite instável não ácido, teste de etanol, cálcio.

## ABSTRACT

The unstable non-acid milk (UNAM) is characterized by the instability of caseins in the ethanol test and low acidity ( $\leq 18$  °D). This kind of milk is not transported to the industry due to the subjectivity and low precision of the ethanol test, which is not able to differentiate normal (stable), UNAM, and acid milk. The objective of the present work was to contribute for the understanding of the physic-chemical phenomena involved in the stability and instability of the casein micela in UNAM and stable bovine milk, and to develop reliable tests for the identification and diferenciation of stable, unstable, and acid milks. This study included 58 Jersey and 130 Holland cows in lactation. The subclinical mastitis test of Jersey animals resulted in 67% positivity. The most prevalent microbial agent isolated from subclinical mastitis milks was coagulase-positive staphylococci. It was not evidence any relation between subclinical mastitis and UNAM. Significant differences were detected between Jersey and Holland milks, but these were not related with milk stability. Animals with longer lactation period showed highest frequency of UNAM, independent of cow's race. No significant differences for pH, acidity, somatic cell count, and total bacterial count, were detected between races and stable milk and UNAM. The UNAM showed all the parameter within the patterns established by Brazilian legislation, with not significant differences from stable milks. Stability tests in different ethanol concentrations showed that 72% (v/v) ethanol clarely discriminated UNAM and stable milk. Both UNAM and stable milk exhibited the same behavior at high temperatures, indicating that ethanol and thermal stability are not correlated. No differences were detected between the protein electrophoretic profile of stable milk and UNAM, indicating that the instability is not associated with qualitative or quantitative modification of milk caseins. The analysis of total, micelial and soluble calcium and phosphorus showed that calcium concentration in the soluble fraction is higher in UNAM than in stable milk, indicating that ionic calcium can be an important factor in milk stability. Moreover, Ca/P relation was 1.1/1 and 1.6/1 in stable milk and UNAM, respectively. The highest Ca/P relation in UNAM can contribute for the destabilization of the casein micela in the presence of ethanol. The present study originates an invention patent for the evaluation of milk stability, and a logical system for milk transport, that can reduce losses by the correct determination of milk quality. The patented method allows the rapid and efficient identification and diferenciation of stable, UNAM and acid mik in the rural property and industry.

Key-words: stability, casein, unstable non-acid milk, ethanol test, calcium.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite pode ser definido sob o ponto de vista legal, segundo a Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Brasil, 2002). As características físico-químicas do leite determinam o valor nutritivo, o processamento industrial e a remuneração para o produtor (Marx *et al.*, 2011).

Dentre os componentes do leite, as proteínas possuem fundamental importância, pois são fundamentais na determinação das características físico-químicas, propriedades estruturais e nutricionais, e rendimento de produtos lácteos (Ye, 2011). Em termos quantitativos as principais proteínas do leite são as caseínas, as quais se encontram na forma de micelas formadas pela interação das distintas caseínas e cátions. Mudanças bruscas da dieta, variações com dietas ou pastos ricos em cálcio, deficiências ou desbalanços minerais (Ca, P, Mg), época do ano como o inverno e período de lactação da vaca podem promover a produção de um tipo de leite denominado Leite Instável Não Ácido (LINA), decorrente da instabilidade das micelas de caseína (Barros, 2001).

Em termos práticos, a estabilidade/instabilidade do leite é avaliada através do teste do etanol. O leite que coalesce ou precipita ao teste do etanol é considerado instável e não deve ser transportado para a indústria já que, em princípio, não apresenta estabilidade térmica podendo precipitar após tratamento a altas temperaturas, como é o caso do leite “Ultra High Temperature” (UHT).

Nos últimos anos o teste do etanol tem sido alvo de descontentamento por parte dos produtores devido à subjetividade e imprecisão do método (Barbosa, 2007). Erroneamente, o resultado positivo ao teste do etanol para o LINA é interpretado como leite ácido e,

consequentemente descartado (Fischer *et al.*, 2012). No entanto, o LINA caracteriza-se pela perda da estabilidade das caseínas do leite, resultando em precipitação positiva ao teste do etanol, sem haver acidez titulável acima de 18°D. Grande parte das amostras de leite que precipita no teste do etanol apresenta resultado normal de acidez nos exames que avaliam o pH ou acidez titulável em graus Dornic, de acordo com Marques *et al.* (2007), Zanela *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2011), gerando sérios problemas e desentendimentos entre a indústria leiteira e o produtor rural. Portanto, o LINA apresenta propriedades semelhantes ao leite estável ou normal, como pH entre 6,6 - 6,8 e resultado negativo ao teste de fervura.

Diante desse fato, faz-se necessário o empenho de pesquisadores da área para estudar o fenômeno LINA, buscando informações sobre o mecanismo que leva à instabilidade ao teste do etanol, ensaios confiáveis para a sua identificação e processamento, já que vem sendo descartado pela indústria dos países que ainda adotam o teste do etanol para verificar a resistência térmica ao processamento a altas temperaturas. Neste contexto, Barbosa (2011) sugere que deve-se unir esforços para a criação de um ensaio para avaliar a qualidade do leite que substitua o teste do etanol. Este ensaio deve ser prático, rápido e de baixo custo, a fim de se ter maior confiabilidade nos resultados verificados a campo para a diferenciação do leite estável e instável, melhor avaliação da qualidade do produto final e aproveitamento do LINA pelas indústrias. Este trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão dos fenômenos físico-químicos envolvidos na estabilidade e instabilidade das micelas de caseína em LINA e leite estável bovino e, desenvolver testes alternativos para a identificação e diferenciação entre leite estável, ácido e LINA. Além disso, o presente trabalho sugere o aproveitamento do LINA para o processamento de derivados lácteos, a fim de evitar o descarte desnecessário, aumentando a competitividade e sustentabilidade para o agronegócio leiteiro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O Setor Leiteiro Nacional: uma Visão Geral

Conforme projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o Brasil deve subir no *ranking* mundial de 4º para 3º maior país produtor de leite bovino em 2015. A produção chegou a 37 bilhões de litros de leite no ano de 2014, superando os 35 bilhões produzidos em 2013 (IBGE, 2014).

No 3º trimestre de 2014, a região sul do país foi a que mais adquiriu leite cru destinado à industrialização, participando com 38,7%, superando o Sudeste que adquiriu (38,6%), dessa forma a região Sul assume a maior participação nacional deste quesito. O Centro-Oeste participou com (13,0%), o Nordeste (5,3%) e, o Norte (4,5%) da aquisição. No entanto, Minas Gerais é o estado que mais adquire leite, cerca de 28% do total nacional, na seqüência o Rio Grande do Sul com 13,5%, o Paraná com 11,6%, Goiás com 10,9% e São Paulo com 10,2% de participação (IBGE, 2014).

A região Sul do Brasil tem se destacado pelo aumento expressivo da produtividade e produção de leite. No entanto, os principais fatores que limitam a eficiência dos sistemas de produção estão relacionados ao manejo da alimentação, à sanidade dos rebanhos e à qualidade do leite (Zanela, 2004).

A competitividade é o grande entrave do setor leiteiro, já que o mesmo deve se adequar rapidamente às normas internacionais. Neste contexto, os produtores apresentam dificuldades para se adequar a legislação vigente na qual as mudanças foram grandes e rápidas, revolucionando a cadeia produtiva. Os principais destinos da produção brasileira de leite *in natura* foram Bolívia, África do Sul, Siri Lanka e Estados Unidos. Já para leite em pó os destinos foram Venezuela, Cuba, Argélia, Egito, Costa do Marfim e Cuba (IBGE, 2014).

## 2.2 Normas de Qualidade do Leite

Segundo Langoni *et al.* (2011) o agronegócio leiteiro ocupa um espaço de destaque na economia mundial. Nas últimas décadas, a competitividade revolucionou o cenário leiteiro e o quesito qualidade tornou-se prioritário para que o setor leiteiro nacional se enquadrasse aos parâmetros citados pelo Codex Alimentarius.

O Codex Alimentarius é o conjunto de padrões internacionais para os alimentos, o qual foi criado em 1962 pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para facilitar a comercialização de alimentos e assegurar a qualidade e a inocuidade dos alimentos. Estes padrões propõem normas, diretrizes e recomendações baseadas em critérios científicos para consumidores, produtores e processadores, agências de controle e inspeção e para o comércio geral.

Leite de qualidade é aquele cuja composição química (sólidos totais, gordura, proteína, lactose e minerais), microbiológica (contagem total de bactérias), organoléptica (sabor, odor, aparência) e número de células somáticas atendam os parâmetros de qualidade exigidos internacionalmente (Ribeiro *et al.*, 2007). Deve ainda ser isento de resíduos de antibióticos, desinfetantes ou adulterantes e ser originado de rebanhos com sanidade controlada (Langoni *et al.*, 2013). A qualidade do leite destinado ao consumo humano merece atenção, tendo em vista a importância que este alimento assume em relação aos aspectos nutricionais, econômicos, sociais e de saúde pública. O leite é matéria prima para diversos produtos e a sua qualidade deve estar consonante com a finalidade e padrões exigidos na legislação vigente. Na indústria de laticínios, as características físico-químicas e microbiológicas são importantes, pois dela vai depender a qualidade bem como a quantidade de produtos obtidos.

Por ser muito antigo e desatualizado o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) de 1952, não estabelecia um limite máximo para

contagem de células somáticas (CCS) e nem para contagem total de bactérias (CBT). Dessa forma foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), por iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o apoio de órgãos de ensino e pesquisa. A proposta mais objetiva foi à publicação da Instrução Normativa 51, a qual foi implementada em 2005, e constitui o regulamento técnico sobre produção, identidade e qualidade dos diversos tipos de leite no país. Esta normativa prevê a redução da CCS, a qual expressa o grau de mastite subclínica do rebanho leiteiro, o resfriamento do leite nas propriedades leiteiras e seu transporte refrigerado a granel até a plataforma da indústria, redução da contagem total de microrganismos (CBT), ausência de resíduos químicos, pagamento por qualidade e/ou penalidades para incentivar o controle de mastite.

As normas internacionais de qualidade do leite referem-se principalmente à contaminação bacteriana e à CCS. No Brasil, em dezembro de 2011 o MAPA publicou a Instrução Normativa 62 (IN62) que alterou a IN 51 (Brasil, 2002). A partir de 2012, a IN 62 estabelece os limites para CCS de 600.000 cel/mL para as regiões sul e sudeste, esses limites ainda permanecem, embora o limite máximo permitido para 2014 seja de 500.000 cel/mL, (Brasil, 2011).

Com relação à composição química, os teores mínimos de gordura, proteína bruta e estrato seco desengordurado para leite são respectivamente: 3,0; 2,9 e 8,4%. Para as características físicas do leite produzido, os padrões de acidez estabelecidos são de 14 a 18°D, e deve ser estável em solução etanólica com no mínimo 72°GL de etanol (Brasil, 2011). Com a adoção dos padrões atuais estabelecidos, as empresas processadoras de leite implantaram parâmetros de seleção para a compra do leite, o qual pode ser observado pela Tabela 1.

**Tabela 1-** Disposição legal vigente sobre requisitos dos padrões de qualidade do leite cru refrigerado para processamento às empresas lácteas no Brasil

Parâmetros	Padrões Estabelecidos
Proteína Bruta (PB)	≥ 2,9%
Gordura (GB)	≥ 3,0%
Extrato seco desengordurado (ESD)	≥ 8,4%
Contagem de células somáticas (CCS)	600.000 CS/mL
Contagem bacteriana total	600.000 UFC/mL
Estabilidade ao etanol	≥ 72° GL
Densidade	1.028 a 1.054 g/L
Acidez titulável (Dórníc)	14 ≥ x ≥ 18 °D
Crioscopia	Máx -0,512 °H

Fonte: adaptado Brasil (2002, 2011)

O setor leiteiro brasileiro apresenta problemas de competitividade, eficiência e qualidade. Os resultados de avaliações da qualidade do leite no Brasil mostraram que entre 20 a 50% dos produtores não atendem às exigências mínimas em relação à CBT, exigidas pela IN 51 (Langoni *et al.*, 2013). Devido a esses resultados prorrogou-se o tempo para os produtores se adequarem a essas mudanças. Há ainda muito por fazer para se atingir os limites legais estabelecidos, os produtores necessitam de um tempo maior para se adaptarem aos novos parâmetros fixados, que são normas rígidas para garantir a competitividade e a qualidade do leite para o beneficiamento industrial (Langoni *et al.*, 2013).

Na União Européia a regulamentação para qualidade do leite baseia-se no Codex Alimentarius que envolve contagem bacteriana total (CBT) inferior a 100 mil UFC/mL e CCS inferior a 400 mil cel/mL. Além disso, a União Europeia apresenta uma legislação bastante severa quanto à presença de adulterantes, antibióticos e água (Philpot & Nickerson, 2002).

A Nova Zelândia e a Austrália são os maiores exportadores de produtos lácteos. Esses países atendem às exigências de CCS de 400 mil cel/mL. Já para os Estados Unidos, a regulamentação exige que o leite *in natura* seja resfriado a 7°C, dentro de 2 horas após a ordenha e mantido nessa temperatura ou inferior. A contagem bacteriana total (CBT) do leite

deve ser inferior a 100 mil unidades formadoras de colônias (UFC)/mL; a CCS abaixo de 750 mil cel/mL e não deve conter resíduos de antibióticos, adulterantes ou água. Cada estado, cooperativa ou laticínio podem estabelecer requisitos mais rígidos se assim julgarem necessário (Philpot & Nickerson, 2002).

### **2.3 Composição e Características Físico-químicas do Leite Bovino**

A produção e a composição físico-química de leite bovino variam de acordo com a individualidade, raça do animal, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiental, estação do ano e vários fatores fisiológicos (gestação), patológicos (mastite) e intervalo entre ordenhas (Waldner *et al.*, 2014).

O valor nutritivo está diretamente relacionado com a determinação da qualidade físico-química do leite. O animal em estado normal de saúde produz sempre o leite de melhor qualidade, tanto em relação às características microbiológicas como físico-químicas. O manuseio desde sua obtenção até a industrialização pode promover a sua contaminação e conseqüentemente modificações, originando diferentes destinos na indústria laticinista. Do ponto de vista industrial, a facilidade com que pode ser transformado em diferentes produtos o torna objeto de estudo e de interesse tecnológico por muitos pesquisadores da área. A fabricação de derivados lácteos depende de algumas propriedades da proteína do leite como quantidade, composição e sua estabilidade térmica.

Em relação à composição química do leite, destacam-se os teores de lactose (4,6%), gordura (3,6%), proteína (3,4%) e 0,7% de minerais e vitaminas (Walstra, 2006). A composição química de leite bovino é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2-** Composição média do leite bovino

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

Fonte: Walstra (2006)

O leite contém um conjunto de componentes não proteicos de importância nutricional e que estão direta ou indiretamente envolvidos na estabilidade físico-química do leite e outros produtos lácteos.

#### **2.4 Componentes não Protéicos do Leite: gordura, lactose e sais.**

A gordura do leite, na sua maior proporção, está formada por triglicerídeos (97 – 98%) e pequenas quantidades de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolípidios (Ordoñez *et al.*, 2005). Nos padrões atuais tem se dado menor importância para os teores de gordura e maiores para os teores de proteína (González *et al.*, 2001), devido à caseína ser imprescindível para o processamento de derivados lácteos de qualidade.

O principal açúcar do leite é a lactose, sua concentração é variável, depende da individualidade e da raça do animal, bem como do grau de infecção do úbere e estágio de lactação. A lactose e os íons solúveis Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> são os componentes principais responsáveis pela pressão osmótica do leite (Leitner, 2006). No entanto a lactose é o componente do leite menos afetado pela alimentação. A relação da lactose com a estabilidade

do leite se dá pelo fato de que a sua decomposição leva a formação de ácidos, redução do pH e uma forte tendência a um efeito redutor da estabilidade do leite (Leitner *et al.*, 2006).

A composição e a disposição dos sais do leite são fatores importantes para o equilíbrio iônico entre as fases solúvel e coloidal, para a manutenção da estabilidade da micela da caseína do leite. O cálcio e o fósforo encontram-se ligados a caseína na forma de um complexo de fosfocaseinato de cálcio (associados com a estrutura das micelas de caseína). Conseqüentemente, o soro tem relativamente pouco cálcio e fósforo, comparado com o leite integral. Existem diversos minerais em quantidades muito pequenas: sódio, potássio, magnésio, flúor, iodo, enxofre, cobre, zinco, ferro ((Lin *et al.*, 2006).

Segundo González *et al.* (2001), o cálcio procede do plasma sanguíneo, que tem por sua vez origem nos alimentos e no esqueleto. Em geral, é difícil aumentar o conteúdo de cálcio do leite através da dieta, uma vez que há um equilíbrio entre o cálcio sanguíneo e o cálcio do esqueleto. Aproximadamente 30% do cálcio, 20% do magnésio e 44% do fósforo se encontram em forma solúvel. O cálcio e o magnésio insolúveis se encontram física ou quimicamente combinados com caseinato, citrato ou fosfato. Na Tabela 3 são mostrados os minerais mais abundantes no leite bovino.

**Tabela 3-** Minerais mais abundantes no leite bovino

Mineral	% do leite total
Cálcio	0,12
Fósforo	0,10
Potássio	0,15
Cloro	0,11
Magnésio	0,01
Sódio	0,05

Fonte: adaptado de González *et al.* (2001)

O cálcio do leite de vaca apresenta três fases. Aproximadamente 70% apresentam-se na fase coloidal, associado com fósforo na formação do fosfato de cálcio, ligados às micelas de caseína do leite. Cerca de 20% está na fase solúvel, formando sais de cálcio e o restante na fase iônica, ou seja, íons de cálcio livre. O equilíbrio entre as três fases de cálcio é muito importante para a estabilidade do leite (Lin *et al.*, 2006). A composição do leite de diferentes raças leiteiras bovinas é apresentada na Tabela 4 (Ordoñez *et al.*, 2005).

**Tabela 4-** Composição média em porcentagem (%) dos componentes não protéicos do leite de diferentes raças bovinas

Raça	Godura	Lactose	Cinzas	Sólidos Totais
Pardo-suíço	4,0	5,0	0,7	13,3
Holandês	3,5	4,9	0,7	12,2
Jersey	5,5	4,9	0,7	15,0
Ayrshire	4,1	4,7	0,7	13,1
Guernsey	5,0	4,9	0,7	14,4
Zebuínas	4,9	5,1	0,8	14,7

Fonte: adaptado de González *et al.* (2001).

## 2.5 Considerações Gerais Sobre as Proteínas do Leite

As proteínas são constituídas de vinte aminoácidos primários (Tabela 5), unidos por ligações peptídicas, variando nas diferentes proteínas em número e na sequência de aminoácidos. Os aminoácidos têm em comum um grupo carboxila e um grupo amina unidos ao mesmo carbono (carbono  $\alpha$ ) e diferem entre si na estrutura do seu grupo residual (grupo R) (González & Silva, 2006; Nelson & Cox, 2011). Salienta-se que os ruminantes comportam-se de uma forma diferente em relação aos aminoácidos ditos essenciais (não sintetizados por mamíferos), pois as bactérias do rúmen têm condições de sintetizá-los (Van Soest, 1994 apud Barbosa 2011).

**Tabela 5-** Aminoácidos essenciais, e não essenciais nos mamíferos

Aminoácidos Não Essenciais	Aminoácidos Essenciais condicionais*	Aminoácidos Essenciais
Alanina	Arginina	Fenolalanina
Asparagina	Cisteína	Histidina
Aspartato	Glutamina	Isoleucina
Glutamato	Glicina	Leucina
Serina	Prolina	Lisina
	Tirosina	Metionina
		Treonina
		Triptofano
		Valina

\*Necessários para animais jovens em crescimento e/ou durante certas patologias.

Fonte: (Nelson & Cox, 2011).

A concentração média de proteínas do leite é de 30 – 35 g/L, representando 95% do nitrogênio total advindas das caseínas e das proteínas solúveis ou proteínas do soro. Os 5% restantes compõem o nitrogênio de compostos não proteicos (N-NMP), representados por uréia, amônia, ácido úrico, creatinina, peptídeos e aminoácidos, dentre outros (Sgarbieri, 1996; Nelson & Cox, 2011).

As proteínas são distribuídas em duas grandes classes, aproximadamente possuem cerca de 80 % de caseína e 20% de proteínas do soro, percentual que pode variar em função da raça dos animais, características genéticas, estágio de lactação, alimentos utilizados, formulação da dieta, manejo alimentar e condições ambientais (Santos & Fonseca, 2007; Livney, 2010). Na Tabela 6 apresenta-se a composição das proteínas do leite bovino.

**Tabela 6-** Composição proteica média do leite bovino (percentagem do nitrogênio total)

Compostos nitrogenados		%
Proteínas		
Caseínas		76
	$\alpha_{s1}$	30
	$\alpha_{s2}$	8
	$\beta$	27
	$\kappa$	9
	$\gamma$	2
Proteínas do soro		19
	$\beta$ - lactoglobulina	9,5
	$\alpha$ - lactalbumina	3,5
	Soro albumina	1
	Imunoglobulinas	2
	Outras	3
Outros	Peptídios, aminoácidos, outros	5

Fonte: adaptado de Ordóñez (2005)

### 2.5.1 Classificação das Proteínas no Leite

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: proteínas do soro, caseínas, proteínas das membranas dos glóbulos de gordura, enzimas e fatores de crescimento (Sgarbieri, 1996).

#### 2.5.1.1 Proteínas do soro do leite

Quando a caseína é removida do leite desnatado, o líquido remanescente recebe o nome de soro do leite e a desnaturação ocorre em temperaturas superiores a 80 °C (Tronco, 1997). As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas totais do leite e são constituídas por proteínas globulares, tais como a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (Sgarbieri, 1996).

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ - Lg) predomina no soro do leite e, cerca de 12 variantes genéticas já foram identificadas, sendo as duas principais  $\beta$ - Lg A e B. Outra importante proteína encontrada no soro do leite é a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ - La), sendo que duas variantes genéticas já

foram identificadas (A e B) (Sgarbieri, 2005).

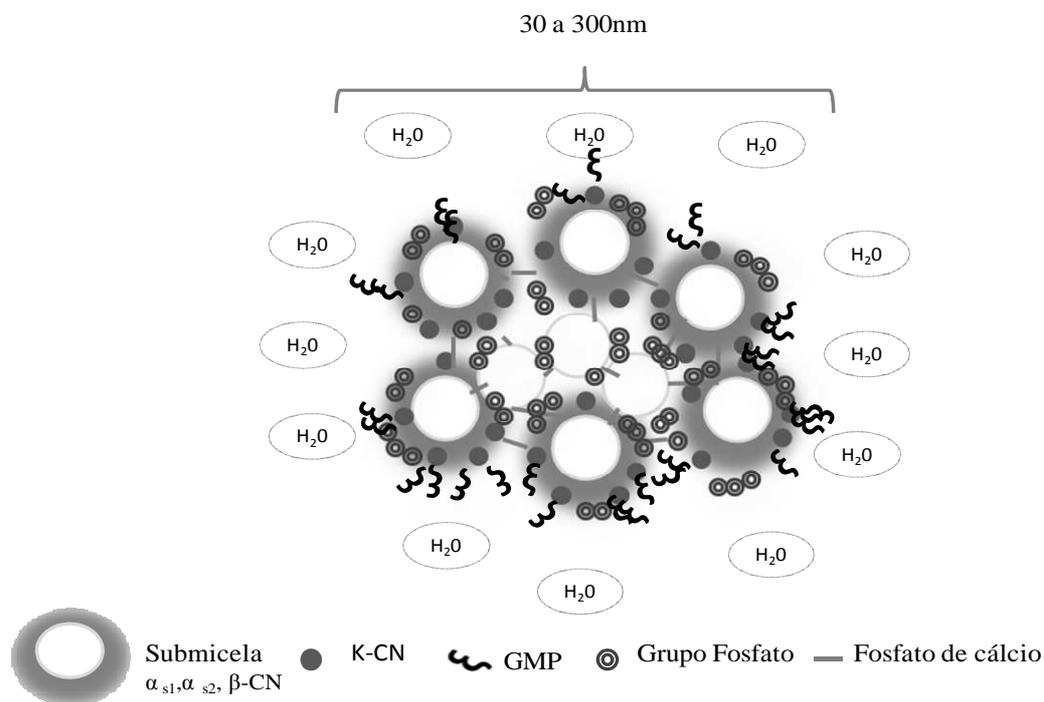
#### *2.5.1.2 Caseínas*

As caseínas são fosfoproteínas contendo números variáveis de radicais fosfato ligados à serina (P-ser). Os radicais fosfatos estão em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, com regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (atividade anfipática), ficando mais suscetíveis à proteólise (Sgarbieri, 2005). São sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e secretadas na forma de micelas (grandes grânulos de caseína). A sua molécula possui grupos fosfatos covalente, que estão envolvidos nas ligações com o cálcio. Após a caseína ser fosforilada, o cálcio se liga ao fosfato para iniciar a polimerização das partículas de micela. Esta estrutura (caseína -  $\text{PO}_4^{3-}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -  $\text{PO}_4^{3-}$ - caseína) é chamada de micela em formação (Tronco, 1997).

Segundo Fox & Brodtkorb (2008) a caseína é um grupo de fosfoproteínas insolúveis específicas representando cerca de 80% das proteínas presentes no leite bovino. Normalmente, a caseína é estável, e não é afetada pela pasteurização. Entretanto, quando há acidificação do leite, ocorre desestruturação das micelas de caseína e formação de coágulo. Devido à sua importância comercial, as caseínas têm sido estudadas extensivamente e é provavelmente o melhor sistema de proteína alimentar caracterizado.

Na Figura 1 pode-se observar a estrutura da caseína ligada ao fosfato de cálcio.

## MICELA DE CASEÍNA



**Figura 1-** Estrutura exibindo a micela de caseína (caseína -  $\text{PO}_4^{3-}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -  $\text{PO}_4^{3-}$ - caseína)

Fonte: o autor (2015)

As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  e  $\gamma$ .

De acordo com Sgarbieri (2005), as micelas de caseína estão altamente hidratadas (3,7 g de água por grama de caseína) e possuem peso molecular de  $2,5 \times 10^8$  Da.

Para Cheftel *et al.* (1989), a caseína também encontra-se em forma de micelas, que são grupamentos de várias moléculas de caseína ligada a íons, como o fosfato de cálcio, formando os complexos macromoleculares e apresentam maior quantidade de água em relação aos outros constituintes, que podem ser visualizados na Tabela 7

**Tabela 7-** Composição média das micelas de caseína

Constituintes da micela de caseína	%
Água	65,0
$\alpha_{s1}$	33,0
$\alpha_{s2}$	11,0
$\beta$ -caseína	33,0
$\kappa$ -caseína	11,0
$\gamma$ -caseína	4,0
Ca	2,9
Mg	0,1
Fosfatos	4,3
Citratos	0,5

Fonte: Cheftel *et al.* (1989)

As  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ - caseínas são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos e, apresentam de 23, 25, 24 e 19 KDa, respectivamente. Os restantes 7% do peso das micelas estão sob a forma de cálcio inorgânico (2,87%), fosfato (2,89%), citrato (0,4%) e pequenas quantidades de magnésio, sódio e potássio. As caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  estão situadas no centro das micelas em associação com o fosfato de cálcio coloidal e a  $\kappa$ -caseína que fica na região externa não permite a precipitação das caseínas sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  por ação dos sais de cálcio do leite (Sgarbieri, 2005).

A solubilidade da  $\kappa$ -caseína não é afetada pela presença de cálcio, graças a uma região da sequência primária da para- $\kappa$  caseína (resíduos de aminoácidos básicos e resíduos apolares que estão agrupados na região aminoterminal, compondo uma região apolar e insolúvel). Por ser esta apolar, a região para-  $\kappa$  caseína orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas  $\alpha_s$  e  $\beta$  dispostas no núcleo da micela, ao passo que a região glicomacropéptica (GMP) carboxiterminal da  $\kappa$  caseína hidrofílica orienta-se para o exterior da micela interagindo com a água. São essas interações da sequência primária

da  $\kappa$ -caseína que estabilizam as micelas do leite.

Essas caseínas das micelas diferem entre si pela sua composição de aminoácidos, que lhes conferem características particulares:

a) caseína  $\alpha_{s1}$  – constituída por cadeias polipeptídicas, três regiões da sua sequência primária são formadas por resíduos com cadeias laterais apolares, ou hidrofóbicas, situadas entre os resíduos de aminoácidos 1 - 44, 90 – 133, 132 – 199. Apresenta uma região polar ácida, que contém muitos resíduos de aminoácidos carregados, localizados entre os resíduos 41 - 80, onde se localizam sete dos oito resíduos fosforilserina e, onde se concentra a carga líquida da proteína (Sgarbieri, 2005). Esta proteína é considerada fraca e flexível (Oliveira & Timm, 2007), permitindo a entrada de proteases e precipitando com níveis de cálcio muito baixos. Outro fato é a ausência do aminoácido cisteína em sua estrutura molecular (Cheftel *et al.* 1989).

b) caseína  $\alpha_{s2}$  – possui uma estrutura bipolar, os resíduos fosforil em número de 10 a 13 estão agrupados em três segmentos, 8 - 16, 56 - 61, 129 - 133. Já os resíduos apolares se encontram nas porções 90 - 120 e 160 - 207 (sequência carboxiterminal). Apresenta dois resíduos de cisteína por molécula. É a mais hidrófila das caseínas, pois é a mais fosforilada e a mais rica em resíduos catiônicos (Sgarbieri, 2005). Possui uma grande sensibilidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  por isso está mais susceptível a precipitação por este íon do que a caseína  $\alpha_{s1}$  (Walstra & Jenness, 1984).

c) caseína  $\beta$  – na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  formam suspensões coloidais ao invés de precipitarem como as caseínas  $\alpha_{s1}$ . É uma proteína anfipática com uma região hidrofílica na porção N-terminal e uma parte carboxiterminal localizada nos resíduos 136 – 209. Estes resíduos na grande maioria são apolares, no entanto, as regiões entre os resíduos de 1 a 135 possuem cinco resíduos fosforil, contendo toda a carga líquida da proteína. O conteúdo de prolina é relativamente alto e a mais hidrófoba das caseínas (Sgarbieri, 2005). A  $\beta$ - caseína é

dependente da temperatura, pois em 20 °C forma grandes polímeros, mas a 4 °C não possui esta propriedade (Oliveira & Timm, 2007), podendo perder a estrutura micelar e se tornar mais sensível à ação das proteases (Cheftel *et al.*, 1989). A estrutura primária da  $\beta$ -caseína é facilmente hidrolisada pela protease plasmina nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28 - 29, 105- 106 e 107 - 108, produzindo fragmentos peptídicos chamados caseínas  $\gamma$ , que se difundem para o soro, constituindo uma parte da fração proteose-peptona (Sgarbieri, 2005).

d)  $\kappa$ -caseína – é uma glicoproteína, possuindo um grupo fosfo-serina, é estável na presença dos íons de cálcio, assumindo um papel importante na estabilidade das micelas. O fosfato de cálcio atua como um agente cimentante, mas se não houver  $\kappa$ - caseína, a agregação continuará até a formação de um gel ou de um precipitado (Oliveira & Timm, 2007). Esta micela apresenta dois resíduos de cisteína  $\alpha$  por molécula, só apresenta um resíduo fosforilado, fixa apenas alguns íons  $\text{Ca}^{2+}$  e sua solubilidade não é afetada pela sua presença (Cheftel *et al.*, 1989).

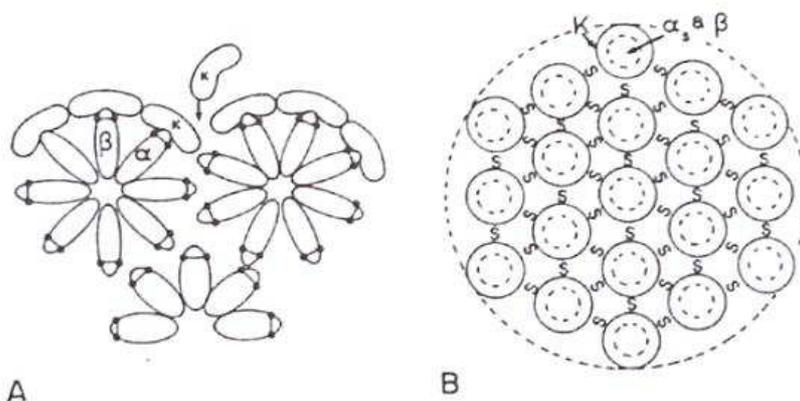
Sgarbieri (2005) relata que a hidrólise enzimática que ocorre no processamento do queijo ou tratamento térmico em temperaturas elevadas resulta na remoção ou dissociação da  $\kappa$ -caseína eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar, aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo;

e) caseína  $\gamma$  - resulta da proteólise da caseína  $\beta$ .

A estrutura exata das micelas de caseína, ainda permanece em debate, alguns modelos têm sido sugeridos por diversos autores (Rollema, 1992; Fox & Mcsweeney, 1998; Walstra, 1999).

Na Figura 2, podem-se observar modelos representando a estrutura das micelas de caseína. A Figura 2 (A) mostra o modelo em roseta com subunidades de  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseínas dispostas radialmente e  $\kappa$ -caseína perifericamente. A Figura 2 (B) mostra a composição

uniforme contendo em todas as subunidades  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas, representando a associação das subunidades através de ligações de cálcio ou fosfato de cálcio coloidal, representado por S.



**Figura 2-** Modelos sugeridos para as micelas de caseína (A) modelo em roseta e (B) associação das subunidades.

Fonte: Sgarbieri (1996).

### 2.5.2 Desnaturação e precipitação das proteínas

Desnaturação é simplesmente uma alteração sensível na estrutura original da proteína, sem que haja alteração na sequência dos aminoácidos, isto é, sem que haja rompimento ou alterações de ligações químicas primárias que ligam os aminoácidos entre si. Os agentes de desnaturação poderão ser classificados em físicos (calor, pH) e químicos (solventes orgânicos) (Sgarbieri, 1996).

A coagulação do leite é atribuída a uma modificação da estabilidade das micelas de caseína. Assim, quando um suficiente número de forças que evita a agregação das partículas do leite é ultrapassado, estas partículas tendem a coalescer e a formar um gel, o qual sofre um grau variável de sinérese. Para evitar a precipitação das micelas de caseína, a  $\kappa$ -caseína exerce

uma função importante, a de estabilizar a micela na presença do cálcio (Cheftel *et al.*, 1989).

O potencial hidrogeniônico interfere na estabilidade térmica do leite, sendo considerada normal uma faixa de variação entre 6,6 a 6,8. Em pH ácido (abaixo de 6,5), ocorre a redução da força iônica para a manutenção da estrutura micelar, o que determina um deslocamento do cálcio da fase coloidal para solúvel, aumentando o cálcio iônico (Singh, 2004).

O efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica do leite está relacionado à ação do calor sobre a solubilidade do cálcio, o qual se desloca para a forma coloidal, aumentando o tamanho das micelas de caseína e diminuindo a força de repulsão, formando o complexo  $\beta$ -Lg/ $\kappa$ -caseína. A modificação da superfície micelar é decorrente da redução do pH devido a formação de ácidos orgânicos a partir da decomposição da lactose (Walstra & Jenness, 1984).

Na refrigeração, a mobilidade das moléculas de caseína é restrita. Esse efeito é graças ao fosfato de cálcio amorfo que liga as sub micelas de caseína entre si e parte das caseínas deixa as micelas e dispersam-se (Walstra & Jenness, 1984). A 20°C, a caseína micelar representa 93 a 95% da caseína total, a 2 °C passa a não constituir mais do que 80 a 85%. Isso provoca uma alteração no equilíbrio entre as caseínas, com direção à fase solúvel e uma diminuição no diâmetro médio das micelas. No leite refrigerado, o aumento da quantidade de água retida após 48 horas de conservação a 3 – 4 °C é de 30 a 40% superior aos valores registrados a 20 °C (Mathiev, 1985).

A  $\kappa$ -caseína, por possuir regiões de grande hidrofília em sua molécula orientando-se para o exterior, atua como estabilizadora da micela, graças a sua solubilidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , independente da temperatura. Quando ocorre a diminuição da temperatura, o volume das micelas aumenta, em parte pela exposição de cadeias laterais da  $\beta$ -caseína, que sobressaem da superfície micelar (Walstra & Jenness, 1984). O volume micelar é afetado pelo grau de hidratação das micelas, sendo o fosfato de cálcio coloidal parcialmente responsável pela alta capacidade de absorção de água pelas caseínas. Este comportamento das caseínas é indicativo

de suas características fortemente hidrofóbicas. O armazenamento do leite a baixas temperaturas (2 a 6°C) predispõe a duas alterações: desestabilização das micelas e proteólise limitada. O frio modifica o equilíbrio salino (Ca e P) entre as micelas e a fase solúvel, ocasionando um aumento do cálcio, fósforo e da caseína para o soro (parte solúvel do leite), aumentando ligeiramente o pH. Com isso, ocorrem modificações nas propriedades tecnológicas (aumento do tempo de coagulação, modificação da consistência da coalhada e da sinérese). Pode ocorrer também diminuição do rendimento do queijo.

A  $\beta$ -caseína migra para o soro, ficando mais acessível à ação de hidrólise pela protease nativa do leite (plasmina) e pelas proteases advindas das bactérias psicrotóxicas. Estas proteólises modificam a composição micelar e as propriedades físicas e tecnológicas da caseína, promovendo a coagulação enzimática, característica da coalhada do queijo e defeitos do sabor (Cheftel *et al.*, 1989). Na Tabela 8 observa-se o grau de solubilização de frações da caseína com a refrigeração.

**Tabela 8** - Influência da refrigeração sobre a composição da caseína solúvel

Temperatura (°)	Percentual de cada fração em relação à caseína solúvel		
	$\alpha_1$ -caseína	$\beta$ -caseína	$\kappa$ -caseína
35	35	34	29
0 a 4	28	47	25

Fonte: Adaptado de Arcuri (2003)

Segundo Walstra & Jenness (1984), existem proteases nativas no leite e a principal é a protease alcalina chamada plasmina de origem sanguínea e suas formas precursoras (zimogênio/plasminogênio) ocorrem no leite recém-ordenhado. O nível da plasmina aumenta durante a refrigeração, associando-se às micelas de caseína e atacando as ligações peptídicas no carbono terminal nos lados que tenham resíduos de arginina e lisina. As proteínas lácteas

mais sensíveis a plasmina são a  $\alpha_2$  – caseínas e a  $\beta$  – caseína. A ocorrência da plasmina e a solubilização de  $\beta$ -caseína, com a refrigeração do leite, promovem as condições para proteólise dessa caseína, com liberação de peptídeos e proteose-peptonas. Uma redução no rendimento da fabricação dos queijos pode advir da perda dessas frações protéicas no soro, que por serem solúveis deixam de ser incorporadas à estrutura do coágulo.

A degradação proteolítica da  $\beta$ -caseína é muito mais acentuada a 4 °C do que a 20 °C e maiores concentrações de  $\gamma$  caseína são encontradas em leites a temperatura de 4 °C do que a 10 ou 26 °C e isso é atribuído à dissociação tanto de  $\beta$ -caseína quanto da plasmina (Walstra & Jenness, 1984).

Segundo Singh (1995) em temperatura abaixo de 40 °C, a  $\alpha_2$  – caseína é a fração mais sensível ao cálcio, enquanto a  $\beta$ -caseína é bastante solúvel mesmo abaixo de 5 °C. A concentração de cálcio necessária para iniciar a precipitação protéica diminui com o aumento da temperatura na faixa de 4 e 40 °C e o efeito é muito mais pronunciado na  $\beta$ -caseína do que na  $\alpha$ -caseína.

Existe uma relação da estabilidade do leite com a concentração de etanol adicionada durante a execução do teste ao etanol. A adição de etanol ao leite induz a várias alterações, os mecanismos de agregação da caseína pela ação do etanol são complexos. Soluções de etanol em concentrações mais elevadas acentuam o processo de desestabilização da micela de caseína devido à desidratação, favorecendo a coalescência das proteínas do leite (Mikheeva *et al.*, 2003). O mecanismo é complexo, uma vez que pode ocorrer sinergismo e potencializar o processo entre os fenômenos que estão ocorrendo, favorecendo ainda mais o processo de coagulação da micela de caseína do leite devido:

(1) desequilíbrio eletrostático devido a menor força de repulsão neutralizando as cargas das micelas de caseína e subsequente redução do potencial zeta, ocasionando colapso da  $\kappa$ -caseína por ação desidratante do etanol.

(2) o  $pK_R$  dos aminoácidos glutamato e aspartato é aumentado, enquanto os aminoácidos alcalinos lisina, arginina e histidina não são alterados, facilitando a agregação da proteína devido a diminuição da carga negativa na superfície da micela de caseína.

(3) o etanol reduz a solubilidade do fosfato de cálcio coloidal, formando cristais de cálcio tricálcico.

(4) desagregação das micelas de caseína.

(5) por último a sua associação com proteínas do soro formando o complexo  $\beta$  lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína.

## **2.6 Caracterização Quantitativa e Qualitativa das Proteínas do Leite**

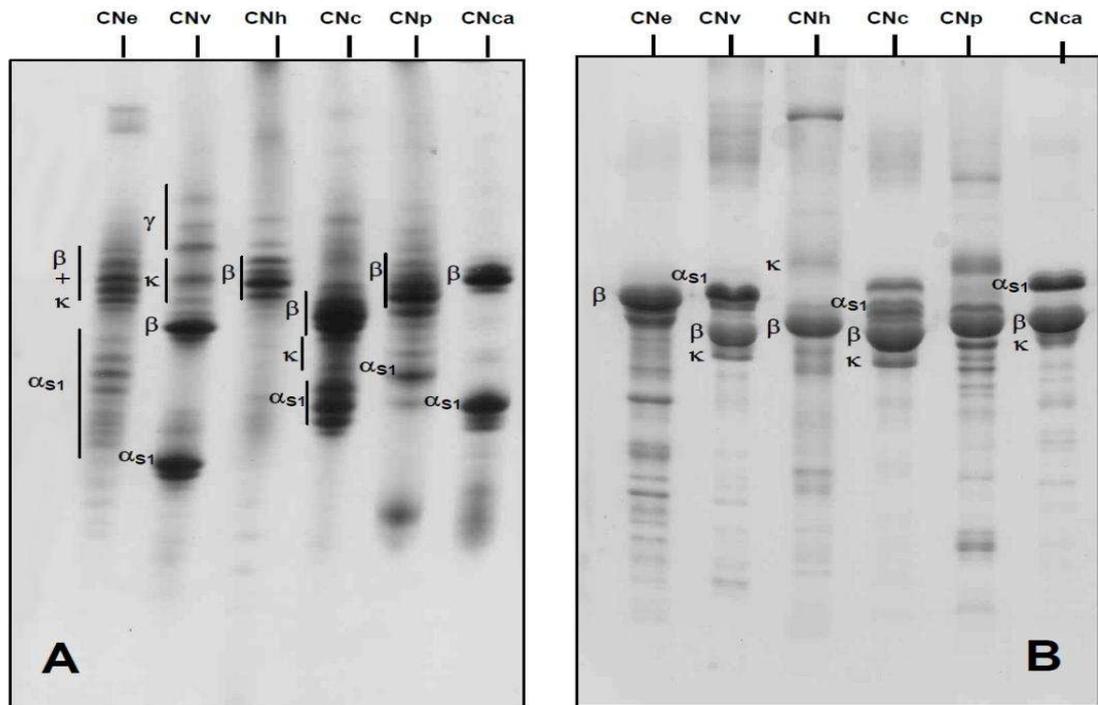
Vários métodos são utilizados para quantificar proteínas, dentre eles o método de Bradford. (Kamizake, 2003). Esse método é baseado na interação entre o corante Comassie Blue BG-250 (CBB) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o CBB provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, a qual absorve a luz fortemente em 595 nm. Inicialmente o corante tem cor vermelha e após a ligação entre proteínas e o CBB, o corante é convertido na cor azul. A relação entre a concentração de proteína da amostra e a intensidade da cor azul é determinada pela absorção da luz, medida com o espectrofotômetro na região do visível. Os valores de absorbância fornecidos pelo espectrofotômetro e as respectivas concentrações dos padrões de proteína (em geral a soro albumina bovina) são utilizados para a construção da curva de calibração e a obtenção do coeficiente de determinação (Bradford, 1976; Kamizake, 2003). Vários métodos são utilizados para detectar as frações protéicas em produtos lácteos. A eletroforese foi

introduzida em 1937 e é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo.

Na década de 1950, a técnica recebeu impulso e aperfeiçoamento, tornando-se indispensáveis nas mais diversas áreas da biologia molecular (Brammer, 2001). A eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema desnaturante (Figura 3) é um método prático para caracterizar  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  – caseínas e de grande utilidade na pesquisa para a obtenção de resultados confiáveis em relação aos componentes protéicos do leite. Através deste método, pode-se constatar o perfil das frações protéicas e sua massa molecular, bem como detectar adulterações e fraudes em leite e derivados. Os resultados permitem selecionar um produto confiável, processável a nível industrial com segurança e qualidade, oferecendo melhor aceitabilidade do consumidor. Neste contexto, o uso da metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida na área de laticínios vem sendo utilizada com bastante sucesso, conforme pode-se constatar em trabalhos publicados por Egito *et al.*, (2001; 2002; 2006; 2007).

Os métodos de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em presença de uréia (uréia – PAGE) e dodesil de sódio (SDS-PAGE) foram utilizados para identificar adulteração do leite de cabra pela adição do leite de vaca. O método mais apropriado para essa finalidade foi a uréia-PAGE. Em decorrência da presença da caseína  $\alpha_{s1}$  apresentar migração mais rápida no leite bovino, essa metodologia permite detectar adulterações em torno de 2,5% de adição de leite bovino em leite de cabra (Egito *et al.*, 2006).

O método de uréia-PAGE (Figura 3A) separa as proteínas por diferença na carga elétrica e o método SDS-PAGE (Figura 3B) por tamanho da molécula. Esses dois métodos podem separar grupos de proteínas e variações genéticas (Egito *et al.*, 2006).



Fonte: adaptado de Egito *et al.*, 2006

**Figura 3-** Comparação das caseínas de leite de diferentes espécies, através da eletroforese para a detecção de fraude de leite de cabra com adição do leite de vaca obtido pelos métodos uréia-PAGE (A) e SDS-PAGE (B). As indicações ao lado das “bandas” se referem ao tipo de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  ou  $\gamma$ ); CNe - caseína de égua; CNv - caseína de vaca; CNh - caseína humana; CNc - caseína de cabra; CNp - caseína de porca; CNca - caseína de camela.

Egito *et al.* (2001) trabalharam com separação e caracterização de  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas,  $\gamma$ -caseína-Like e com o componente 5-Like peptídeos de proteose peptona em leite de éguas, utilizando os métodos monodimensionais ureia-PAGE, SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. Das caseínas presentes no leite de éguas, 62% foram identificadas como  $\alpha_{s1}$ -CN, apresentando grande identidade com  $\alpha_{s1}$ -CN de outras espécies de animais. Das identidades 51, 48, 43, e 40% corresponderam a regiões  $\alpha_{s1}$ -CN de porca, camela, vaca e humano, respectivamente. Por outro lado, pequenos traços de  $\gamma$ -caseína-Like e 5-Like peptídeos de proteose peptona foram encontrados em toda caseína. As  $\alpha_{s1}$ , - caseína,  $\beta$  e  $\kappa$ -

caseínas, foram separadas por eletroforese bidimensional em numerosas variantes isoelétricas, com pontos isoelétricos distribuídos entre pH 4,4 a 6,3; 4,4 a 5,9 e 3,5 a 5,5 respectivamente. As  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína possuem caráter mais ácido em leite de égua do que a de vaca.

A avaliação das diferenças nas frações de caseínas entre LINA e leite estável ainda não são conclusivas. Lopez (2008) analisando as frações de caseína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em LINA verificou que o cromatograma de uma amostra de LINA não apresenta diferenças nos picos das frações de caseína quando comparado com os cromatogramas apresentados por amostras estáveis ou pela amostra padrão. Tal fato indica que não há diferença no perfil das frações de caseína encontradas no LINA. Os resultados das concentrações das diferentes frações de caseína, bem como sua quantidade total de leites estáveis e dos classificados como LINA nos diferentes meses de amostragem, não apresentaram diferenças significativas. Porém, nota-se que a concentração da  $\kappa$ -caseína no mês de julho foi de 4,60 mg/mL, sendo este o menor valor obtido quando comparado com as médias dos meses de maio e setembro, que foram de 5,56 e 5,07 mg/mL, respectivamente. O mês de julho caracterizou-se por ter sido o mês em que ocorreu a maior incidência de LINA e tal fato pode ser influenciado pela menor concentração de  $\kappa$ -caseína nessas amostras de leite.

Peters *et al.* (2012) analisando o perfil eletroforético qualitativo das proteínas de amostras de leite bovino estável ao teste do etanol e submetidas a manejo aversivo (sob condições de estresse), não detectaram diferença entre o perfil das caseínas do leite de vacas submetidas ao manejo aversivo e ao não aversivo. Segundo os autores, provavelmente isto ocorreu devido a curta duração do tratamento estressor, o qual não foi suficiente para causar alterações na fração protéica do leite.

Barros (2001) constatou através do perfil eletroforético diferenças nas frações protéicas de leite bovino que tiveram resultados positivos ao teste do etanol. Concordando com esse autor, Barbosa *et al.* (2012) analisou os efeitos da restrição alimentar sobre a produção de leite

bovino e sobre o perfil eletroforético de proteínas, bem como relacionou à estabilidade do leite pelo teste do etanol. Foram conduzidos dois experimentos com vacas Jersey: no primeiro, avaliou o efeito da redução de 40% na alimentação fornecida a vacas semiconfinadas; no segundo, avaliou o efeito da restrição de 30% do conteúdo de nutrientes digestíveis totais na alimentação de vacas confinadas. As amostras de leite foram classificadas conforme estabilidade no teste do etanol a 72% (v/v). Na restrição alimentar de 40%, as vacas semiconfinadas reduziram a produção de leite e o leite instável apresentou maiores teores de  $\beta$ -caseína e de proteínas totais, porém menor proporção de  $\kappa$ -caseína em comparação ao leite estável. Para a restrição de 30% do aporte energético, não ocorreu redução na produção leiteira, porém diminuiu a estabilidade no teste do etanol e, o leite instável e o estável não diferiram quanto às proteínas lácteas.

## 2.7 Estabilidade do Leite

A estabilidade térmica do leite pode ser definida como o tempo necessário para ocorrer coagulação visível, em determinado pH e temperatura e está diretamente relacionada a capacidade do leite em resistir à coagulação em condições de temperatura padrão, usualmente 140 °C (Horne & Muir, 1990).

Existem dois tipos de instabilidade do leite:

(1) a instabilidade devida à alta contagem bacteriana, levando a formação de ácidos orgânicos.

(2) aquela de etiologia desconhecida, designada como LINA, cuja acidez é normal.

Com relação à estabilidade do leite, a legislação atual estabelece como padrão a estabilidade ao etanol 72% (v/v), a qual representa uma medida rápida e eficiente de avaliação da estabilidade térmica. Segundo Zanela *et al.* (2009) a grande maioria das indústrias utiliza o

teste de estabilidade ao etanol em concentrações superiores, o que pode levar ao descarte de leite de forma injustificada.

A prova do etanol é o principal teste utilizado nas plataformas de recepção dos laticínios, a fim de detectar a termoestabilidade do leite cru (Molina *et al.*, 2001). Este teste apresenta como princípio a atuação do etanol como um desidratante, simulando as condições de aquecimento. Para isto são colocados em um tubo de ensaio 2 mL de leite e 2 mL de etanol a 68 – 72% (v/v) (MAPA, 1981). Caso haja floculação do leite, pode-se suspeitar de leite ácido ou com instabilidade de proteínas, sendo esta amostra considerada não apta à industrialização (Molina *et al.*, 2001).

### **2.7.1 Fatores Extrínsecos: efeito na Estabilidade do Leite**

Dentre os fatores que interferem na estabilidade do leite muitos deles não estão relacionados diretamente com os componentes do leite, no entanto, podem afetar a concentração de alguns componentes, entre esses fatores pode-se citar: desenvolvimento de bactérias fermentadoras da lactose produzindo acidez no leite, desenvolvimento de proteases nativas do leite (plasmina) e de origem das bactérias psicrotróficas, mastite (inflamação da glândula mamária), pH, temperatura, raça, estágio de lactação, alimentação e variação sazonal.

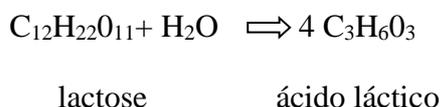
#### *2.7.1.1 Contaminação Microbiana*

Elevada contagens de bactérias interferem na composição do leite, aumentando as concentrações de proteína e diminuindo as concentrações de lactose (Bueno *et al.*, 2008) pela passagem de proteínas do sangue e não por aumento da caseína (Fonseca & Santos, 2000). Quanto mais altas as contagens bacterianas, maior a atividade proteolítica advindas das

proteases bacterianas, interferindo negativamente na estabilidade do leite, uma vez que modifica a estrutura micelar e reduz a repulsão entre as micelas (Sgarbieri, 2005).

Dois importantes grupos de microrganismos estão relacionados com a instabilidade do leite: primeiramente aqueles microrganismos relacionados ao período anterior a implementação da IN 51 (Brasil, 2002), cujo problema estava relacionado à falta de refrigeração do leite. O leite acidificava devido à presença de bactérias mesófilas (baterias lácticas). A presença dessas bactérias em grande número indica limpeza e desinfecção inadequadas, higiene insuficiente na produção e/ou condições insatisfatórias de tempo e temperatura durante a produção ou conservação do leite (Nero *et al.*, 2009).

As bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*, atuam intensamente na fermentação da lactose, produzindo ácido láctico, baixando o pH do leite e, conseqüentemente ocorre a desestruturação das micelas de caseína devido a acidez do meio de acordo com a reação química:



que é um dos problemas detectados com maior frequência em nível de plataforma (Santos & Laranja, 2001). A acidez adquirida, ou seja, desenvolvida, consiste na somatória da acidez natural (albumina -1°D, citratos -1°D, dióxido de carbono -1°D, caseínas -5 a 6°D e fosfatos -5°D), que correspondem por uma acidez de 13 a 14°D, somada aos ácidos resultantes da fermentação da lactose (ácido láctico, acético, fórmico, butírico). O aumento de acidez ocorre quando o leite é obtido sob más condições de higiene e/ou não é mantido sob condições de refrigeração controlada, permitindo a multiplicação de microrganismos da flora natural do leite (bactérias lácticas) e/ou de bactérias contaminantes (Velloso, 1998).

Em um segundo momento, após a implementação da IN 51 surgiram novos problemas, pois o leite passou a ser refrigerado e com isso as bactérias psicrotróficas crescem e se multiplicam a uma temperatura de 7°C ou menos, independentes da temperatura ótima de crescimento, isto é, 20 a 30 °C (Santos & Fonseca, 2007).

As bactérias psicrotróficas presentes no leite possuem a capacidade de produzir proteases extracelulares resistentes aos tratamentos térmicos convencionais usados em laticínios (Santos & Fonseca, 2007). Mesmo em baixas concentrações, as proteases de origem bacteriana podem degradar a proteína e provocar reações adversas no leite e derivados tais como odor e sabor desagradáveis e geleificação, principalmente após processamento “*Ultra High Temperature*” (UHT). Além disso, a plasmina, enzima natural do leite ou seu precursor, o plasminogênio, pode potencializar a ação deterioradora das proteases, limitando o tempo de vida útil do leite UHT. Para proteases de origem microbiana, há uma concordância de que a maioria das proteases de psicrotróficos atue sobre a fração  $\kappa$ -caseína seguida de  $\beta$ -caseína, que são hidrolisadas mais rapidamente que a  $\alpha$ -caseína (Fonseca & Santos, 2000; Arcuri, 2003). As proteínas do soro são geralmente menos susceptíveis à ação das proteases de psicrotróficos (Sgarbieri, 2005), entretanto, quando essas proteases atacam a  $\kappa$ -caseína, há uma desestabilização da micela que leva à coagulação do leite.

Frequentemente tem-se observado a positividade do leite sem acidez adquirida ao teste do etanol. Dentre as causas de instabilidade do leite, a presença de bactérias psicrotróficas produtoras de proteases, principalmente as do gênero *Pseudomonas* têm merecido grande atenção, por constituírem cerca de 70% da microbiota psicrotrófica do leite. Quando o crescimento de psicrotróficos atinge contagens de  $10^6$  -  $10^7$  UFC/mL, as proteases são detectadas, ocorrendo à hidrólise das proteínas do leite (Arcuri *et al.*, 2004; Arcuri *et al.*, 2008), sobretudo da  $\kappa$ -caseína, ocorrendo a redução da estabilidade do leite.

Arcuri *et al.* (2008) em sua pesquisa objetivaram quantificar, isolar e caracterizar bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. Foi verificada a predominância de bactérias psicrotróficas gram-negativas (81,2%), sendo *Pseudomonas* o gênero mais isolado e *P. fluorescens* a espécie predominante. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica a temperaturas de refrigeração de 4, 7 e 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração do leite e dos produtos lácteos. Esses autores corroboram a hipótese de que o crescimento e a multiplicação de bactérias psicrotróficas constituem um novo desafio para a qualidade do leite, por estarem relacionadas com a refrigeração e positividade ao teste do etanol.

#### 2.7.1.2 Mastite: principal problema sanitário na produção láctea.

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros do mundo e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na exploração de bovinos leiteiros. Também conhecida como mamite, é uma inflamação da glândula mamária caracterizada por mudanças físico-químicas na composição do leite, pelo aumento de células somáticas e alterações no tecido glandular (Ribeiro *et al.*, 2000). As células de defesa (leucócitos) migram do sangue para o interior da glândula mamária e combatendo o agente agressor, sendo a mastite a maior causa da transferência dessas células do sangue para o leite (Whist *et al.*, 2006).

Oliveira *et al.* (2012) relatam que vários fatores estão relacionados a pré-disposição do animal à mastite: manejo higiênico de ordenha, nutrição, condições ambientais e fatores genéticos. No entanto, ocorre secreção dos constituintes do sangue para o leite e como consequência, tem-se aumento de frações do soro do sangue e desequilíbrio salino (cloreto de sódio), ocorrendo elevação do pH e diminuição da estabilidade do leite. Tais fatores contribuem para a redução da estabilidade térmica do leite. Há de se considerar que podem ocorrer alterações na composição do leite, principalmente no teor de lactose, gordura e

proteína (Aires 2010).

Na mastite podem ocorrer alterações dos componentes físico-químicos do leite, principalmente da proteína (caseína), que migra para a parte solúvel do leite (soro). A produção em volume de leite diminui, com isso ocorre um aumento da concentração de gordura (Cunha *et al.*, 2008). Em relação à lactose ocorre um decréscimo devido ao aumento dos íons sódio, cloro e potássio em decorrência de altas contagens de CCS (Ogola *et al.*, 2007). Como existe uma diversidade de resultados em relação à interferência do número de CCS em relação à estabilidade do leite frente ao teste do etanol, é impossível afirmar tal interferência. Para Fruscalso (2008) longos períodos de lactação estão relacionados a altas contagens de CCS por destruição do tecido glandular, as proteínas plasmáticas passam em maiores concentrações para o leite, interferindo na composição e produção do leite. Leite mastítico e do final da lactação, têm três vezes mais probabilidade de ser instável do que leite de animais no início ou meio da lactação.

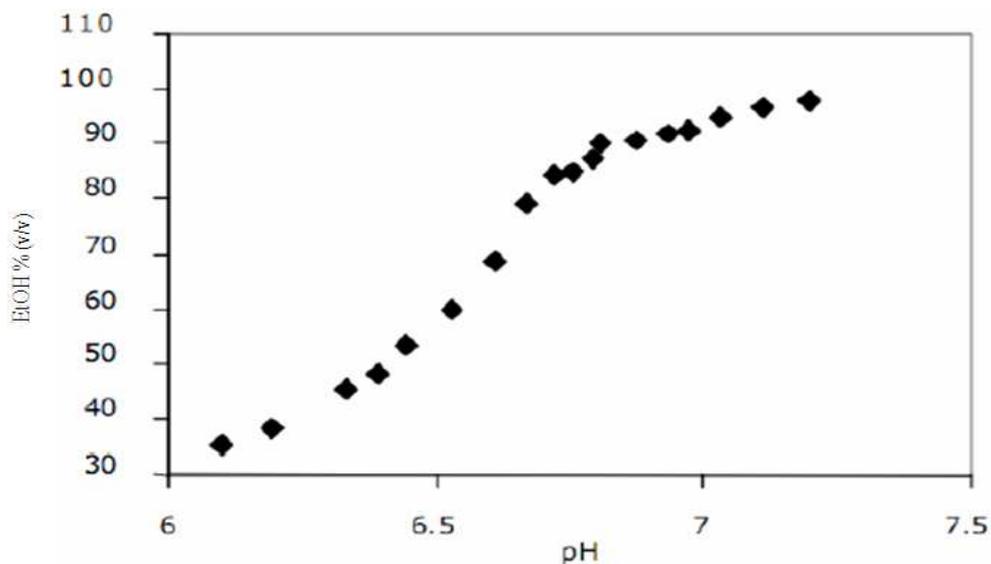
Viero (2010) trabalhando com a estabilidade do leite frente ao teste do etanol, encontrou maior número de CCS para LINA (239.000 CS/mL em relação ao leite estável 165.000 CS/mL). No entanto, Chavez *et al.* (2004), Abreu (2008) e Machado (2010) não encontraram relação entre contagens de CCS e estabilidade do leite frente ao teste do etanol. Corroborando, Donatele *et al.* (2003) sugerem não haver relação entre a positividade do leite ao teste do alizarol 72% e o número de células somáticas. No referido trabalho, 61,67% das amostras positivas ao alizarol apresentaram células somáticas inferiores a 300 mil cel/mL de leite. Negri *et al.* (2001) encontraram valores inferiores de CCS para leite instável não ácido e Zanela (2004) não encontrou diferença significativa entre as CCS de leite estável e instável não ácido, sendo que a maior porcentagem das amostras ficou abaixo de 300.000 cel/mL de leite.

### 2.7.1.3 pH

A variação do pH do leite determina a capacidade de segregação das proteínas em relação ao teste do etanol, sendo que quanto mais baixo o pH estiver da faixa normal (6,6 - 6,8), menor a concentração de etanol necessária para induzir a coagulação da micela de caseína do leite (Horne & Parker, 1981).

Horne & Muir (1990) em seus experimentos mostraram uma curva sigmoidal (Figura 4), evidenciando o efeito do pH sobre a concentração de etanol necessária para coagular a caseína do leite. Esta curva sigmoidal formada caracteriza-se por apresentar quatro regiões: os dois lados da curva sigmóide, estabelecidos pelos valores de mínima estabilidade em baixo pH, necessitando de menor quantidade de etanol para provocar a coagulação no leite e, pela máxima estabilidade em alto valor de pH.

Em pH inferiores a 6,8, as soroproteínas (albumina e globulina) estão agregadas a superfície da micela, proporcionando maior estabilidade térmica. No momento em que o pH ultrapassa 6,8, as soroproteínas migram para o soro e, ocorre a dissociação da  $\kappa$ -caseína micelar desestabilizando a micela de caseína (Singh, 2004). Já em pH acima de 7,0, o fosfato de cálcio é menos solúvel, reduzindo o  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a estabilidade térmica do leite (Horne & Muir, 1990; Negri, 2002).



**Figura 4-** Curva de estabilidade do leite ao etanol em relação ao pH

Fonte: Horne & Muir (1990)

A curva sigmóide formada está relacionada com a variação do nível do cálcio iônico no leite, isto é, quanto maior a quantidade desse íon, menor a exigência de etanol para provocar a coagulação, sendo considerado que o cálcio é o principal fator de interferência na estabilidade do leite frente ao etanol (Horne, 1992).

#### 2.7.1.4 Temperatura

O comportamento do leite é bem distinto quando comparamos a estabilidade ao calor e a estabilidade ao etanol, devido a alterações químicas, físicas e térmicas no processo de desestabilização micelar. Durante o aquecimento térmico, ocorre a formação do complexo  $\beta$ -LG/ $\kappa$ -caseína, interferindo na estabilidade do leite. Por outro lado, o pH interfere na composição do cálcio nas diferentes fases (coloidal e solúvel), levando a formação de uma típica curva sigmoidal, quando da estabilidade ao etanol.

O tratamento térmico altera o ambiente em torno da micela de caseína, devido a alterações no equilíbrio de dissociação dos ácidos e do fosfato de cálcio. O aumento da temperatura promove modificação na estabilização estérica da micela, devido ao decréscimo da

solubilidade do fosfato de cálcio. Nesta situação, o sal promove a migração deste para dentro da micela, podendo ocorrer formação de cristais de fosfato de  $\beta$ -tricálcio ou hidroxiapatita (Gaucheron, 2005). A quebra das ligações permite a migração da  $\kappa$ -caseína para a fase solúvel, na qual se encontra a  $\beta$ -lactoglobulina, formando ligações intermoleculares de dissulfeto do tipo  $-SH/SS$ , bem como interações hidrofóbicas, resultando na desnaturação das proteínas do soro  $\beta$ -lactoglobulina/ $\alpha$ -lactoalbumina). Por outro lado, com o resfriamento a solubilidade do fosfato de cálcio micelar aumenta, migrando para a fração solúvel, promovendo a quebra das ligações mediadas pelo fosfato de cálcio. Como consequência, ocorre a hidratação da  $\kappa$ -caseína e liberação da  $\beta$ -caseína para a fração solúvel, desestabilizando a conformação estérica da  $\kappa$ -caseína.

#### *2.7.1.5 Raça Bovina, Estádio de Lactação, Alimentação e Variação Sazonal*

Ponce & Hernandez (2001) relatam que as raças especializadas ou animais de alta produção leiteira, como a Holandês, são mais propensos à instabilidade da micela de caseína. De acordo com Mclean *et al.* (1984) animais da raça Holandês apresentam menor frequência da variante B para a  $\kappa$ -caseína, quando comparadas com animais da raça Jersey. Corroborando, Robitaille *et al.* (2001) afirmam em seu trabalho que uma expressão do alelo B maior do que o alelo A é um fator positivo para a maior estabilidade do leite frente ao teste do etanol, por necessitar de maiores concentrações de etanol para causar a desestabilização das proteínas do leite.

Considerando o período de lactação dos animais Barros *et al.* (1999), relacionaram as variações do cálcio iônico com o período de lactação e fase colostrar e encontraram valores mais elevados para a fase colostrar indicando que o período de lactação apresenta interferência no nível de cálcio iônico. Leites do início (11 – 110 dias de lactação) e do final (201 > 300 dias de lactação) em relação ao período intermediário segundo terço (101 – 200 dias de lactação) apresentam valores de cálcio mais elevados (Barros, 2002).

Vários autores comprovaram a relação da estabilidade do leite com a dieta fornecida aos animais, dentre eles podemos citar: Zanela *et al.* (2006), Fischer *et al.* (2006) e Fruscalso (2007) quando estudaram o LINA, comprovaram a positividade do leite ao teste do etanol em animais submetidos a restrição alimentar, demonstrando a forte relação entre a ingesta alimentar com a instabilidade do leite.

Barros *et al.* (1999) evidenciaram que mudanças bruscas da dieta, variações com dietas ou pastos ricos em cálcio com deficiências ou desbalanços minerais (Ca, P, Mg) podem causar a instabilidade do leite. Já Oliveira & Timm (2007) em seu trabalho, relacionaram épocas de carência alimentar com menor teor de caseína e aumento na concentração de íons cálcio em LINA.

Zanela *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2011) encontraram relação da variação sazonal do LINA, sendo o final do verão o período mais crítico. No Uruguai, Barros (2001) estudou a relação das estações do ano com a estabilidade do leite, sendo o LINA mais frequente no outono e nos períodos de seca. Em Cuba, Ponce & Hernandez (2001) verificaram positividade ao teste do etanol nos meses de março e abril, coincidindo com a época de escassez de alimento e baixa condição corporal dos animais. Para Marques *et al.* (2007) o LINA também é mais frequente nos meses de outono, período de menor disponibilidade de alimentos.

### **2.7.2 Fatores Intrínsecos: efeito na Estabilidade do Leite**

A estabilidade do leite está diretamente relacionada à estrutura de suas proteínas, principalmente a micela de caseína, que é a responsável pela manutenção da estrutura física do leite (Sgarbieri, 2005). O equilíbrio iônico entre os sais do leite nas fases difusa e coloidal interferem na estabilidade do leite. Quando este equilíbrio é rompido, principalmente pelo aumento de cálcio na fase difusa e pela diminuição de fosfatos e citratos a estabilidade da

micela de caseína é afetada negativamente. Existe uma relação direta entre a estabilidade do leite e as relações de equilíbrio entre os sais na forma difusa e coloidal.

#### 2.7.2.1 Desequilíbrio Salino

A mobilidade dos sais entre a fase difusa e micelar é afetada por muitos fatores, os principais fatores de interferência na estabilidade do leite são a acidez e o equilíbrio entre os sais de cálcio. O aumento de cálcio iônico por adição de íons cálcio ou acidez, ou redução deste por simulação do processo de aquecimento do leite, fará o cálcio migrar entre a fase difusa e micelar a fim de restaurar o equilíbrio (Tsioulpas *et al.*, 2007). Os íons cálcio são compartilhados com o equilíbrio de precipitação de fosfato de cálcio, desestabilização da ligação fosfoserina e quelação com o citrato, portanto se ocorrer qualquer alteração na distribuição de cálcio iônico pode-se prever que todos estes equilíbrios sofrerão alterações para restabelecer um novo estado de equilíbrio.

Os níveis de cálcio são afetados pela temperatura, mobilidade de cálcio, tempo de estocagem e pH (Lin *et al.*, 2006). O pH pode ser o fator de maior interferência no nível de cálcio no leite, mesmo que esteja dentro dos valores normais de acidez (6,6 – 6,8), pois valores de pH e cálcio iônico no leite são inversamente proporcionais (Barros, 2002; Barbosa *et al.*, 2006). Quando ocorre desequilíbrio salino como, por exemplo, aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , para que seja restaurado o equilíbrio ocorre o deslocamento dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  da fase solúvel para a fase coloidal, afetando a estabilidade e contribuindo para a positividade ao teste do etanol ou do alizarol, sem o leite estar ácido (Lin *et al.*, 2006). A estabilidade térmica do leite também pode diminuir devido a uma alta atividade do cálcio (aumento do cálcio solúvel) e uma baixa atividade de fosfatos e citratos (Sarbieter, 2005).

#### 2.7.2.2 Cálcio Iônico

O cálcio iônico é considerado um fator de interferência relevante quando da estabilidade térmica do leite no que tange o equilíbrio das micelas das caseínas (Chavez, 2004). Segundo

Horne & Parker (1981) as micelas de caseína em pH normal (6,6 - 6,8) estão negativamente carregadas. Essas cargas são fundamentais para sua estabilização em solução. A estabilidade das micelas de caseína é controlada pela quantidade de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio livre no sistema. Aumentando-se o cálcio total, aumenta-se a quantidade de cálcio ligado e ocorre redução das cargas negativas das micelas, diminuindo assim a barreira energética para a precipitação. Inversamente, reduzindo o nível de cálcio, ocorre o aumento das cargas negativas das micelas, aumentando a repulsão entre elas, dificultando a precipitação. Existe uma relação inversamente proporcional entre a estabilidade das proteínas e o teor natural de cálcio iônico. O teste do etanol é sensível à variação do cálcio iônico por provocar uma diminuição da solubilidade desse mineral (Horne & Parker (1981).

Barros *et al.* (1999) constataram a positividade ao teste do etanol em seus experimentos, observaram aumento do cálcio iônico para amostras positivas de  $0,110 \pm 0,0017$  e  $0,094 \pm 0,023$  g/L para as amostras negativas ao teste do etanol. Já para o pH constatou-se que valores mais baixos de pH correspondiam aos valores mais altos de cálcio iônico, mantendo-se ambos dentro do intervalo normal.

Barros *et al.* (2000; 2001) relacionaram os teores de cálcio iônico e pH de vacas individuais e logo após a ordenha. Encontraram diferenças significativas de ( $p < 0,001$ ) entre leite positivo e negativo no teste do etanol com valores de  $0,103 \pm 0,026$  Ca<sup>2+</sup> e  $0,118 \pm 0,030$  (g/L) ( $p < 0,0004$ ), respectivamente. Os autores concluíram que o cálcio iônico está relacionado positivamente com o teste do etanol e não com o pH natural.

Lin *et al.* (2006) relatam que os níveis de cálcio iônico são afetados pela temperatura. Com o aquecimento do leite ocorre o deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal. Isso leva a precipitação do fosfato tricálcico, devido a sua pouca solubilidade a altas temperaturas. Os autores constataram que amostras instáveis ao etanol 75% (v/v) apresentavam níveis de cálcio iônico mais alto do que as amostras estáveis. A estabilidade do leite ao teste do etanol

apresentou maior relação com a concentração de cálcio iônico do que com estágios de lactação ou valores do pH.

#### 2.7.2.3 *Citrato*

O citrato do leite encontra-se na forma solúvel e coloidal. A adição de citrato aumenta a estabilidade térmica por sequestrar o cálcio iônico (Santos & Fonseca, 2007), por isso é muito utilizada pela indústria em caso do leite ser submetido a altas temperaturas, como o UHT.

Stumpf (2013) constatou em seu experimento que a adição de citrato, bem como bicarbonato de sódio à dieta de vacas não interferiu na estabilidade do leite, concluindo a ineficiência destes aditivos no controle de incidência de LINA.

#### 2.7.2.4 *Fosfato*

O fosfato de cálcio coloidal ligado às frações de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas são responsáveis pela manutenção da estrutura e estabilidade das micelas de caseína. Trata-se de uma ligação *cross-linking*, isto é, o agente neutralizador dos resíduos de fosfoserina (*p-ser*) positivamente carregado, liga-se aos sítios negativos por fosfato de cálcio micelar. É difícil quantificar a relação cálcio e fosfato, mas é de aproximadamente 1,5 de acordo com Gaucheron, (2005).

Em relação à acidificação, o autor relata que ocorre uma dissolução do fosfato de cálcio coloidal, ocorrendo rompimento micelar das caseínas e estas reações são irreversíveis, mesmo que o pH fosse estabilizado no leite.

Em pH 5,2 todo o fosfato inorgânico está solubilizado, sugerindo a destruição completa do fosfato de cálcio micelar inorgânico, isto é, aquele cálcio que está ligado ao fosfato inorgânico e a fosfoserina. Em pH de 3,5 o cálcio é totalmente solubilizado.

Segundo Horne & Parker (1981) se o fosfato não estiver presente para remover o cálcio solúvel, mesmo em pH elevado, o leite apresenta baixa estabilidade ao etanol.

## 2.8 Características Físico-Químicas do Leite Instável não Ácido

Viero *et al.* (2010) avaliou 32 vacas da raça Jersey com aproximadamente  $141,4 \pm 64,3$  dias de lactação e constataram que não ocorreram alterações expressivas na composição físico-química do leite, CCS e na produção do leite quando relacionadas à suplementação de selênio à dieta alimentar. Esses autores constataram que de 124 amostras de leite analisadas, 102 (81,45%) foram estáveis e 23 (18,55%) foram instáveis, precipitando a uma concentração de etanol até 72% (v/v). Para Viero, 2008 o LINA apresentou aumento da concentração de cálcio iônico e menor de lactose em relação ao leite estável.

Sobhani *et al.* (1998) avaliou 20 vacas da raça Holandês, sendo que destas, 10 animais apresentavam reação positiva ao teste do etanol e 10 animais apresentaram reação negativa. Não houve diferença quanto aos animais positivos e negativos em relação a: teor de proteína, gordura, sólidos desengordurados, sódio, cloro, e ureia no leite.

Ponce & Hernández (2001) em seus estudos detectaram aumento dos teores de gordura e diminuição nas concentrações de lactose no leite após um quadro de síndrome do leite anormal (SILA). Já Marques (2004) analisou em seu trabalho 1.300 amostras de leite e encontrou variação positiva na composição de LINA em relação ao leite estável. Os teores de gordura foram mais elevados no LINA e as porcentagens de proteína bruta foram inferiores, contudo houve uma queda nos níveis de lactose, sendo que os valores médios obtidos para o leite estável e LINA foram 4,42 e 4,32 %, respectivamente. Posteriormente, Marques *et al.* (2007) verificaram um aumento significativo para os níveis de gordura ao compararem os valores apresentado pelo leite estável (3,52%) com os do LINA (4,62%).

Oliveira & Timm (2006) analisaram 282 amostras de leite cru obtidas na bacia leiteira de Pelotas. Foram comparadas amostras de leites estáveis com LINA e verificaram que a gordura foi o componente que apresentou maior variabilidade, sendo (3,04%) para leite

estável e (3,30%) para o LINA. Já para a lactose, foram detectados valores de 4,33% para leite estável e valores médios inferiores de 4,16% para o LINA. Resultados semelhantes foram encontrados por Barros *et al.* (2001), o qual analisou amostras individuais de leite em função a positividade ao teste do etanol, sendo os valores para os teores de gordura e lactose, médias de 3,95% e 4,65%, para os resultados positivos e de 3,40 % e 4,84%, para resultados negativos.

Para Zanela *et al.* (2009) a ocorrência de LINA foi de 55% e a sua composição apresentou-se mais diluída do que a do leite estável, com menores teores de proteína bruta, lactose, sólidos desengordurados e sólidos totais. Sobhani *et al.* (1998) não encontraram diferença significativa para a avaliação de gordura no leite instável ao etanol, porém a lactose apresentou valores inferiores quando comparados com os do leite estável.

## **2.9 Ocorrência do Leite Instável não Ácido**

O LINA é definido como produto que apresenta perda da estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol, porém este fato causa significativos prejuízos econômico-financeiros a toda cadeia produtiva, pois o leite é rejeitado ou subvalorizado pela indústria, mesmo apresentando níveis de acidez considerados normais pelos padrões do MAPA, sendo deixado, na maioria das vezes, na propriedade rural (Ribeiro *et al.*, 2007).

Alterações dessa natureza foram relatadas pela literatura em diferentes regiões do mundo como Japão (Yoshida, 1980), Itália (Pecorari *et al.*, 1984), Irã (Sobhani *et al.*, 1998), Cuba (Ponce, 2000), Uruguai (Barros *et al.*, 1999), Argentina (Negri *et al.*, 2001), Brasil (Conceição *et al.*, 2001; Donatele *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2007; Zanela *et al.*, 2009; Roma Junior, 2007; Lopes, 2008, Oliveira *et al.*, 2011; Werncke, 2012, entre outros).

No Brasil, o LINA tem sido objeto de estudos pela Embrapa Clima Temperado, o qual

foi constatado uma incidência elevada de LINA, como na bacia leiteira de Pelotas, com 44,1% de LINA de um total de 18.662 amostras de leite provenientes de UPL (Fischer, 2005).

Na Região Noroeste do estado (Panambi), foi realizado um levantamento com 2.396 amostras de leite de setembro de 2002 a agosto de 2003, apresentando uma incidência de LINA de 55% (Zanela, 2004).

Na região do Norte do Estado do Rio de Janeiro, Donatele *et al.* (2003) constataram que 59,6% dos quartos mamários analisados de vacas leiteiras produziram leites positivos ao teste do etanol a 72% (v/v), sem que houvesse nenhum fator conhecido determinante de acidificação.

Roma Junior *et al.* (2007) realizaram um estudo analisando 2.981 amostras provenientes dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, no período de outubro de 2005 a setembro de 2006. Os autores verificaram que 7,4% foram classificadas como LINA apresentando coagulação no teste do etanol a 78 % (v/v). O período de maior incidência foi ao início de outono (março), com queda a partir do início da primavera (setembro). Este padrão foi relacionado com a baixa qualidade das forragens entre os períodos citados.

Lopes (2008) em seus estudos na região de Casa Branca no Estado de São Paulo classificou 64,77% das amostras de leite como LINA apresentando instabilidade ao teste do etanol a 72 % (v/v) e acidez inferior a 18°D.

Oliveira *et al.*, (2011) em seu trabalho no estado de São Paulo, encontraram uma prevalência de 64% de LINA ao teste do etanol 72% (v/v). Já Werncke (2012) analisou 589 amostras provenientes de 51 unidades de produção de leite na região oeste de Santa Catarina e, constatou a incidência de 29,03% de LINA.

## 2.10 Influência do Leite Instável não Ácido na Indústria

Existe uma relação estreita entre a composição do leite e o seu rendimento industrial, a qual é atribuída à fração de caseína. O leite pode ser convertido em uma extensa variedade de diferentes e atrativos produtos, como leite fluido, queijo e iogurte, aos quais derivam das propriedades das caseínas (De Kruif *et al.*, 2012). Embora a quantidade de proteína seja importante para a indústria de lácteos, isso não é suficiente, uma vez que o fator de maior importância é a obtenção de matéria prima que resista ao processamento térmico (Roma Junior *et al.*, 2007).

Santos & Fonseca (2007) relatam que uma diminuição de 0,5% de sólidos totais ou 0,1% em proteínas pode significar uma perda de 5 toneladas de leite em pó ou 1 tonelada de queijo, respectivamente, para cada milhão de litros de leite processados.

A produção do LINA apresenta componentes genéticos e ambientais, caracterizando-se como um fenômeno multifatorial e, conseqüentemente, de difícil controle. Sendo assim, a procura de alternativas para o aproveitamento industrial deste leite, que atinge volumes consideráveis da produção total, apresenta relevância tanto científica como social. Entre as opções de utilização do LINA sobressai à produção de queijos e outros derivados lácteos. Entretanto, estudos básicos e técnicos são necessários para comprovar a viabilidade da industrialização do LINA.

Com relação à influência do LINA sobre o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos, Ponce (2000) observou deposições anormais nos pasteurizadores de indústrias, ocasionando maiores sujidades nos equipamentos de processamento térmico, ocasionando interrupções adicionais durante o processo para realização de limpezas nos trocadores de calor. Fonseca & Santos (2000) também relatam que o leite instável provoca transtornos no processo de industrialização, causando deposições anormais nos pasteurizadores e alterações

na fabricação de derivados lácteos.

Ponce (2000) também constatou alterações na fabricação de derivados lácteos (especialmente de queijos e iogurtes). As alterações foram redução no rendimento, aumento no tempo de coagulação, surgimento de características indesejáveis no coágulo, alta retenção de água, perda de proteínas no soro e baixa qualidade dos queijos. Estes resultados diferem dos obtidos por Ribeiro *et al.* (2007) e Costabel *et al.* (2009), que compararam o efeito do LINA na industrialização do iogurte batido com iogurtes fabricados com leites considerados normais. Os autores observaram que não ocorreram alterações no tempo de fermentação, pH e viscosidade do iogurte batido elaborado com LINA oriundo de vacas da raça Jersey. Tendo em vista as controvérsias sobre o assunto, Ribeiro *et al.* (2007) destacaram a falta de dados científicos na literatura, o que impossibilita concluir satisfatoriamente a respeito dos efeitos do LINA sobre os derivados lácteos.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1997, p. 119) queijo é:

“o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.”

A legislação complementa essa definição, reservando o nome queijo exclusivamente para produtos cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de outra origem.

Na Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, estudos preliminares do efeito da instabilidade do leite ao teste do etanol sobre a produção de queijo minas padrão não foi conclusiva e mostrou redução no rendimento e aumentou o tempo de

coagulação do queijo, assim como diferença na umidade e, aos 21 dias de armazenamento teve diferença na porcentagem de gordura (Barbosa *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2006).

Costabel (2009) em seu experimento utilizou leite instável não ácido ao teste do etanol 72 % (v/v) e 80 % (v/v). Não foram evidenciadas diferenças significativas nos queijos processados com LINA e leite estável, embora a retenção de proteína no coágulo fosse maior para os queijos que apresentaram instabilidade ao etanol a 72% (v/v). No entanto os queijos que apresentaram instabilidade ao etanol a 80% (v/v) apresentaram maior porcentagem de retenção de gordura e sólidos totais. Porém não foram observadas mudanças no rendimento industrial. Desse modo o LINA pode ser utilizado para processamento de produtos lácteos, já que esse leite não representa perigo de saúde pública.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das Amostras: Leite Estável e LINA**

Os animais foram selecionados a partir dos rebanhos leiteiros do Sistema de Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL) da Embrapa Clima Temperado, do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), situados em Pelotas -RS, Brasil e de uma propriedade leiteira da zona rural do município de Caxias do Sul. Para a seleção das amostras dos animais utilizou-se como critério de inclusão o teste do California Mastitis Test (CMT), sendo selecionados os quartos mamários que apresentassem reação negativa ou positiva ao teste e, como critério de exclusão as amostras positivas ao teste da caneca de fundo preto para a detecção de mastite clínica. O experimento contou com três períodos experimentais, na estação do verão (Janeiro de 2010, 2012 e 2014). Foi coletada uma amostra de 500 mL de leite da ordenha individual dos animais pela manhã. As amostras de leite foram fracionadas de forma asséptica e encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) para isolamento e identificação dos agentes etiológicos da mastite e, para o laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado, para uma bateria de testes e análises físico-químicas. Para a composição do leite e CCS os frascos continham bronopol e, para a CBT os frascos continham azidiol. Na Universidade de Caxias do Sul (UCS), as amostras de leite foram encaminhadas para o laboratório de Microbiologia Aplicada, para a realização da quantificação e caracterização eletroforética das proteínas do leite e, na Central de Ensaio e Análises, efetuou-se a determinação de cálcio total adotando o método de espectrometria de absorção atômica com chama e, para a avaliação do fósforo adotou-se o método de colorimetria. A instabilidade do leite foi avaliada pelo teste do etanol em diferentes

concentrações (68 a 80°GL - com intervalo de 2°GL), sendo considerado o nível de instabilidade do leite como a menor concentração de etanol. Foram avaliadas neste trabalho 58 vacas da raça Jersey e 130 vacas da raça Holandês.

### **3.2 Caracterização de Mastite Clínica e Subclínica.**

Para a seleção dos animais utilizou-se como critério de inclusão o teste do *California Mastitis Test* (CMT), sendo selecionados os quartos mamários que apresentassem reação negativa ou positiva ao teste e, como critério de exclusão as amostras positivas ao teste da caneca de fundo preto para a detecção de mastite clínica. Foram avaliadas 58 vacas da raça Jersey, sendo registrada a produção diária de leite dos animais.

Amostras de leite de todos os quartos mamários seguiram o seguinte critério quanto ao CMT: escore 0 (reação negativa); positivo (+ reação fracamente positiva, ++ reação positiva, +++ reação fortemente positiva). Cerca de 20 mL de amostras positivas ao CMT foram coletadas de forma asséptica, sendo realizada a desinfecção do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70°GL. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração em recipientes isotérmicos, com gelo, sendo encaminhadas para análise microbiológica ao Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os dados foram tabulados e submetidos à análise descritiva a partir dos escores positivos ao CMT escore 0, +, ++, +++ e dos resultados microbiológicos. A partir do total dos quartos mamários analisados calculou-se o percentual de mastite subclínica para o leite estável e LINA.

Para o isolamento dos microrganismos as amostras de leite foram semeadas em Ágar sangue (8% de sangue desfibrinado ovino) e em meio de ágar MacConkey, incubadas a 37 °C, e a leitura realizada 24, 48 e 72 horas. Após o crescimento das colônias foi realizada uma

bateria de testes para identificação dos patógenos: coloração de gram, catalase, oxidase, *Voges Proskauer* (VP), coagulase, acidificação de maltose, manitol e trealose (Barrow & Feltham, 1993). Os microrganismos isolados foram agrupados em quatro categorias de patógenos: contagiosos, ambientais, oportunistas e outros (Philpot & Nickerson, 2002):

a) ambientais: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Klebsiella coliformes*;

b) contagiosos: *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*;

c) oportunistas: *Staphylococcus coagulases* negativa

d) outros: fungos, algas.

Dos quartos coletados para avaliação microbiológica, foi calculada a porcentagem de quartos que não apresentaram crescimento de agentes microbianos, bem como a porcentagem de quartos positivos aos agentes microbianos.

### **3.3 Composição Físico-Química, Contagem Total de Bactérias (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS)**

Amostras contendo cerca de 100 mL de leite foram encaminhadas sob refrigeração para o Laboratório de Leite da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul (Figura 5). Foram realizadas as determinações dos teores de proteína bruta, lactose, gordura e, extrato seco total. A composição química e a contagem bacteriana foram realizadas por espectrofotometria por radiação infravermelha em equipamento Somacout, marca Bentley Instruments Inc®, seguindo o protocolo de Fonseca & Santos (2000).

A CCS foi realizada por contagem em contador eletrônico pela citometria de fluxo no equipamento Somacount 300 da Bentley Instruments, Inc® (Figura 6).



**Figura 5-** Armazenamento das amostras

Fonte: o autor (2015)



**Figura 6-**Somacount 300 da Bentley®

Fonte: o autor (2015)

### 3.4 Estabilidade ao Teste do Etanol

Para a determinação da estabilidade ao teste do etanol, volumes iguais das amostras e de solução de etanol nas concentrações 68, 70, 72, 74, 76, 78 e 80% (v/v) foram homogeneizadas durante alguns segundos e após foram vertidos para placas de Petri, a fim de identificar o início da desestabilização da micela de caseína do leite. Os resultados foram classificados numa escala de estabilidade de um a cinco, sendo explanada de acordo com o modelo usado para interpretação da coagulação da micela de caseína, segundo a metodologia adaptada de Zanela *et al.* (2006), conforme a Figura 7. Adotou-se a concentração de etanol de 72% (v/v) como a menor concentração que induziu a coagulação da micela de caseína do leite.



**Figura 7-** Subclasses de estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol de acordo com a intensidade da coagulação, classificadas como: (A) intensidade 1 (caseína estável sem coagulação); (B) intensidade 2 (coagulação fraca); (C) intensidade 3 (coagulação média); (D) intensidade 4 (coagulação intensa); (E) intensidade 5 (coagulação muito intensa).

Fonte: o autor (2015)

### **3.5 Determinação do pH**

Fundamenta-se na medida da concentração de íons hidrogênio na amostra. Utilizou-se um potenciômetro com eletrodo específico para medição de pH da marca Orion. As calibrações são realizadas com soluções ácida (pH 4,0), alcalina (pH 10,0) e neutra (pH 7,0) (Brasil, 1981). O resultado é obtido por leitura direta no aparelho.

### **3.6 Determinação da Acidez Titulável em Graus Dornic (°D)**

Adicionou-se 10 mL de leite em um erlenmeyer e acrescentaram-se três gotas de fenolftaleína a 1%. Realizou-se de imediato a titulação, contendo a solução de NaOH N/9. Cada 0,1 ml de NaOH N/9 gasto na escala do acidímetro de Dornic corresponde a 1°D (0,01% de ácido láctico) (Brasil, 1981).

### **3.7 Estabilidade Térmica**

Foram colocados 2 mL de leite em um tubo de ensaio e, com o auxílio de um bico de bunsen realizou-se a cocção da amostra de leite até levantar fervura três vezes (Brasil, 2006). Após este procedimento, a amostra fervida foi colocada em uma placa de Petri onde se verificou a presença de grumos. Quando havia a presença de grumos a amostra foi considerada positiva ao teste, do contrário, a amostra foi considerada negativa.

### **3.8 Avaliação dos Perfis Eletroforéticos de Caseínas em Leite Estável e LINA**

Neste estudo o perfil eletroforético das proteínas do LINA de vacas da raça Jersey (31 amostras de leite estável e 31 de LINA) e de vacas da raça Holandês (9 de leite estável e 9 de LINA) foram avaliados. Amostras pareadas de leite estável e de LINA obtidos do mesmo animal (10 animais) em períodos distintos também foram avaliados.

A avaliação de proteínas totais através de eletroforese foi desenvolvida em sistema desnaturante de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações. Brevemente, a separação eletroforética foi realizada em gel descontínuo, formado por um gel concentrador (1cm) contendo 4,5% de acrilamida em tampão 125mM Tris-HCl pH6,8 e um gel separador (7cm) contendo 15% de acrilamida em tampão 375mM Tris-HCl pH 8,8, ambos contendo 0,1% de SDS. Como tampão de corrida foi utilizado 100mM Tris-glicina pH 8,3. A corrida foi realizada em cuba vertical a 10°C com corrente de 50 V no gel concentrador e 100 V no gel separador. As amostras de leite foram misturadas com um volume (1:1) de “Loading Buffer 2x” (5% de 2- mercaptoetanol, 0,4% de SDS, 50mM Tris-HCl pH6,8, 0,2% de azul de bromofenol, 10% glicerol) e aquecidas a 100°C em banho Maria por 5 min. Volumes de 20µl foram aplicados nos géis.

Após a corrida, as proteínas foram fixadas e coradas com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R250 em metanol: ácido acético: água (30:7:63) durante 4 horas. A descoloração foi realizada com trocas sucessivas de metanol: ácido acético: água (30:7:63). Em todos os géis foi aplicado um padrão de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Gibco BRL, 10747-012) contendo marcadores de 10 a 220 kDa.

### **3.9 Determinação de Cálcio e Fósforo em Leite Estável e LINA**

#### **3.9.1 Pré-tratamento das Amostras**

Para a determinação de cálcio (solúvel mais o ligado à micela de caseína) e fósforo total nas amostras de LINA e leite estável, 10 mL foram alicotados e transferidos para um copo de bécker. Foram adicionados 50 mL de água tipo I, 1,5 mL de ácido nítrico concentrado P. A., seguido por aquecimento brando em chapa de aquecimento dentro da capela de fluxo, até reduzir o volume para 5 mL. As soluções digeridas foram filtradas, transferidas para balões volumétricos de 50 mL e avolumadas com solução de ácido nítrico 1 + 9 (APHA, 2012).

Para a precipitação das proteínas nas amostras de LINA e leite estável, homogeneizou-se as amostras e transferiu-se 10 mL para um copo de Becker. Utilizou-se etanol 72 % (v/v) para a precipitação da caseína em LINA e etanol 80% (v/v) para precipitação em leite estável. As proteínas do soro do leite foram calculadas por diferença. O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram secados durante uma hora em estufa a 100 °C. O precipitado foi pesado em balança analítica e calcinado em forno de mufla por 2 horas a 550 °C. A seguir, as cinzas foram dissolvidas com 1 mL de solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 1+9, transferidas para um balão volumétrico de 50 mL e avolumadas com a solução de ácido nítrico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e as soluções foram encaminhadas para os ensaios de cálcio e

fósforo (AOAC, 2007).

### **3.9.2 Determinação de Cálcio**

A determinação na amostra pré-tratada foi realizada na Central de Ensaio e Análises da Universidade de Caxias do Sul, adotando o método de espectrometria de absorção atômica com chama. Neste método, a amostra em forma de solução é aspirada e as gotículas são misturadas ao fluxo de gases combustível (acetileno) e comburentes. Esta mistura é levada para dentro de uma chama em torno de 2400 °C, chamada de atomizador, onde os íons são dessolvatados e reduzidos a átomos livres no estado vapor. Os átomos metálicos absorvem parte da radiação específica oriunda de uma lâmpada de cátodo oco, chamada de fonte de radiação. A fração da radiação absorvida é medida pelo detector e o equipamento processa a atenuação do sinal, informando como Absorvância. A relação entre a absorvância e a concentração de cálcio é linear, dentro de um intervalo de concentração, possibilitando a construção de uma curva de calibração. (APHA, 2012). Para as leituras, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama marca Varian modelo AAplus 250.

### **3.9.3 Determinação de Fósforo Total Adotando o Método de Ácido Áscórbico**

A determinação do fósforo total através do método de ácido ascórbico consiste em duas etapas: conversão das formas de fósforo presentes na amostra (fosfatos condensados e fosfatos orgânicos) em ortofosfato solúvel, seguida por desenvolvimento de cor e leitura da absorção molecular em 880 nm. No ensaio, a amostra foi submetida a um tratamento prévio, que consistiu em uma digestão ácida, para a oxidação da matéria orgânica e liberação do fósforo como ortofosfato. Na sequência, o ortofosfato solúvel reagiu com molibdato de

amônio e tartarato de antimônio e potássio, em meio ácido, produzindo o ácido fosfomolibdico. Para o desenvolvimento de cor, o ácido ascórbico atua como agente redutor, reduzindo o ácido fosfomolibdico para formar o azul de molibdênio. A intensidade da cor do azul de molibdênio é proporcional à concentração de ortofosfato total. Após no mínimo 10 min e no máximo 30 min, a absorvância foi determinada no espectrofotômetro marca Micronal modelo 8582, ajustado com um comprimento de onda igual a 880 nm.

### **3.10 Determinação da Concentração de Proteínas Totais**

A determinação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976). Para a preparação da curva de calibração foi utilizado como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As concentrações de BSA utilizadas foram 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Utilizou-se 1.000  $\mu\text{L}$  do reagente Bradford, os volumes foram ajustados para 1.200  $\mu\text{L}$ . Em seguida foi misturado em um agitador de tubos tipo *vórtex*. Depois de 5 minutos, foram realizadas as medidas de absorvâncias das proteínas em duplicata a 595 nm no espectrofotômetro. As diferentes concentrações da proteína padrão (BSA) fornecidas pelo espectrofotômetro, foram aplicadas ao programa Excel para a construção da curva de calibração e cálculo do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

### **3.11 Análises Estatísticas**

Os ensaios foram realizados por meio do delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados com um mínimo de três repetições. De acordo com os ensaios os dados foram analisados utilizando o teste *t* Student ( $p < 0.05$ ), análises de regressão, análise de correlação, análises multivariadas. As análises estatísticas foram processadas com o auxílio do programa computacional SPSS *for* Windows versão 21.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da Mastite Subclínica: Isolamento e Identificação dos Agentes Etiológicos de Mastite

Das 58 vacas em lactação da raça Jersey analisadas 39 (67%) apresentaram resultados positivos ao teste do CMT, correspondendo 24 (66,70%) para leite estável e, 15 (68,20%) para LINA. De acordo com a intensidade da reação as amostras positivas para CMT foram classificadas em escore 0 (reação negativa), +, ++ e +++ obtendo-se como resultado 12 (33,3%), 15 (41,7%), 7 (19,4%) e 2 (5,6%), para leite estável, e 7 (31,8), 11 (50%), 3 (13,6%) e, 1 (4,5%) para o LINA respectivamente.

Kolling (2012) analisou 84 quartos mamários e os resultados da reação do *California Mastitis Test* mostraram que 27,38% apresentaram reação negativa, 30,96% CMT +, 25% CMT ++ e 16,66% CMT +++. Esses resultados evidenciam maior número de amostras com reação positiva ao CMT do que aquelas encontradas no presente trabalho. Com relação ao teste do etanol, foi classificado como LINA 22 (37,93%) do total das amostras que precipitaram ao etanol 72% (v/v), destas 15 (68,20%) foram classificadas com mastite subclínica e, 7 (31,8%) foram CMT negativo. Neste trabalho constatamos que 41,02% das amostras não apresentaram crescimento microbiológico, apesar de apresentarem reação positiva ao CMT. O grande número de amostras negativas para o crescimento microbiano encontrado neste trabalho, sugere maior cautela no uso do CMT como indicativo de infecção intramamária, já que a mastite subclínica pode apresentar resultados de cultura negativos nas análises microbiológicas e, a reação inflamatória pode estar presente mesmo sem processo infeccioso na glândula, devido à lesão traumática, ou o agente microbiano pode ter sido eliminado pelo processo de auto cura (Ribeiro *et al.*, 2003).

Os resultados encontrados neste estudo são inferiores aos resultados de Donatele *et al.*

(2003) o qual estudaram 287 amostras de leite positivas ao teste do alizarol, sendo que dessas 69,34% não apresentaram nenhum tipo de crescimento microbiano.

Ribeiro *et al.*, (2011) avaliaram 154 vacas da raça Jersey e verificaram a inexistência de crescimento microbiológico em 70,56% dos 316 quartos mamários positivos ao CMT, valores superiores ao encontrado neste trabalho.

Os resultados das análises microbiológicas de amostras de leite estável e de LINA positivas ao *California Mastitis Test* (CMT) podem ser visualizados na tabela 9.

**Tabela 9-** Resultados das análises microbiológicas de amostras de leite de vacas da raça Jersey com CMT positivo.

Microrganismo	<i>California Mastitis Test</i> (CMT) positivo			
	Leite estável	LINA	Total	%
Sem crescimento	9 (23,07%)	7 (17,95%)	16	41,02
<i>Staphylococcus</i> sp. (coag+)	7 (17,95%)	3 (7,69%)	10	25,64
<i>Staphylococcus</i> sp. (coag-)	4 (10,26%)	1 (2,57%)	5	12,83
<i>Streptococcus</i> sp.	0 (0%)	2 (5,12%)	2	5,12
<i>Corynebacterium</i> sp.	1 (2,57%)	0 (0%)	1	2,57
<i>Staphylococcus</i> sp. (coag-)	3 (7,70%)	0 (0%)	3	7,70
+ <i>Streptococcus</i> sp.				
<i>Staphylococcus</i> sp. (coag+)	1 (2,56%)	1 (2,56%)	2	5,12
+ <i>Staphylococcus</i> sp. (coag -)				
<b>Total Geral</b>			39	100

Houve maior prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus coagulase* positiva (17,95%) entre os microrganismos isolados para o leite estável e, (7,69%) para o LINA, seguido por bactérias do gênero *Staphylococcus coagulase* negativa (10,26%) para leite estável e, (2,57%) para leite instável não ácido, considerando o total de amostras positivas ao teste do

CMT. Destaca-se que mesmo ocorrendo reação positiva em diversos graus no teste do CMT, um elevado percentual (41,02%) de amostras de leite não apresentou crescimento bacteriano. Os resultados encontrados por Kolling (2012) divergem dos nossos estudos, a maior prevalência que esse autor encontrou foi de bactérias do gênero *Corynebacterium* sp. (27,38%), seguidos por microrganismos do gênero *Staphylococcus coagulase* negativa (13,10%). Já Martins *et al.* (2010) avaliaram 108 vacas no estado do Mato Grosso e, encontraram a maior prevalência de bactérias do gênero *Corynebacterium* sp. (27,6%), concordando com os dados de Kolling (2012), discordando com os dados desse trabalho.

Os resultados sugerem que a mastite subclínica não é um fator determinante da instabilidade não ácida do leite. Não constatamos relação dos microrganismos encontrados com a instabilidade do leite, corroborando Zanela *et al.* (2009) e Donatele *et al.* (2003) o qual não encontraram envolvimento de bactérias na causa da instabilidade do leite ao teste do alizarol 72%. As demais amostras apresentaram *Staphylococcus coagulase* positiva (17,8%) e *Staphylococcus coagulase* negativa (12,86%), esses percentuais são superiores aos detectados no presente trabalho.

Quanto às amostras de leite com resultados positivos ao teste do CMT 39 (67%) dos quartos mamários de 58 vacas da raça Jersey examinadas (58,98%) apresentaram crescimento microbiano. Em relação ao agrupamento dos agentes microbianos em oportunistas, contagiosos e ambientais, identificou-se 17,95 %, 30,77% e 10,25% respectivamente. Os resultados são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10-** Resultados das análises microbiológicas de amostras de leite de vacas da raça Jersey com CMT positivo agrupadas segundo a categoria de patógeno

<b>Amostras positivas ao CMT</b>	<b>Crescimento Microbiano</b>	<b>Agentes Oportunistas</b>	<b>Agentes Contagiosos</b>	<b>Agentes Ambientais</b>
39	23 (58,97%)	7 (17,95%)	12 (30,77%)	4 (10,25%)

#### **4.2 Características Físico-Químicas, Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total do Leite Estável e LINA de Vacas da Raça Jersey e Holandês.**

Os resultados das médias das características físico-químicas, CCS e CBT em leite estável e LINA oriundos de vacas das raças Jersey e Holandês são apresentados na Tabela 11. Conforme pode ser observado, tanto as amostras de leite estável quanto às de LINA apresentaram composição e características físico-químicas dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (MAPA 2011).

Os resultados (Tabela 11) não permitiram evidenciar diferenças estatísticas significativas entre as amostras de leite estável e LINA nas duas raças avaliadas para os parâmetros: acidez titulável (°D), pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CBT.

Marques (2004) encontrou resultados divergentes a este estudo, mostrando maior teor de gordura e menores teores de proteína e lactose em LINA. Cabe ressaltar que apesar de não apresentarem diferenças significativas, no presente trabalho observou-se uma tendência ( $P < 0,05$ ) de aumento da quantidade de gordura e redução da concentração de lactose em LINA (Tabela 11). A aparente discordância com o trabalho de Marques (2004) pode ser atribuída ao elevado número de amostras analisadas por este autor (1300 amostras).

Em relação a CCS observou-se diferença significativa para o leite estável das vacas da raça Jersey, que foram superiores aos dados encontrados para o LINA, mostrando a ausência

de relação com a mastite subclínica.

**Tabela 11-** Média e desvio padrão das características de composição físico-química, CCS, CBT, período de lactação e produção de leite/dia em Leite estável e LINA comparadas dentro de cada raça Jersey e Holandês

Características	Jersey / LINA	Jersey/Leite Estável	Holandês/ LINA	Holandês/Leite Estável
Número de amostras	22	36	10	22
Teste ao etanol (72°C)	instável	estável	instável	estável
Acidez Dornic (°D)	15,86±0,35	15,28±0,41	15,00±0,44	15,60±0,49
pH	6,82±0,02	6,81±0,02	6,75±0,01	6,77±0,01
Gordura	4,81±0,24 <sup>#</sup>	4,49±0,57 <sup>#</sup>	3,35±0,15	3,19±0,10
Proteína	3,59±0,10 <sup>#</sup>	3,78±0,10 <sup>#</sup>	3,16±0,10	2,94±0,04
Lactose	4,23b±0,05	4,42±0,11	4,36±0,06	4,78±0,04
Sólidos Totais	13,71±0,37	13,78±0,59	11,68±0,27	11,45±0,15
CCS (cel/mL x 10 <sup>3</sup> )	350,26±90,15	359,85±107,08	270,10±60,03	258,30±0,36
CBT (Log)	4,41±0,14	4,72±0,34	4,37±0,18	5,19±0,98
Dias/Lactação	291,60±33,88*	185,78±40,99	337,80±43,17*	220,30±11,77
Produção/Dia/L	9,70±33,88	11,72±11,72	14,02±0,77	13,60±0,44

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t* entre tipos de leite dentro de cada raça.

# Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t* entre raças independente do tipo de leite.

Zanela *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2011) encontraram porcentagens menores de proteína bruta para o LINA em relação ao leite estável, enquanto Barros (2001) verificou resultado contrário, mostrando ampla divergência neste componente do leite. De um modo geral, ausência de diferenças significativas corroboram os trabalhos previamente realizados (Negri *et al.*, 2001; Fruscalso, 2008; Abreu, 2008;; Lopes, 2008; Barbosa, 2010; Machado, 2010; Marx, 2011; Wernecke, 2012).

Visando verificar se a ausência de variação no conteúdo proteico não era apenas metodológica, nove amostras de leite estável e nove de LINA de vacas Jersey foram avaliados utilizando o método de Bradford. Os resultados obtidos foram compatíveis com os encontrados por espectrofotometria por radiação infravermelha e confirmaram a ausência de

variação significativa entre os dois tipos de leite.

#### **4.3 Relação da Produção de Leite e Período de Lactação em Leite Estável e LINA de Vacas da Raça Jersey e Holandês.**

O leite estável foi oriundo de vacas com menor número de dias de lactação do que o LINA para ambas raças estudadas (Tabela 11). Cabe ressaltar que todas as amostras avaliadas corresponderam a animais em período avançado de lactação. Relação entre período de lactação e LINA foi encontrada por Barros *et al.* (2000), que identificaram maior prevalência de LINA em animais com período de lactação acima de 200 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 11) não mostraram diferenças significativas de produção entre animais com leite estável e LINA, e uma tendência de maior produção em animais da raça Holandês, quando comparada a raça Jersey. No entanto, acréscimos na produção são acompanhados por decréscimos na concentração de gordura e proteína do leite, assim como os teores de gordura e proteína são maiores no início e final da lactação e menores no pico de produção (Hurley, 2006).

Stumpf Jr. *et al.* (2000) relatam que a produção de leite representa a resposta da vaca leiteira à alimentação adequada e ao manejo racional dos recursos forrageiros disponíveis, sendo esses fatores primordiais para a rentabilidade de um sistema de produção de leite.

A produção leiteira dos animais da raça Jersey encontrada neste trabalho, pode ser explicada pela magnitude de dietas deficientes, alteração do equilíbrio entre nutrientes, estágio de lactação, potencial produtivo, entre outros.

Fischer *et al.* (2012) detectaram redução média de 35,6% na produção de leite dos animais, durante restrição alimentar, confirmando a relação da dieta com a produção leiteira. Por outro lado, as suplementações de dietas, deficientes em energia e proteína, promoveram aumento da produção leiteira, da concentração de sólidos e da estabilidade da caseína.

Barbosa (2011) realizou um experimento com três tratamentos: controle (sem atender as necessidades nutricionais dos animais), 100% de atendimento das exigências energéticas e 100% de atendimento das exigências energético-protéicas, usando 12 vacas da raça Jersey e Holandês, no primeiro e segundo estágio de lactação. Verificou que as dietas ajustadas foram suficientes para reverter o quadro de LINA e, causar influência na produção do leite.

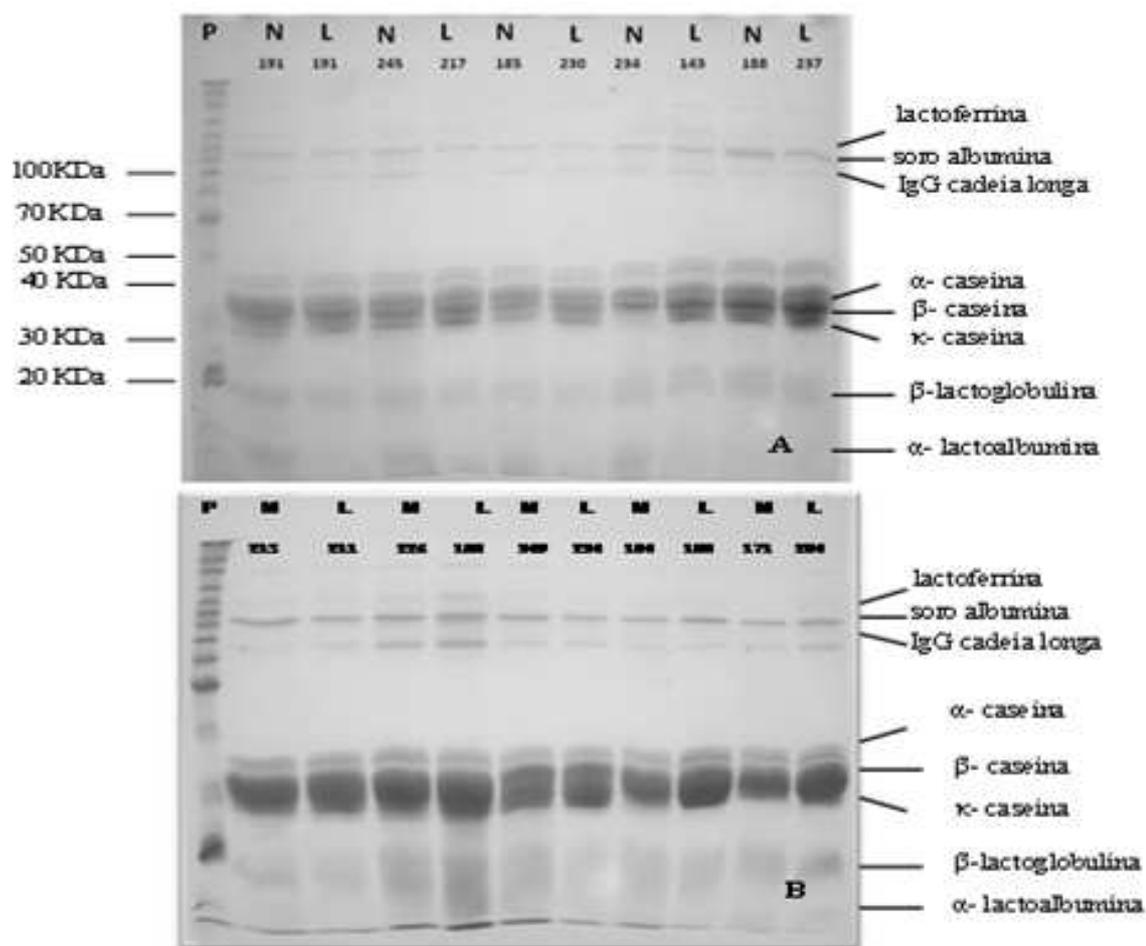
#### **4.4 Avaliação do Perfil Eletroforético das Caseínas de Leite Estável e LINA**

O uso da metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida na área de laticínios vem sendo utilizadas com bastante sucesso, conforme pode-se constatar em trabalhos publicados por Egito *et al.* (2001; 2002; 2006; 2007).

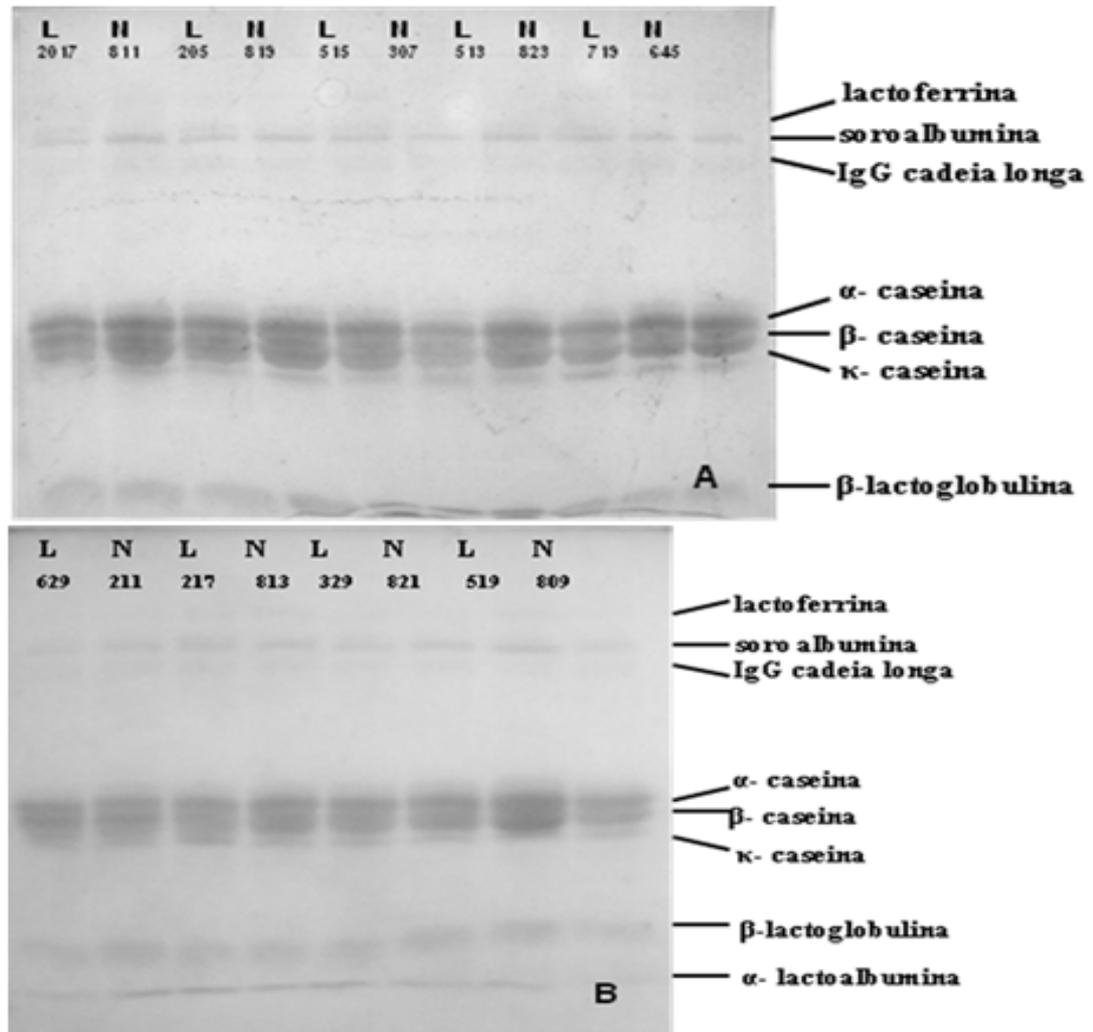
Os perfis representativos das proteínas de leite de amostras de vacas da raça Jersey e de raça Holandês são apresentados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. A análise eletroforética permitiu visualizar as distintas proteínas do leite, mas não foram evidenciadas diferenças qualitativas ou quantitativas consistentes na comparação entre leite estável e LINA. Mesmo amostras pareadas (leite estável e LINA) obtido do mesmo animal (10 animais) em períodos distintos não exibiram diferenças consistentes.

Concordando com este estudo, Lopez *et al.* (2008) analisou as frações de caseína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e verificou que o cromatograma de uma amostra de LINA não apresenta diferenças nos picos das frações de caseína quando comparado com os cromatogramas apresentados por amostras estáveis ou pela amostra padrão. Botaro *et al.* (2007, 2009) não observaram diferenças entre o leite instável e estável quanto ao polimorfismo da  $\beta$ -lactoglobulina e da  $\kappa$ -caseína. Oliveira *et al.* (2013) analisaram 77 amostras de leite quanto as frações proteicas e não foram encontradas diferenças nos percentuais de  $\alpha$  e  $\beta$  caseínas dos leites estáveis e instáveis. Por outro lado, Barros (2001)

constatou em seus estudos que o LINA apresenta diferença nas frações proteicas em relação ao leite estável, e Barbosa *et al.* (2012) encontrou nas amostras de LINA menor concentração de  $\kappa$ -caseína e maiores concentrações de  $\beta$ -caseína.



**Figura 8-** Perfil eletroforético das frações proteicas de amostras individuais de leite estável (N) e LINA (L) de vacas da raça Jersey.



**Figura 9-** Perfil eletroforético das frações proteicas de amostras de leite estável (N) e LINA (L) de vacas da raça Holandês.

## **CAPÍTULO I**

### **MUDANÇA DE MECANISMO DO ETANOL NA INSTABILIDADE DA CASEÍNA EM LEITE BOVINO**

## MUDANÇA DE MECANISMO DO ETANOL NA INSTABILIDADE DA CASEÍNA EM LEITE BOVINO

Lelis A Petrini\*<sup>1</sup>, Luciana B Andrade <sup>1</sup>, Anna C S Arruda<sup>2</sup>, Sergio L Echeverrigaray<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, Brasil

\* e-mail: [lapetrini@ucs.br](mailto:lapetrini@ucs.br). Brasil; Estado: Rio Grande do Sul; Cidade: Caxias do Sul; Endereço: Sático Antunes Padilha, 671.

### Resumo

Nos últimos anos, tem se observado a positividade de leites não ácidos (LINA) ao teste do etanol. Neste trabalho foi estudada a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol utilizando leite estável, acidificado e leite instável não ácido (LINA), na busca de informações sobre os fenômenos envolvidos no mecanismo de instabilidade da micela de caseína frente à adição de etanol. Determinaram-se pH, acidez titulável, estabilidade ao etanol e estabilidade térmica. O perfil da curva sigmoidal encontrada tanto para acidez titulável e estabilidade ao etanol pode estar relacionada à mudança de mecanismo do etanol, devido ao seu caráter anfotérico. O etanol em leite ácido pode estar atuando de forma semelhante ao cálcio, uma vez que se encontra como  $\text{ROH}_2^+$ . Por outro lado, em pH mais alto, o íon dissociado  $\text{RO}^-$  contribui com a carga negativa da proteína, aumentando a instabilidade do leite. Neste sentido, pode-se sugerir que o etanol exerce influência significativa no comportamento do leite em relação à desestabilização da micela de caseína nos testes de acidez titulável e estabilidade ao etanol. O leite estável e o LINA apresentaram comportamentos semelhantes

nos testes realizados. Contudo, a instabilidade do LINA e do leite ácido é evidenciada na realização dos testes de estabilidade térmica juntamente com a estabilidade ao etanol, devido à potencialização dos mecanismos que levam à instabilidade da caseína. Com relação à proteína, a histidina apresenta valor de  $pK_R$  igual a 6,0, próximo ao pH do leite e pode estar atuando como principal responsável pelo seu tamponamento. O teste do etanol tem se mostrado eficiente para avaliar a estabilidade da micela de caseína por alterar simultaneamente propriedades térmicas, físicas e químicas, porém pode ser considerado muito rigoroso quando aplicado ao LINA, uma vez que várias reações podem ocorrer independentemente ou de forma inter-relacionadas, levando à sua desestabilização.

**Palavras-chave:** Teste de etanol; Leite instável não ácido; micela de caseína; fosfato de cálcio; cálcio iônico.

## **1. Introdução**

O teste do etanol é comumente utilizado pela indústria láctea para avaliar a qualidade do leite. Esse teste tem sido utilizado em vários países, entre os quais o Brasil, como método rápido e barato para determinar a estabilidade física do leite. O resultado deste teste define seu aceite ou rejeição pela indústria no momento da coleta nas propriedades rurais no Brasil e nos países da América Latina.

Atualmente a graduação mínima obrigatória é de 72% (v/v), estabelecido pela legislação vigente (Brasil, 2002). Graduações mais elevadas tem sido utilizada (Silva et al. 2012), na expectativa de selecionar leite de melhor estabilidade térmica, quando submetidos ao processo UHT (Chavez et al. 2004; Backes et al. 2012;). Desde a década de 1920, tem se observado com certa frequência à positividade de leites não ácidos ao teste do etanol sem, entretanto, haver acidez elevada, isto é, acima de 18°D (Zanela et al. 2009; Stumpf, 2012). Esse tipo de leite, denominado de leite instável não ácido (LINA), se caracteriza por apresentar proteína instável sem acidez adquirida, diminuição do teor de caseína e aumento da concentração de íons cálcio (Oliveira & Timm, 2007).

O LINA está principalmente relacionado ao manejo nutricional inadequado em épocas de carência alimentar ou dietas deficitárias (Oliveira & Timm, 2007). Este tipo de leite, com baixas contagens bacterianas e de células somáticas, apresenta resultado positivo ao teste do etanol e tem levado a rejeição de leite com boa qualidade (Donatele et al. 2003; Backes et al. 2012; Fischer et al. 2012, acarretando perdas econômicas ao produtor e para a indústria de laticínios. Resultados positivos ao teste do etanol em LINA tem sido relatado em vários países tais como Irã (Sobhani et al. 1998), Uruguai (Barros et al. 2000), Argentina (Negri, 2002),

Cuba (Ponce Ceballo & Hernandez, 2001) e Brasil (Zanela et al. 2009 e Fischer et al. 2012). A União Europeia, bem como os Estados Unidos, abandonaram o teste do etanol e investiram na melhoria do manejo da cadeia produtiva do leite.

A estabilidade do leite é mantida pelas proteínas lácteas em equilíbrio com o fosfato de cálcio coloidal, formando estruturas denominadas micelas de caseína. A molécula de caseína possui grupos fosfatos covalentes que estão envolvidos na ligação com o cálcio. Após a caseína ser fosforilada, o cálcio se liga ao fosfato para iniciar a polimerização das partículas de micela. Esta estrutura (caseína – PO<sub>4</sub> - Ca<sup>2+</sup> - PO<sub>4</sub> – caseína) é chamada de micela em formação (Tronco, 1997). A atividade anfipática da caseína é dada por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo os filamentos da  $\kappa$ -caseína na superfície da micela os responsáveis por sua estabilidade estérica (Holt & Horne, 1996; Walstra, 1990).

Vários fatores afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína, resultando na coalescência. Os principais são: acidez, temperatura, concentração de íons Ca<sup>2+</sup> e hidrólise enzimática.

A acidez titulável do leite, expressa em graus dornic (°D), está relacionada a altas contagens de bactérias lácticas, as quais atuam intensamente pela fermentação da lactose, produzindo ácido láctico. O aumento da concentração de ácido láctico contribui para a produção de íon hidrogênio, o qual neutraliza as cargas negativas das micelas, promovendo a coagulação.

O tratamento térmico altera o ambiente em torno da micela de caseína, devido a alterações no equilíbrio de dissociação dos ácidos e do fosfato de cálcio. Com o resfriamento, a solubilidade do fosfato de cálcio micelar aumenta, migrando para a fração solúvel, promovendo a quebra das ligações mediadas pelo fosfato de cálcio. Como consequência, ocorre a hidratação da  $\kappa$ -caseína e liberação da  $\beta$ -caseína para a fração solúvel, desestabilizando a conformação estérica da  $\kappa$ -caseína. O aumento da temperatura também

promove modificação na estabilização estérica da micela, devido ao decréscimo da solubilidade do fosfato de cálcio. Nesta situação, o sal promove a migração deste para dentro da micela, podendo ocorrer formação de cristais de fosfato de  $\beta$ -tricálcio ou hidroxiapatita (Gaucheron, 2005). A quebra das ligações permite a migração da  $\kappa$ -caseína para a fase solúvel, na qual se encontra a  $\beta$ -lactoglobulina, formando ligações intermoleculares de dissulfeto do tipo –SH/SS, bem como interações hidrofóbicas, resultando na desnaturação das proteínas do soro ( $\beta$ -lactoglobulina/ $\alpha$ -lactoalbumina).

A distribuição dos sais entre a fase solúvel e a fase micelar é importante na estabilidade da micela de caseína onde o fosfato de cálcio e o citrato de cálcio são considerados como os principais responsáveis por este equilíbrio. O aumento da concentração de íons cálcio promove modificações do balanço salino do leite, alterando a força iônica do mesmo. Como os íons cálcio são preferentemente atraídos pelos grupos carregados negativamente da proteína, por ser um íon comum, pode diminuir a repulsão eletrostática entre as micelas e promover a auto-associação. O efeito da adição de íons cálcio também pode estar associado ao efeito *salting out* (Oliveira & Timm, 2007), uma vez que a solubilidade das micelas de proteína diminui. Esta observação está relacionada à forte interação de cargas entre o excesso de íons cálcio e o solvente água, desidratando a micela e promovendo a sua agregação (Sgarbieri, 2005).

A hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína pode ser promovida pela adição de enzima renina ou quimosina, enzimas proteolíticas dos lisossomos das células somáticas em leite mastítico, ou proteólise resultante das bactérias psicrotólicas no leite (Fox et al., 2000).

Neste trabalho foi estudada a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol em diferentes concentrações etanólicas, utilizando três tipos de leite (estável, acidificado e LINA), com o objetivo de buscar informações que contribuam para o entendimento dos fenômenos envolvidos no mecanismo de instabilidade da micela de caseína frente à adição de

etanol.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Análises de Amostras de Leite**

Foram selecionadas sete amostras de LINA e, o mesmo número de amostras de leite estável, da ordenha individual de 98 vacas da raça Holandês em Caxias do Sul, RS/Brasil. As amostras foram padronizadas em volumes iguais, para serem utilizadas nos ensaios. Realizaram-se as seguintes determinações: pH, acidez titulável, teste do etanol e avaliação do tempo de estabilidade térmica. Todas as avaliações foram realizadas em leite estável com pH 6,8 e 6,5, LINA com pH 6,6 e, leite acidificado com pH 6,3 e pH 6,0.

### **2.2 Determinação do pH**

Utilizou-se peagâmetro devidamente calibrado com eletrodo específico para medição de pH da marca Orion 2012® (Brasil, 1981).

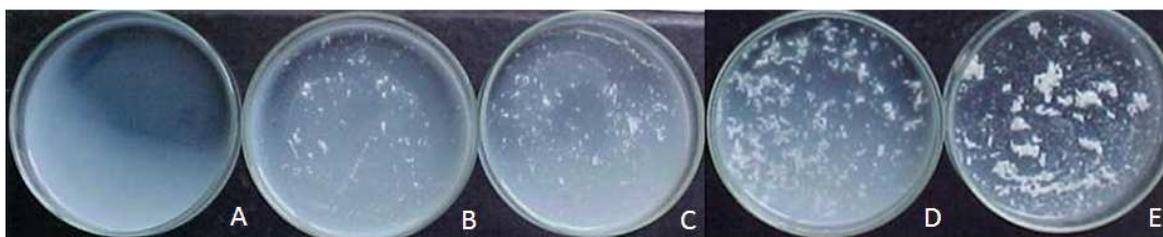
### **2.3 Determinação da Acidez Titulável em Graus Dornic (°D)**

Utilizou-se acidímetro de Dornic (°D) (Brasil, 1981).

### **2.4 Estabilidade ao Etanol de Leite Normal, Acidificado e LINA**

Para a determinação da estabilidade ao etanol do leite, em diferentes valores de pH, foram utilizadas amostras de LINA com pH 6,6, leite estável com pH 6,8 e 6,5 e, ajustadas com HCl 0,1 mol/L a pH 6,3 e 6,0. Volumes iguais da amostra e de solução de etanol nas concentrações 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 72, 75, 78 e 80% (v/v) foram homogeneizadas durante alguns segundos, e após foram vertidos para placas de petri, a fim de

identificar o início da desestabilização da micela de caseína do leite. Os resultados foram classificados numa escala de estabilidade de um a cinco, segundo a metodologia adaptada de Zanela *et al.* (2006), sendo explanada de acordo com o modelo usado para interpretação da coagulação da micela de caseína, conforme a Figura 1.



**Figura 1.** Subclasses de estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol de acordo com a intensidade de coagulação, classificadas como: (A) intensidade 1 (caseína estável sem coagulação); (B) intensidade 2 (coagulação fraca); (C) intensidade 3 (coagulação média); (D) intensidade 4 (coagulação intensa); (E) intensidade 5 (coagulação muito intensa).

### 2.5 Interação pH, Etanol e Temperatura na Estabilidade do Leite.

Volumes iguais da amostra e de etanol nas concentrações 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 68, 70, 72, 75, 78 e 80% (v/v), foram colocados em banho Maria a 100°C (CT-248 Cientec®) durante 100 minutos. Foi acompanhado o tempo necessário para iniciar a geleificação, a separação do leite em duas fases (solúvel e coloidal) e a intensidade da coagulação, classificada em graus I, II e III de firmeza do coágulo. O autor (2015).

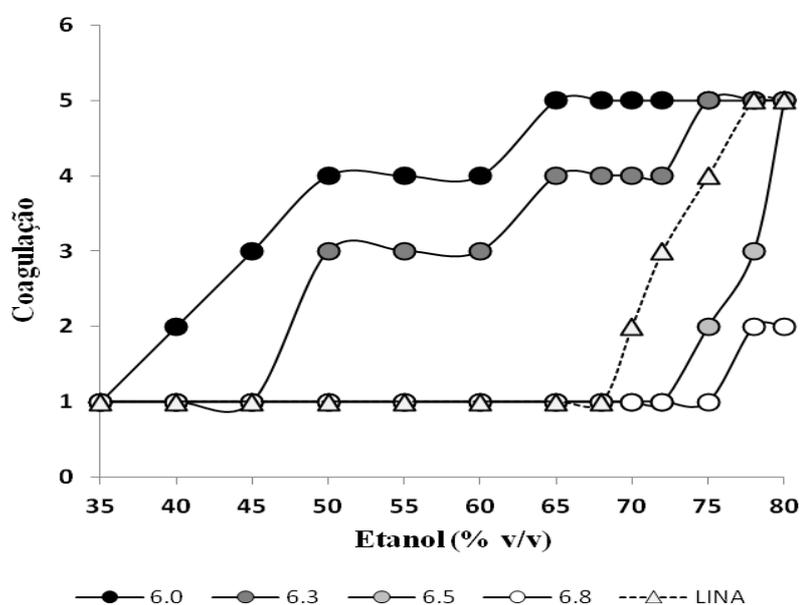
## 3. Resultados

Entre os testes utilizados para avaliar a qualidade do leite, os principais são: acidez titulável em graus dornic (°D), estabilidade ao etanol e estabilidade térmica. Neste trabalho, estes testes foram realizados em diferentes concentrações de etanol, para obter informações a

respeito do comportamento nos três tipos de leite (ácido, LINA e estável). Serão abordados cinco fatores que estão relacionados à estabilidade da micela de caseína em leite bovino frente ao etanol: acidez, temperatura, precipitação do fosfato de cálcio coloidal, desequilíbrio eletrostático e colapso da  $\kappa$ -caseína por ação desidratante ao etanol ou a hidrólise enzimática.

### 3.1 Intensidade de Coagulação da Caseína em Relação à Estabilidade ao Etanol

Geralmente a estabilidade ao etanol é definida como a concentração mínima da solução de etanol necessária para induzir a precipitação quando adicionado no leite (Horne, 1987). Neste trabalho foram definidos níveis de agregação da micela de caseína de acordo com a Figura 1, com o objetivo de estabelecer critérios que permitam comparar as diferentes intensidades de coagulação de acordo com o teor de etanol. Os resultados da intensidade de coagulação da micela de caseína em relação ao etanol em leite estável, ácido e LINA, podem ser visualizados através da Figura 2.



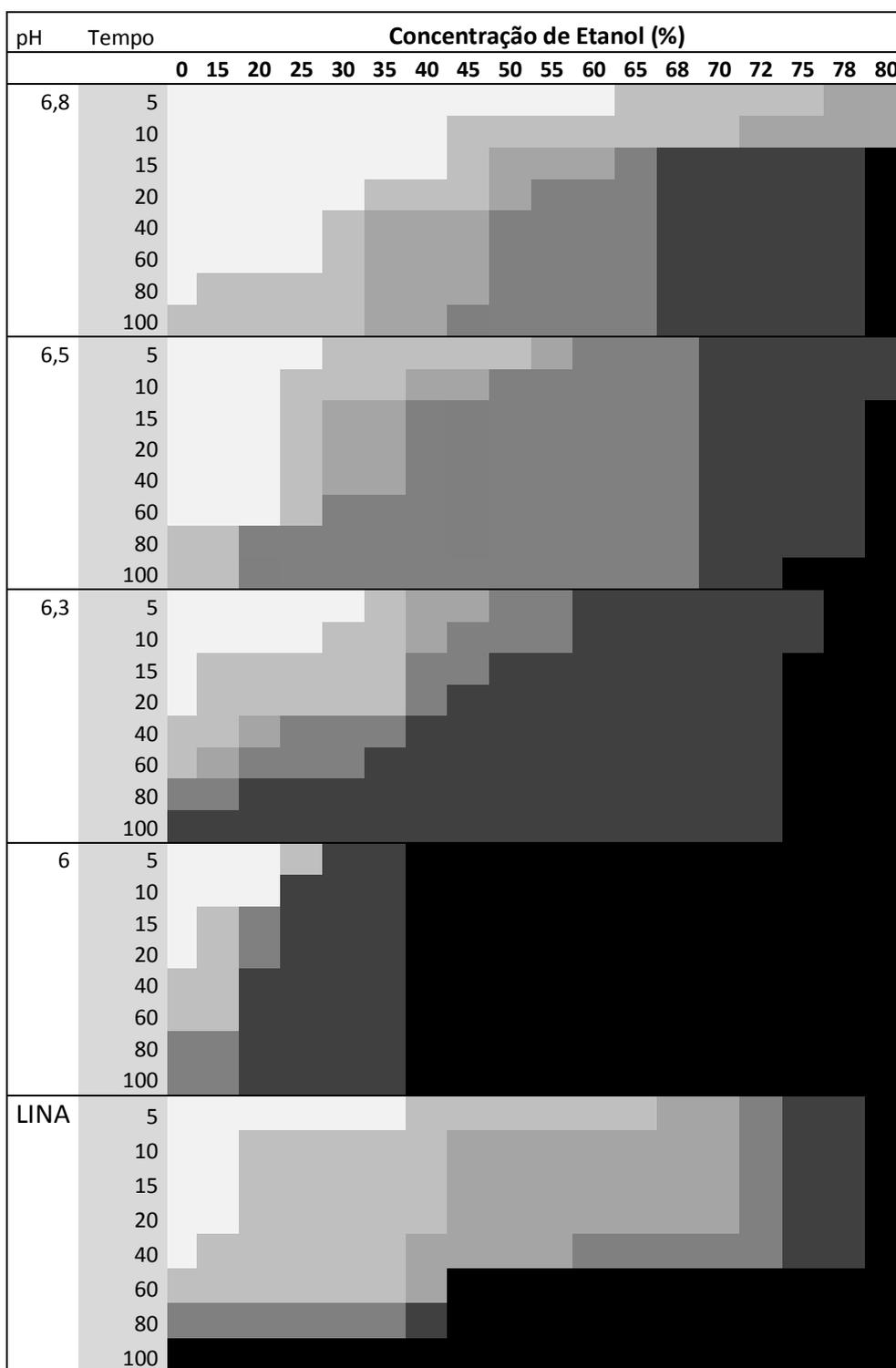
**Figura 2.** Classificação em subclasses de estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol dos leites estável, acidificado e LINA

Para o leite estável com pH 6,8 a desestabilização da caseína iniciou quando foi adicionado etanol a 78% (v/v), mantendo-se o grau de intensidade 2 para a concentração subsequente. Em uma concentração de 65% (v/v) de etanol observa-se o início de geleificação para o LINA e, esse tipo de leite segue o mesmo comportamento do leite estável em relação ao grau de intensidade 2 de início da precipitação, porém com etanol a 70% (v/v). As subsequentes adições de etanol aumentaram a intensidade de coagulação para 3 até 5. No leite com pH 6,5 a desestabilização iniciou com adição de etanol a 75% (v/v), com grau de intensidade 2. À medida que foi adicionado etanol em concentrações de 78 e 80% (v/v) o processo de desestabilização foi acentuado, passando para o grau de intensidade 3 e 5 respectivamente, que é a coagulação completa da micela de caseína. O leite acidificado com pH 6,3 iniciou a desestabilização em grau de intensidade 3 com 50% (v/v) de etanol e manteve-se até 60% (v/v) etanol. O grau 4 foi observado para 65 a 72 % (v/v) de etanol e grau 5 para 75 a 80% (v/v) de etanol. Para o leite acidificado com pH 6,0 com concentrações etanólicas de 40 e 45% (v/v) de etanol obteve-se graus de coagulação 2 e 3 respectivamente. Para adição de etanol a 60% (v/v) o grau é 4 e adicionando-se mais solvente a solução em concentrações de 65 a 80% (v/v), ocorreu a intensidade máxima de coagulação da proteína. Os resultados mostram que o leite estável apresentou uma maior resistência à coagulação induzida pelo solvente, quando comparado com o LINA e o leite acidificado.

### **3.2 Desestabilização térmica da caseína em distintas concentrações de etanol**

A estabilidade térmica é o tempo necessário para ocorrer à coagulação em condições de temperatura padrão, usualmente 140 °C (Horne & Muir, 1990). Neste trabalho acompanhou-se o comportamento dos três tipos de leite em relação à estabilidade térmica á 100 °C em diferentes tempos e concentrações de etanol, de acordo com a Figura 3. O objetivo desse experimento foi verificar como os testes de estabilidade térmica e ao etanol contribuem

simultaneamente para a desestabilização de diferentes tipos de leite. Comparando os dados nos primeiros cinco minutos, pode-se verificar que o leite estável (pH6,8) possui maior resistência em relação aos demais, sendo que necessitou de 23% a menos de etanol (60% v/v) para desestabilizar quando comparado com o resultado encontrado para a estabilidade ao etanol (78% v/v). A instabilidade do LINA foi potencializada pelos dois efeitos, sendo necessários 50% a menos de etanol (35% v/v) para evidenciar a desestabilização no teste anterior (70% v/v) de etanol. Resultados semelhantes foram encontrados para os leites acidificados.

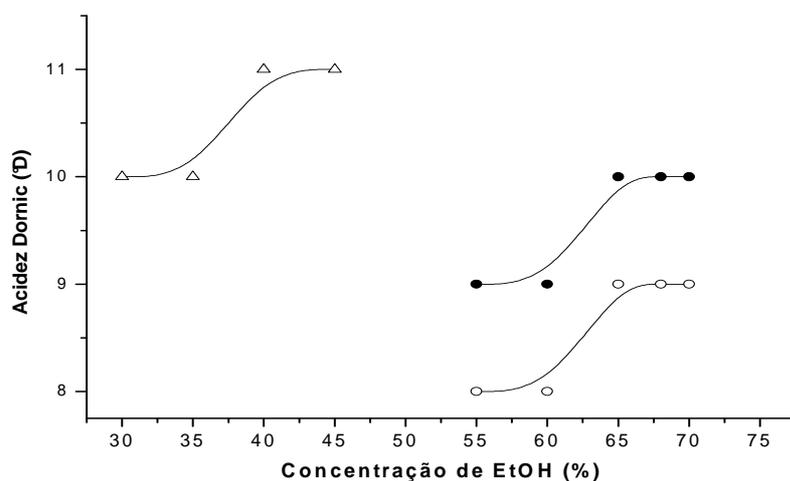


**Figura 3.** Interação pH, tratamento térmico e concentração de etanol na estabilidade de leite.

Intensidade de coagulação: □ sem coagulação; □ geleificação; □ separação do soro;  
 ■ coagulação grau I; ■ coagulação grau II; ■ coagulação grau III.

### Interação Acidez, Etanol e pH na Estabilidade do Leite

Os resultados da avaliação da acidez em relação a diferentes concentrações etanólicas em leite estável (pH 6,8 e 6,5), e LINA (pH 6,6) mostram uma típica curva sigmoidal, característica para mudança de declividade de acordo com a Figura 4.



**Figura 4.** Acidez em graus Dornic (°D) em diferentes concentrações de etanol em leite bovino. Nota: LINA (○), leite estável com pH 6,8 (●), leite estável com pH 6,5 (Δ).

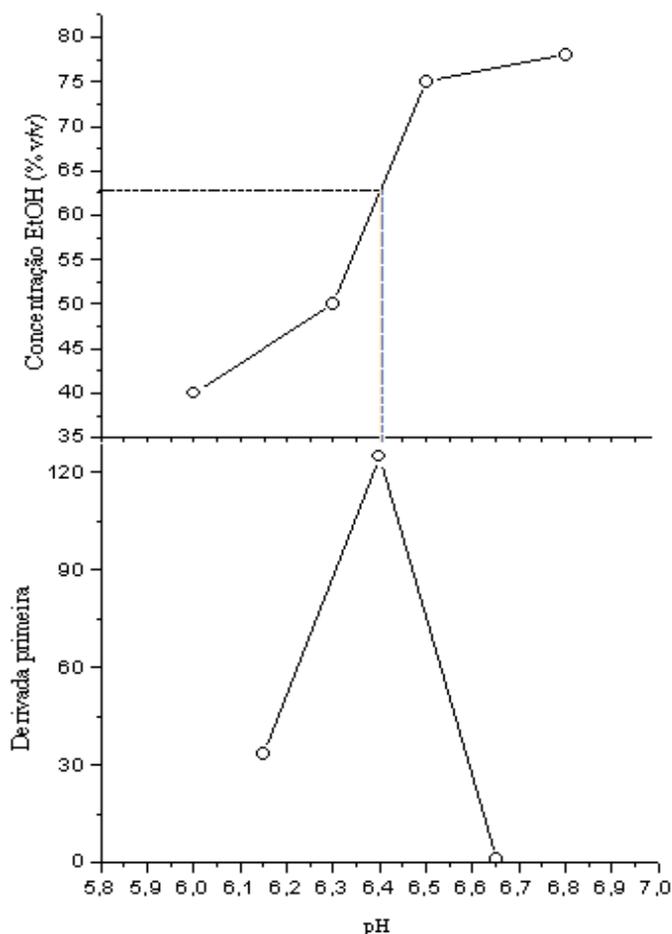
Observa-se uma transição entre os dois níveis, ocorrendo em um estreito intervalo de acidez dornic, indicando a região onde deve estar ocorrendo algum tipo de alteração relacionada à acidez do meio. A mudança de comportamento pode estar relacionada à mudança de mecanismo, que ocorre com o incremento do etanol, isto é, o meio aquoso passa para etanólico, bem como ao caráter anfotérico do etanol. O etanol atua como base em pH baixo, formando alcoóis protonados  $R - OH_2^+$  e em valores mais elevados de pH, pode atuar como ácido, perdendo  $H^+$  formando íon alcóxido  $RO^-$ . Para leite estável em pH 6,8 a acidez aferida foi de 18°D. A adição de etanol 15% (v/v) reduziu a acidez dornic para a metade (9°D) e manteve até 60% (v/v) de etanol, indicando que até esta faixa de concentração o etanol pode estar se comportando como uma base. A partir de 65% (v/v) de etanol a acidez dornic

aumentou (10°D), confirmando uma mudança de comportamento, onde o etanol pode estar se comportando como um ácido (Figura 4 e Tabela 1).

**Tabela 1.** Interação acidez, etanol e pH na estabilidade do leite estável com pH 6,8; 6,5 e leite acidificado com pH 6,3; 6,0 e LINA

Concentração de Etanol v/v (%)	Leite Estável 6,8		Leite Ácido 6,5		Leite Ácido 6,3		Leite Ácido 6,0		LINA 6,6	
	Acidez°D	pH	Acidez°D	pH	Acidez°D	pH	Acidez°D	pH	Acidez°D	pH
0	18	6,8	18	6,5	19	6,3	24	6,0	17	6,6
15	9	6,7	10	6,5	11	6,6	15	6,2	8	6,6
20	9	6,7	10	6,5	11	6,5	14	6,1	8	6,6
25	9	6,7	10	6,5	11	6,5	13	6,1	8	6,6
30	9	6,7	10	6,5	11	6,5	13	6,1	8	6,7
35	9	6,6	10	6,5	11	6,5	12	6,1	8	6,7
40	9	6,6	11	6,5	11	6,5	11	6,1	8	6,7
45	9	6,6	11	6,4	11	6,5	9	6,1	8	6,6
50	9	6,6	11	6,4	11	6,4	9	6,1	8	6,6
55	9	6,6	11	6,4	11	6,4	9	6,1	8	6,6
60	9	6,6	11	6,4	11	6,4	9	6,1	8	6,6
65	10	6,5	11	6,4	10	6,4	9	6,0	9	6,6
68	10	6,5	11	6,3	10	6,4	9	6,0	9	6,6
70	10	6,5	11	6,3	10	6,4	9	6,0	9	6,7
72	10	6,5	11	6,3	10	6,3	9	6,0	10	6,7
75	10	6,5	11	6,3	10	6,4	9	6,0	10	6,7
78	10	6,5	11	6,3	10	6,5	9	6,0	10	6,7
80	10	6,5	11	6,3	10	6,5	9	6,0	10	6,7

Para evidenciar o ponto de inflexão que caracteriza a mudança de comportamento na curva sigmoideal, foi sobreposta a curva de estabilidade ao etanol em função do pH (Figura 5A) com o ponto máximo da curva da derivada primeira ( $\Delta$  concentração de EtOH/ $\Delta$  pH), (Figura 5 B). Pode-se observar que a estabilidade mínima ficou em pH abaixo de 6,3 e máxima em pH acima de 6,5 e, apresenta uma transição entre os dois níveis, ocorrendo em um estreito intervalo de pH, indicando a região onde ocorre a mudança de comportamento do etanol. O ponto no qual ocorre a mudança de comportamento é considerado onde a inclinação da curva é máxima, isto é, em aproximadamente 62 % (v/v) de etanol.



**Figura 5.** Curva de estabilidade ao etanol em função do pH em leite estável com pH 6,8 e 6,5, leite acidificado com pH 6,0 e 6,3

Notas: (A) Perfil da curva sigmoidal indicando a transição entre os dois níveis de pH. Ponto de corte para a precipitação da micela de caseína (O).

(B). Inclinação da curva derivada primeira ( $\Delta$  concentração de EtOH/ $\Delta$  pH) indicando o ponto no qual ocorre a mudança de comportamento.

O LINA apresentou uma curva com o mesmo perfil do leite estável (Figura 4). Porém pode-se observar que a curva sigmoidal para o leite mais ácido com pH 6,5 foi deslocada para uma faixa de concentração de etanol mais baixa, corroborando com a hipótese de que o etanol é o responsável pela mudança de comportamento de base para ácido, uma vez que a maior concentração de íons  $H^+$  do leite necessitou de uma menor concentração de etanol (45% v/v) para a detecção desse efeito.

A Tabela 1 mostra que adições sucessivas de base durante a titulação praticamente não alteraram o pH, sendo que o valor ficou na faixa de 6,6 – 6,7. Este comportamento é típico de meios tamponados e considerando que o pH de soluções tamponadas é calculado com a equação de Handerson-Hasselbach (H-H) (equação 1):

$$\text{pH} = \text{pK} + \log_{10} [\text{Pro}^{1-}]/[\text{HPro}]$$

Onde: pH = potencial hidrogeniônico; pK = Logaritmo negativo da constante de acidez; [HPro] = concentração do ácido fraco; [Pro<sup>1-</sup>] = concentração da base conjugada do ácido fraco.

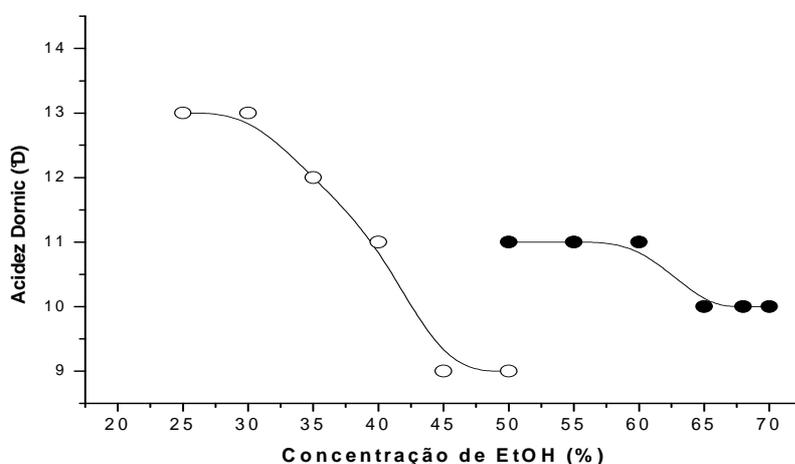
A equação H-H mostra que o pH de uma solução tamponada fica em torno do pK<sub>R</sub> do ácido responsável pelo tamponamento. A capacidade tampão do leite deve-se ao seu conteúdo de citrato, fosfato, bicarbonato e proteínas. A ação conjunta de todos estes sistemas tampão mantém a concentração de íons hidrogênio do leite próximo a um pH de 6,6 (González et al., 2001).

Consultando os valores de pKa do ácido fosfórico e dos aminoácidos que compõem as proteínas do leite, verifica-se que somente a histidina apresenta valor de pK<sub>R</sub> igual a 6,0, próximo ao pH do leite. Portanto, sugere-se que a histidina exerce grande influência, atuando como principal responsável pelo tamponamento do leite e que os demais ácidos do leite não podem ser responsáveis pelo tamponamento, uma vez que seus pKa diferem da faixa de pH observada.

De acordo com os resultados de acidez dornic e pH (Tabela 1) e, considerando a concentração de proteína bruta do leite estável maior do que o LINA, sugere-se que a histidina é um dos aminoácidos que mais contribui para o tamponamento do leite bovino, além do citrato do fosfato. Sugere-se que a mudança de comportamento do etanol, observado na Figura 4 para o leite estável, está deslocada para valores mais elevados de etanol (78% v/v), enquanto que para o LINA, que possui menor concentração de histidina e, portanto

menor capacidade tamponante, a mudança de comportamento ocorreu em menor concentração de etanol (70% v/v). Neste sentido, sugere-se que o etanol exerce influência importante no comportamento do leite em relação ao teste de acidez em graus dornic.

A Figura 6 mostra que o comportamento dos leites acidificados, com pH 6,0 e 6,3 é o oposto daquele observado para o leite estável e LINA. A mudança de comportamento pode ser explicada considerando que a acidez dornic recebeu a maior contribuição da acidez do leite.



**Figura 6.** Acidez em graus Dornic (°D) em diferentes concentrações de etanol em leite bovino  
Notas: Leite ácido com pH 6,0 (○); leite ácido com pH 6,3 (●)

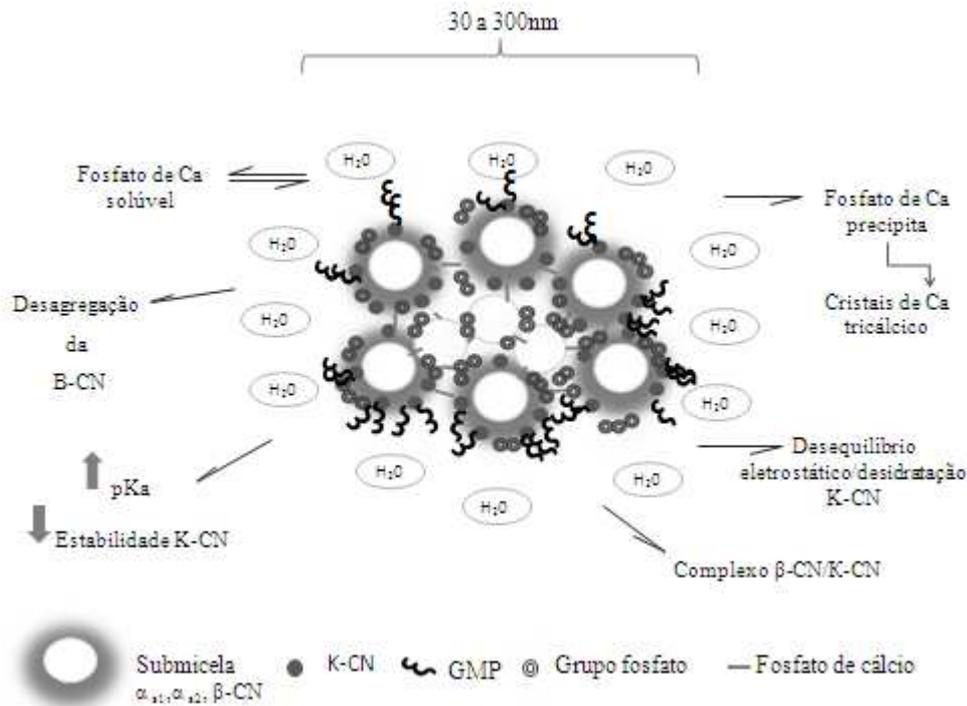
Nos leites acidificados, à medida que predomina o meio etanólico, a dissociação do álcool diminui, passando a se comportar como uma base formando alcoóis protonados  $\text{ROH}_2^+$ , diminuindo a acidez dornic. Pode-se observar que o leite menos ácido (pH 6,3) apresenta menor disponibilidade de íons  $\text{H}^+$ , necessitando de maior concentração de etanol para atuar como base. Os resultados mostram que para o leite acidificado com pH 6,0 e 6,3, até concentração de 50% (v/v) de solução de etanol, o comportamento observado foi de uma base e após 50% (v/v) de etanol, ocorre uma inversão, passando para ácido.

#### 4. Discussão

A adição de soluções de etanol em concentrações mais elevadas acentua o processo de desestabilização da micela de caseína devido à desidratação, favorecendo a coalescência das proteínas do leite (Mikheeva et al. 2003). O mecanismo é complexo, uma vez que pode ocorrer sinergismo e potencializar o processo entre os fenômenos que estão ocorrendo, favorecendo ainda mais o processo de coagulação da micela de caseína do leite devido: (1) desequilíbrio eletrostático devido à menor força de repulsão neutralizando as cargas das micelas de caseína e subsequente redução do potencial zeta, ocasionando colapso da  $\kappa$ -caseína por ação desidratante do etanol ; (2) o  $pK_R$  dos aminoácidos glutamato e aspartato é aumentado, enquanto os aminoácidos alcalinos lisina, arginina e histidina não são alterados, facilitando a agregação da proteína devido a diminuição da carga negativa na superfície da micela de caseína; (3) o etanol reduz a solubilidade do fosfato de cálcio coloidal, formando cristais de cálcio tricálcico; (4) desagregação das micelas de caseína; (5) por último a sua associação com proteínas do soro formando o complexo  $\beta$  lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína. A adição de etanol ao leite induz a várias alterações, os mecanismos de agregação da caseína pela ação do etanol são apresentados na Figura 7.

## Mecanismo de instabilidade da micela de caseína pela ação do etanol

### MICELA DE CASEÍNA



**Figura 7.** Modelo esquemático da instabilidade da micela de caseína, mostrando os efeitos do etanol sobre a associação e precipitação do fosfato de cálcio coloidal

A diferença observada em relação à resistência da desestabilização da caseína do leite estável para os demais leites deve estar associada à estabilidade coloidal das micelas de caseína, que dependem de vários fatores tais como: composição e estrutura da caseína, pH, força iônica, balanço de sais e principalmente concentrações de íons cálcio e fosfato (Guo et al. 1998). Há de se considerar que a diferença básica entre a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol está relacionada à desnaturação das proteínas do soro do leite, principalmente pela formação do complexo  $\beta$ -Lg/ $\kappa$ -CN, enquanto que o pH interfere sobre a composição do cálcio entre as fases solúvel e coloidal.

Horne & Parker (1981) e Horne & Muir (1990), em seus experimentos sobre a

estabilidade ao etanol de acordo com o pH do leite, encontraram uma curva que caracteriza-se por apresentar quatro regiões: os dois lados da curva sigmóide, estabelecidos pelos valores de mínima estabilidade em baixo pH e pela máxima estabilidade em alto pH; um valor de pKa que denota a posição do perfil ao longo do eixo de pH e um gradiente ou parâmetro de inclinação. Este mesmo perfil foi observado para o leite estável e LINA (Figura 4) e invertido para o leite ácido (Figura 6). A Figura 5 foi construída a partir dos dados da região a direita da curva, isto é, a região de mínima estabilidade e maior teor de etanol, pode-se atribuir a inflexão da curva a uma mudança de comportamento. Considerando que o etanol exerce uma grande influência na mudança do mecanismo, pode-se considerar que em valores de pH mais ácidos, devido ao ambiente rico em  $H^+$  o etanol pode estar se comportando como base formando  $ROH_2^+$ . Este mesmo comportamento foi observado na Figura 6 para leite ácido. Por outro lado, em valores de pH mais elevados, o etanol dissocia comportando-se como um ácido, assim como foi observado na Figura 4 para leite estável e LINA. Portanto, pode-se sugerir que a inflexão da curva está intimamente, relacionada com a mudança de comportamento ácido- baseado etanol.

Aparentemente, o comportamento básico do etanol diminui a estabilidade, enquanto que o comportamento ácido aumenta a estabilidade do leite. Segundo Horne & Parker (1981), a maior concentração de íons  $Ca^{2+}$  forma mais ligações Ca-Proteína por unidade de caseína, o que diminui a carga líquida negativa, tornando a micela menos estável. O etanol em leite ácido pode estar atuando de forma semelhante ao cálcio, uma vez que se encontra como  $ROH_2^+$ . Por outro lado, na faixa de pH mais alta, se o etanol atua como um ácido, o íon dissociado  $RO^-$  contribui com a carga negativa da proteína, aumentando a estabilidade do leite. Esta mesma suposição pode explicar o comportamento observado para o LINA, que é semelhante ao leite não ácido na acidez dornic, porém desestabiliza em uma concentração menor de etanol, em função da maior concentração de cargas positivas devido aos íons cálcio.

Neste sentido, Horne (1992) verificou que quanto maior a quantidade do cátion divalente, menor a concentração etanólica necessária para provocar a coagulação da micela de caseína e existe uma forte relação inversamente proporcional entre o cálcio iônico e a concentração de etanol no leite.

## 5. Conclusões

O perfil da curva sigmoideal encontrada tanto para acidez em graus dornic, bem como para a estabilidade ao etanol, pode estar relacionada à mudança de mecanismo do etanol, devido ao seu caráter anfotérico. Adições sucessivas de etanol mudam gradativamente o meio aquoso para etanólico, O etanol em leite ácido pode estar atuando de forma semelhante ao cálcio, uma vez que se encontra  $ROH_2^+$ . Por outro lado, na faixa de pH mais alta, se o etanol atua como um ácido, o íon dissociado  $RO^-$  contribui com a carga negativa da proteína, aumentando a instabilidade do leite. Neste sentido, pode-se sugerir que o etanol exerce influência importante no comportamento do leite em relação à desestabilização da micela de caseína nos testes de acidez em graus dornic e da estabilidade ao etanol e, o ponto no qual ocorre a mudança de comportamento é de aproximadamente 62 % (v/v) de etanol. O leite estável e o LINA apresentaram o mesmo comportamento nos testes realizados, ao contrário do comportamento do leite ácido, evidenciando a similaridade entre estes dois tipos de leite. Contudo, a instabilidade do LINA é evidenciada na realização dos testes de estabilidade térmica juntamente com a estabilidade ao etanol, devido a potencialização dos mecanismos que levam à instabilidade da caseína. Nestes testes, o LINA apresentou o mesmo comportamento do leite ácido evidenciando a sua instabilidade proteica, mesmo não sendo ácido.

Com relação à proteína, somente a histidina apresenta valor de  $pK_R$  igual a 6,0, próximo

ao pH do leite. Sugere-se que a histidina exerce uma grande influência no pH do leite, atuando como principal responsável pelo seu tamponamento, além do citrato e do fosfato.

A instabilidade da caseína é uma propriedade fundamental e desejável para a manufatura do queijo e iogurte e uma vez que o LINA apresenta esta propriedade e segue o mesmo comportamento do leite estável, pode-se sugerir que o LINA seja processado junto a indústria láctea, evitando-se assim o descarte de leite de ótima qualidade nutricional e segura sob o ponto de vista higiênico-sanitário. O teste do etanol tem se mostrado eficiente para avaliar rapidamente a estabilidade da micela de caseína do leite, por alterar simultaneamente propriedades térmicas, físicas e químicas. Por outro lado, o teste do etanol pode ser considerado muito rigoroso quando aplicado ao LINA, uma vez que várias reações podem ocorrer independentemente ou de forma inter-relacionadas levando a sua desestabilização.

## Referências Bibliográficas

- Backes, R.G.L.M; Stefani Pasetti, M. (2012). Leite termicamente instável-problemas e soluções tecnológicas. **Revista de Ciências Agroveterinárias** Lages v.11, p 254-260.
- Barros, L.; Gonzalez, O.; Galain, D.; González, P.; Torres, E.; Denis, N.; Núñez, A. (2000). Variaciones de la leche y prueba del alcohol In: **XXI Congreso Mundial de Buiatria**, Punta del Este – Uruguay.
- Brasil. (1981). Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite fluido. In: Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, v. II, cap. 14.
- Brasil. (2002). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru e refrigerado. Diário Oficial da União. Brasília.
- Chavez, M.; Negri, L.; Taverna, M.A.; Cuatrin, A. (2004). Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p. 201-206.
- Donatele, D.M.; Vieira, L. F.P.; Folly, M. M. (2003). Relação do teste de alizarol a 72% (v/v) em leite "in natura" de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 95 – 100.
- Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Zanela, M.B.; Marques, L.T.; Abreu, A.S.de; Machado, S.C.; Fruscalso, V.; Barbosa, R. S.; Stumpf, M.T. (2012). Leite instável não ácido um problema solucionável? **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. 13 838-849.
- Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. (2000). Fundamentals of cheese science p. 587 (Ed PF Fox). New York: Aspen Publishers.

- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 473–483.
- González, F.H.D.; Dürr, J.W.; Fontanelli, R.S. (2001). Uso de leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS 1 44-57.
- Guo, M.; Wang, Z.; Li, J.; Kindstedt, P. (1998). Ethanol stability of goat's milk. **International Dairy Journal** v.8, p.57-60.
- Holt, C.; Horne, D.S. (1996). The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implication for dairy technology. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. v.50, p.85-111.
- Horne, D.S.; Parker, T. (1979). Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**. v.48, p. 273 -284.
- Horne, D.S.; Parker, T.G. (1981). Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v.48, p. 273-284.
- Horne, D.S. (1987). Ethanol stability of casein micelles a hypothesis concerning the role of calcium phosphate. **Journal of Dairy Research** v.54, p.389-395.
- Horne, D.S. (1992). Ethanol stability. In **advanced dairy Chemistry-1 Proteins**, p-657-689.
- Horne, D.S.; Muir, D.D. (1990). Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal Dairy Science**, v.73, p. 3613-3626.
- Mikheeva, L.M.; Grinberg, N.V.; Grinberg, V.Y.; Khokhlov, A.R.; de Kruif, C.G. (2003) Thermodynamics of micellization of bovine  $\alpha$ -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v.19, p. 2913-2921.
- Negri, L.M.N.R. (2002). Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica. Tesis magister en Ciência y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.169 p.
- Oliveira, D.S.; Timm, C.D.(2007). Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 561-562.

- Ponce Ceballo, P.; Hernández, R. (2001). Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Ed. Félix H.D. González et al., Porto Alegre p. 58-68.
- Sgarbieri, V. C. (2005) Review: structural and physicochemical properties of milk proteins **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 8, p. 43-56.
- Silva, L.C.C.; Beloti, V.; Tamanini, R.; Yamada, A.K.; Giombelli, M.R. (2012). Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68,72, 75 e 78%, em leite bovino. **Revista Instituto Laticínios. "Cândido Tostes"** v.67, p. 55-60.
- Sobhani, S.; Valizadeh, R.; Naserian. A. (1998). Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 80, Suppl. 1.
- Stumpf, M.T. (2012). O uso de aditivos e variação do consumo de alimentos na dieta de vacas leiteiras sobre a composição e estabilidade do leite. **Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre.
- Tronco, V.M. (1997). Manual para inspeção da qualidade do leite. Ed. Universidade de Santa Maria. 166 p.
- Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**. 73 1965–1979.
- Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Fischer, V. (2009). Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1009- 1013.

## **CAPÍTULO II**

**MECANISMO DE INSTABILIDADE DA  $\alpha$ ,  $\beta$  e k- CASEÍNA AO TESTE DO ETANOL MEDIADA POR INTERAÇÕES DE CÁLCIO EM LEITE BOVINO**

## MECANISMO DE INSTABILIDADE DA $\alpha$ , $\beta$ e $\kappa$ - CASEÍNA AO TESTE DO ETANOL MEDIADA POR INTERAÇÕES DE CÁLCIO EM LEITE BOVINO

Lelis A Petrini\*<sup>a</sup>, Luciana B Andrade <sup>a</sup>, Anna C S Arruda<sup>b</sup>, Sergio L Echeverrigaray<sup>a</sup>  
Maria Edi Rocha Ribeiro<sup>c</sup> Carolina S dos Santos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>b</sup> Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

<sup>c</sup>, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

### RESUMO

Neste estudo, objetivou-se abordar o perfil eletroforético, a importância da estrutura, aspectos físico-químicos e os fatores que controlam e interferem na estabilidade das micelas de caseína mediadas pelo cálcio. Os resultados permitem concluir que a concentração ideal de etanol para diferenciar a caseína instável presente no LINA da caseína estável em leite normal é igual a etanol 72% (v/v). Já que 100% das amostras foram positivas ao teste para o LINA e zero para o leite estável. Com a adição de etanol a 74% (v/v), 50% das amostras de leite estável precipitaram a caseína. Esse resultado demonstra a rigidez do teste do etanol. Em relação ao teste de estabilidade térmica, o leite estável e o LINA obtiveram o mesmo comportamento para o teste de etanol a 72% (v/v), mostrando que os dois testes não estão correlacionados. Quanto à caracterização físico-química, CCS e CBT, os dados do LINA mostraram que estão dentro dos padrões legais. Neste sentido, o LINA e o leite normal apresentam composições semelhantes. No entanto, apesar desta semelhança, o teste do etanol evidenciou a maior instabilidade do LINA. Procurando uma explicação para elucidar os mecanismos que levam a desestabilização da micela de caseína, fica evidente que a concentração de íons cálcio exerce um papel importante nas reações químicas entre o cálcio

ligado (coloidal) e o cálcio na camada difusa. Os equilíbrios mediados por íons cálcio incluem o equilíbrio de precipitação de fosfato de cálcio, desestabilização da ligação fosfoserina e quelação com o citrato, portanto se ocorrer qualquer alteração na distribuição de cálcio iônico pode-se prever que todos estes equilíbrios sofrerão alterações para restabelecer um novo estado de equilíbrio. No entanto, de acordo com a relação molar Ca/P, os equilíbrios podem se manter estáveis ou desestabilizar a micela. Para a relação ideal, sugere-se que concentrações próximas ou superiores a 1,5/ 1 para Ca/P aumentam a possibilidade de desestabilização da caseína, e consequente resultado positivo ao teste do etanol, nesse sentido a relação cálcio/fósforo exerce importante efeito na instabilidade da micela de caseína ao teste do etanol. O perfil eletroforético das proteínas do LINA não foi o fator responsável pela desestabilização da micela. Portanto o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é o principal responsável pelo processo de desestabilização da micela de caseína, uma vez que participa dos diversos mecanismos que levam à agregação da micela.

**Palavras-chave:** Estabilidade ao etanol, leite bovino, cálcio, micela de caseína

## 1. Introdução

O leite apresenta em sua composição uma combinação de várias substâncias dispersas em fase aquosa. O sistema coloidal do leite consiste de micelas de caseína ligadas pela presença de fosfato de cálcio coloidal (Sgarbieri, 2005), emulsão de glóbulos de gordura, solução de lactose, proteínas solúveis em soro, sais minerais e vitaminas, constituindo um sistema complexo (Hurley, 2006).

As proteínas do leite bovino são compostas por  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (proteínas do soro lácteo), e caseínas ( $\alpha_{s-1}$ ,  $\alpha_{s-2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína) (De Kruif & Grinberg, 2002). As caseínas correspondem a aproximadamente 80% do total da proteína do leite bovino (Cheftel, Cuq & Lorient, 1989) e apresentam peso molecular distinto ( $\alpha_{s-1}$  - 23 KDa,  $\alpha_{s-2}$  - 25 KDa,  $\beta$ -caseína - 24 KDa e  $\kappa$ -caseína - 19 KDa) sendo constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos respectivamente (Goff, 2006). Estas proteínas são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e secretadas na forma de micela de caseína. No processo de maturação as caseínas são fosforiladas e após a fosforilação o cálcio se liga ao fosfato para iniciar a polimerização das partículas das micelas, sendo a estrutura (caseína –  $\text{PO}_4^{-3}$  -  $\text{Ca}^{++}$  -  $\text{PO}_4^{-3}$  – caseína) chamada de micela em formação (Tronco, 1997). O cálcio tem duas associações: (1) fosfato inorgânico ou solúvel (2) fosfato orgânico ou coloidal ligado a fosfoserina (resíduos de caseína). É difícil quantificar exatamente a relação Ca e P existente no leite, no entanto a estequiometria indica uma relação  $\text{Ca/P} = 1,5$  (Gaucheron, 2005). O fosfato de cálcio ligado às frações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína é responsável pela estrutura e estabilidade das micelas, desempenhando um papel fundamental na formação “cross-linking”. O cálcio atua como um agente neutralizador de resíduos de fosfoserina positivamente carregados, ligando-se aos sítios negativos das moléculas de caseína (Gaucheron, 2005).

As micelas de caseína têm sido extensivamente estudadas, quanto à estrutura, força

iônica e, estabilidade térmica (Holt, 1992; De Kruif & Holt, 2003; Horne, 2006; Fox & Brodtkorb, 2008). No entanto, apesar das divergências de opiniões, a grande maioria sugere que sua estrutura é formada por “self- associating” entre caseínas, forças eletrostáticas de repulsão e atração hidrofóbica e interações mediadas por cálcio (Horne 1998). Phadungath (2005) apresenta uma revisão mostrando a diversidade de modelos de estrutura propostas nas últimas décadas. O modelo mais aceito está representado na Figura 1.

Existem dois tipos de instabilidade do leite: (1) a instabilidade, devida à alta contagem bacteriana, levando à formação de ácidos orgânicos e acidez. (2) aquela de etiologia desconhecida, designada como leite instável não ácido (LINA), cuja acidez é normal.

O LINA caracteriza-se pela perda da estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol, sem apresentar acidez acima de 18 graus Dornic (°D) (Zanela et al. 2009; Stumpf, 2012). As causas do LINA ainda estão sendo estudadas, mas há um consenso entre os pesquisadores de que seja multifatorial principalmente relacionada ao desequilíbrio metabólico nutricional, resultado de uma dieta deficiente (Fischer et al. 2012).

A estabilidade do leite ao etanol, definida como a concentração mínima de etanol em solução aquosa que promove a coagulação do leite, tem sido utilizada em alguns países como método rápido para determinar a estabilidade ou instabilidade adquirida do leite (Horne & Parker, 1981). O teste do etanol é realizado na propriedade rural e deve apresentar resultado negativo, isto é, não deve precipitar a caseína do leite. Ao contrário, se o teste apresentar resultado positivo, a instabilidade da fração caseínica do leite é visível pela formação de coágulos ou precipitações. O teste do etanol envolve a mistura de igual volume de solução de etanol, geralmente 72% (v/v), mas concentrações de etanol superiores a esta também são utilizadas pela indústria láctea, como forma de selecionar um leite de maior estabilidade térmica (Brasil, 2002; Molina et al., 2001; Chavez et al., Negri, Taverna & Cuatrín, 2004). Resultados positivos do teste do etanol em LINA tem sido relatado em vários países tais como

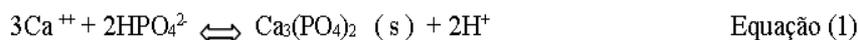
Irã (Sobhani, Valizadeh & Grandison, 1998), Uruguai (Barros et al., 2000), Argentina (Negri, 2002), Cuba, (Ponce Ceballo & Hernandez, 2001), Brasil (Zanela, Ribeiro & Fischer, 2009; Fischer et al., 2012). A ocorrência de LINA nesses países é elevada e tem levado a rejeição de leite com boa qualidade, com baixas contagens bacterianas e de células somáticas (Backes, Stefani & Pasetti, 2012; Fischer, et al., 2012).

Vários fatores afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína resultando na coalescência. Os principais são a temperatura, pH, excesso de  $\text{Ca}^{2+}$ , hidrólise enzimática e mudança do meio quando da adição de etanol (O'connell et al., 2006). A teoria da instabilidade proposta por Horne & Parker (1981), sugere que as micelas de caseína são carregadas negativamente na faixa de pH normal do leite. Esta carga é controlada grandemente pela quantidade de cálcio ligado à proteína e, conseqüentemente, pelo equilíbrio entre este e o nível de cálcio livre e o fosfato de cálcio não dissociado no sistema. Aumentando o nível de cálcio livre, diminui a carga negativa líquida da micela e, conseqüentemente diminui a barreira energética à coagulação. Ao contrário, diminuindo o nível de cálcio livre, aumenta a carga negativa e a precipitação se torna mais difícil (Horne & Parker, 1983).

Neste estudo sugere-se que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  é o principal responsável pelo processo de desestabilização da micela de caseína, uma vez que participa dos diversos mecanismos que levam a agregação da micela.

Tsioulpas *et al.*, (2007) mostraram que a concentração de cálcio tem um papel importante nas relações entre o cálcio ligado à proteína (coloidal) e o cálcio na camada difusa (cálcio iônico). Qualquer alteração de temperatura ou pH promove trocas de cálcio entre a fase difusa e a micela para restabelecer o equilíbrio.

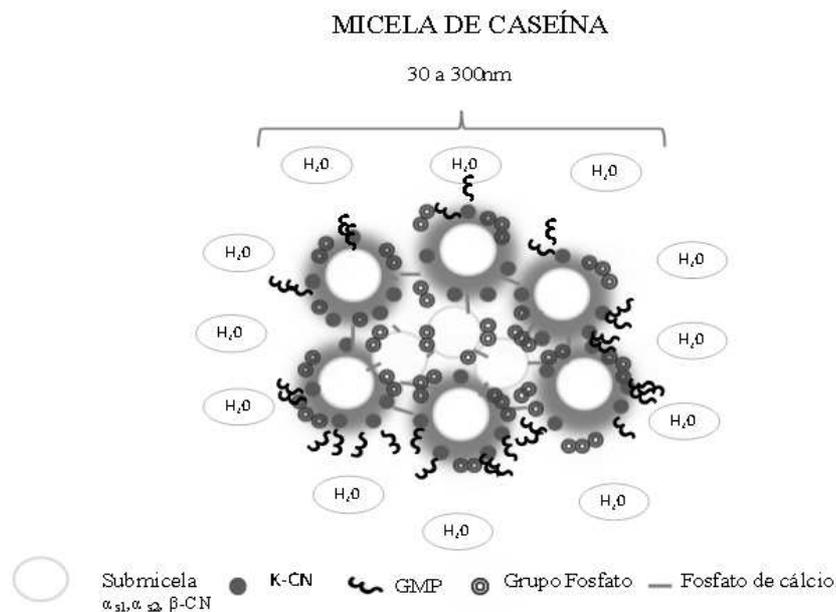
A reação química que mostra o equilíbrio entre o cálcio iônico e o fosfato de cálcio pode ser representada pela equação 1:



Excesso de cálcio diminui as repulsões eletrostáticas e possivelmente altera a conformação da  $\kappa$ -caseína (Singh, 2004). A  $\kappa$ -caseína localiza-se na superfície da micela, com a zona hidrofóbica da molécula ligada à micela, enquanto a porção hidrofílica forma uma capa de filamentos altamente hidratados que se projetam para a fase aquosa, sendo responsáveis pela estabilidade estérica (Holt & Horne, 1996). Os íons cálcio estabilizam a  $\kappa$ -caseína através das ligações com o grupo fosfoserina (Dalglish, 1998; Walstra, 1990), formando fosfato de cálcio, que atua como cimentante. Consequentemente quando as ligações cálcio-fosfoserina são reduzidas, ocasionará problemas de conformação estérica desta fração, resultando na agregação das micelas e formação de um gel (Walstra, 1990).

A estabilidade térmica do leite é o tempo necessário para originar coagulação visível a uma dada temperatura e um dado pH (Horne & Muir, 1990). O importante para a ciência e tecnologia do leite é determinar quais reações influenciam a velocidade de coagulação térmica. O tratamento térmico altera o ambiente em torno da micela de caseína (soro lácteo), pH e solubilidade de minerais solúveis ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). O fosfato de cálcio diminui a sua solubilidade com o aumento da temperatura, carregando cálcio iônico durante a precipitação. Para restabelecer o equilíbrio a micela perde íons cálcio (Dalglish & Law, 1988), favorecendo a desfosforilação e a desagregação das micelas de caseína (Sawyer, 1969). Ao mesmo tempo a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) proteína termossensível, perde sua conformação globular compacta, (Palazolo, Rodriguez, Farrugia, Pico & Delorenzi, 2000; Photchanachai & Kitabatake, 2001), formando polímeros em forma de contas (Sgarbieri, 2005) que se associam a  $\kappa$ -caseína (K-CN) através de interações hidrofóbicas e ligação de dissulfeto, formando o complexo  $\beta$ -lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína (Sawyer 1969, Haque & Kinsella, 1988, Singh, Sohi &

Dhaka, 1995). Neste estudo, objetivou-se abordar o perfil eletroforético, a importância da estrutura, aspectos físico-químicos e os fatores que controlam e interferem na estabilidade das micelas de caseína mediadas pelo cálcio, pretendendo contribuir para o entendimento do comportamento funcional das proteínas e estabilidade do leite.



**Figura 1.** Estrutura da molécula de caseína ligada ao Fosfato de cálcio

## 2. Material e Métodos

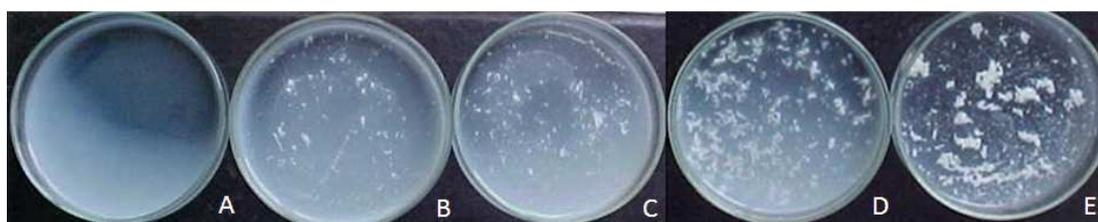
Foram coletadas 500 mL de 58 amostras de leite in natura de vacas individuais da raça Jersey na região sul do RS/Brasil. Foram realizadas as seguintes análises: teste do etanol, estabilidade térmica, pH, acidez titulável, caracterização da composição química (teores de proteína bruta, lactose, gordura e extrato seco total), contagem bacteriana total (CBT), CCS e determinação de cálcio e fósforo totais. As análises foram realizadas no laboratório de qualidade do leite da EMBRAPA/cpact, Pelotas, RS/Brasil. A composição química foi analisada por espectrofotometria por radiação infravermelha no equipamento Bentley 2000®.

A CCS foi realizada por contagem em contador eletrônico pela citometria de fluxo (Somacount 300® da Bentley Instruments, Inc). A contagem bacteriana foi realizada em equipamento Somacout 300®, da marca Bentley Instruments Inc seguindo o protocolo de Fonseca & Santos (2000). Na Central de Ensaio e Análises e no laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada da Universidade de Caxias do Sul, RS. Brasil, foram realizadas a determinação de cálcio total (iônico mais o ligado a micela de caseína) e fósforo total, adotando o método de espectrometria de absorção atômica com chama Varian AAplus 250 e, o perfil eletroforético das proteínas do LINA e do leite estável, respectivamente.

### 2.1 Estabilidade ao Etanol de Leite Estável e LINA

Para a determinação da estabilidade ao etanol do leite estável e LINA, volumes iguais da amostra e de solução de etanol nas concentrações 68, 70, 72, 74, 76, 78 e 80% (v/v) foram homogeneizadas durante alguns segundos, e após foram vertidos para placas de petri, a fim de identificar o início da desestabilização da micela de caseína do leite.

Os resultados foram classificados numa escala de estabilidade de um a cinco, segundo a metodologia adaptada de Zanela *et al.* (2006), sendo explanada de acordo com o modelo usado para interpretação da coagulação da micela de caseína, conforme a Figura 2.



**Figura 2.** Subclasses de estabilidade da caseína do leite ao teste do etanol de acordo com a intensidade da coagulação, classificadas como: (A) intensidade 1 (caseína estável sem precipitação); (B) intensidade 2 (coagulação fraca); (C) intensidade 3 (coagulação média); (D) intensidade 4 (coagulação intensa); (E) intensidade 5 (coagulação muito intensa).

## **2.2 Estabilidade Térmica de Leite Estável e LINA**

Alíquotas das amostras de leite foram submetidas ao teste de fervura (100°C) para determinação da estabilidade da micela de caseína através de observação visual da formação de coágulos.

## **2.3 Determinação do pH**

Utilizou-se um peagâmetro devidamente calibrado com eletrodo específico para medição de pH da marca Digimed DM-20.

## **2.4 Determinação da Acidez Titulável em Graus Dornic (°D)**

Utilizou-se acidímetro de Dornic (°D) (Brasil, 1981).

## **2.5 Determinação de Cálcio e Fósforo**

Para a determinação de cálcio e fósforo total (ligado à micela de caseína e solúvel) nas amostras de LINA e Leite estável, 10 mL foram alíquotados e, adicionados 50 mL de água Milli-Q, e 5 mL de ácido nítrico concentrado P. A., seguido por aquecimento em chapa até reduzir o volume para 5 mL. As soluções digeridas foram filtradas, transferidas para balões volumétricos de 50 mL e avolumadas com solução de ácido nítrico a 10% (APHA, 2012). Para a precipitação das proteínas nas amostras de LINA utilizou-se etanol 72 % (v/v) para a precipitação da caseína, e para leite estável, etanol 78 % (v/v). Por diferença calculou-se as proteínas do soro do leite. O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram secos durante uma hora em estufa a 100°C. O precipitado foi pesado em balança analítica e calcinado em forno mufla por 2 horas a 550°C. A seguir, as cinzas obtidas foram dissolvidas com 1 mL de solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 10%, foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL e avolumadas com solução de ácido nítrico. Todas as amostras foram

preparadas em triplicata e as soluções foram analisadas quanto à concentração de cálcio e fósforo (AOAC, 2007).

## **2.6 Determinação de Fósforo Total Adotando o Método de Ácido Ascórbico**

A determinação do fósforo total através do Método de ácido ascórbico consiste em duas etapas: conversão das formas de fósforo presentes na amostra (fosfatos condensados e fosfatos orgânicos) em ortofosfato solúvel, seguida por desenvolvimento de cor e leitura da absorção molecular em 880 nm (AOAC, 2007).

No ensaio, a amostra foi submetida a um tratamento prévio, que consistiu em uma digestão ácida, para a oxidação da matéria orgânica e liberação do fósforo como ortofosfato, reagindo com molibdato de amônio e tartarato de antimônio e potássio, produzindo o ácido fosfomolibdico. Para o desenvolvimento de cor, o ácido ascórbico atua como agente redutor, reduzindo o ácido fosfomolibdico para formar o azul de molibdênio. A intensidade da cor do azul de molibdênio é proporcional à concentração de ortofosfato total. Após no mínimo 10 min e no máximo 30 min, a absorvância foi determinada no espectrofotômetro Micronal modelo 8582, ajustado com um comprimento de onda igual a 880 nm.

## **2.7 Avaliação dos Perfis Eletroforéticos de Caseínas Presentes em Leite Estável e LINA**

Foram utilizadas para a avaliação eletroforética das proteínas presentes em leite estável e LINA através do método SDS-PAGE cinquenta amostras para os dois tipos de leite, oriundas de vacas individuais da raça Jersey e, dezoito amostras de leite oriundas de vacas individuais da raça Holandes. A SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 10% em 125 mM de tampão TRis-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15,4 % de poliacrilamida em 380 mM de tampão TRis-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de

SDS (Laemmli, & Favre, 1973) . As amostras (2mg/ml) serão dissolvidas em tampão TRis-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100°C por 3min, e volume de 20  $\mu$ l foram depositados nos géis de acordo com o método descrito por (Egito et al. 2001).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Avaliação da Estabilidade da Caseína do Leite ao Teste do Etanol**

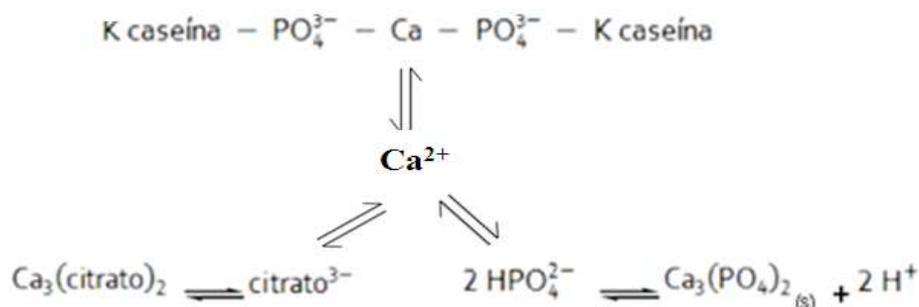
Neste estudo o aumento da concentração etanólica intensificou a instabilidade da micela de caseína, resultando num maior número de amostras positivas ao teste do etanol (Tabela 1). Os resultados mostram que a concentração de 72% (v/v) de etanol é efetiva para diferenciar o LINA do leite estável, já que 100% das amostras foram positivas ao teste para o LINA e (0%) para o leite estável. Com a adição de etanol a 74% (v/v), 50% das amostras de leite estável precipitaram a caseína. Esse resultado demonstra a rigidez do teste do etanol, por afetar as características térmicas, físicas e químicas do leite. O mecanismo é complexo, uma vez que pode ocorrer sinergismo e potencializar o processo entre os fenômenos que estão ocorrendo, favorecendo ainda mais o processo de coagulação da micela de caseína. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2012) que analisaram amostras de leite cru sem acidez adquirida, e obtiveram 15,29% e 65,88% de amostras positivas para adições de etanol a 68% (v/v) e 78% (v/v), respectivamente. Corroborando esses estudos, Molina et al, González, Brito, Carrillo & Pinto, (2001) analisaram amostras de leite cru e, utilizaram concentrações de etanol de 75%, 80% e 85% (v/v) resultando no aumento da instabilidade do leite em 8,3%, 61,5% e 94,8% respectivamente. Vários experimentos relatados por Fischer et al. (2012) confirmam que as indústrias têm acrescido mais etanol ao teste, passando de 72 para 78 e 80%, resultando no aumento de resultados positivos para o LINA, levando ao

descarte de leite de forma injustificada.

**Tabela 1-** Porcentagem de resultados positivos ao teste do etanol em diferentes concentrações etanólicas em amostras de leite bovino estável e LINA.

Tipo de Leite	Nº de Amostras	Teste do Etanol % (v/v)						
		68	70	72	74	76	78	80
LINA	22	87%	87%	100%	100%	100%	100%	100%
Leite Estável	36	0%	0%	0%	50%	86%	86%	86%

A estabilidade da micela de caseína do leite avaliada através do teste do etanol é afetada por diversos fatores, sendo o principal a acidez adquirida e o equilíbrio entre os sais de cálcio na camada difusa e micelar. O aumento de cálcio iônico por adição de íons cálcio ou acidez, ou redução deste por simulação do processo de aquecimento ao leite, fará o cálcio migrar entre a fase difusa e micelar a fim de restaurar o equilíbrio (Tsioulpas *et al.*, 2007). Os equilíbrios envolvidos estão apresentados na Figura 3, onde os íons cálcio são compartilhados com o equilíbrio de precipitação de fosfato de cálcio, desestabilização da ligação fosfoserina e quelação com o citrato, portanto se ocorrer qualquer alteração na distribuição de cálcio iônico pode-se prever que todos estes equilíbrios sofrerão alterações para restabelecer um novo estado de equilíbrio.



**Figura 3.** Equilíbrios mediados pelo cálcio na estabilidade da micela de caseína

O desequilíbrio de íons cálcio promove a desestabilização da micela por diferentes mecanismos: (1) aumento da atração eletrostática entre as micelas de caseína por redução de suas cargas em função da redução do potencial zeta, ocasionando colapso da  $\kappa$ -caseína por ação desidratante do etanol. (O'connell et al., 2006); (2) A adição de soluções de etanol acentua o processo de desidratação, reduzindo a solubilidade do fosfato de cálcio, no efeito *salting out*, removendo íons das ligações Ca-fosfoserina, induzindo a coalescência das proteínas do leite (Horne, 1987; Mikheeva, Grinberg, Grinberg, Khokhlov & De Kruif, 2003); (3) o  $pK_R$  dos aminoácidos glutamato e aspartato é aumentado, enquanto os aminoácidos alcalinos lisina, arginina e histidina não são alterados, facilitando a agregação da proteína devido a diminuição da carga negativa na superfície da micela de caseína. A precipitação do fosfato de cálcio leva à redução do pH segundo a reação química 1.

Silva & Almeida (1998) em seus estudos consideram que a liberação de íons hidrogênio contribui para a positividade ao teste do etanol, enquanto para Gaucheron (2005) a menor dissociação dos aminoácidos em meio etanólico aumenta o pH. Em nossos estudos anteriores (dados não publicados) os resultados indicaram que a capacidade tamponante do leite regula o pH, portanto este não é um fator que contribui efetivamente para a instabilidade da micela de caseína no teste do etanol.

### **3.2 Estabilidade Térmica**

Com o objetivo de verificar a relação entre o teste do etanol e a estabilidade térmica, acompanhou-se o comportamento dos dois tipos de leite em relação à estabilidade térmica ao teste de fervura. As amostras de LINA e leite estável foram negativas ao teste de fervura. Portanto, pode-se verificar que o leite estável e o LINA obtiveram o mesmo comportamento para o teste de estabilidade térmica, mostrando que os dois testes (estabilidade térmica e teste ao etanol a 72 % (v/v)) não estão correlacionados. A temperatura utilizada no ensaio, foi inferior à temperatura utilizada no processo *UHT* (130 a 150°C por dois a cinco segundos), no entanto é possível o aproveitamento do LINA para a pasteurização e elaboração de derivados lácteos já que a temperatura utilizada é de 72°C por 20 segundos. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Molina, González, Brito, Carrillo & Pinto, (2001), Fruscalso (2008) e Silva et al., (2012), que verificaram a estabilidade térmica do leite frente ao teste de fervura a 100°C e positivo ao teste do etanol. Viero (2008) em seus estudos obteve 18,55% de amostras positivas ao teste do etanol, e estáveis ao teste de fervura, corroborando com nossos estudos. A diferença básica entre a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol está relacionada à desnaturação das proteínas do soro do leite, principalmente pela formação do complexo  $\beta$ -Lg/K-CN, enquanto que o teste do etanol altera a concentração de cálcio na fase difusa.

### **3.3 pH, Acidez Dornic, Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total**

O potencial hidrogeniônico do leite fica em torno de 6,6 a 6,8. A Tabela 2 mostra os resultados encontrados para o pH na faixa de  $6,82 \pm 0,02$  para o LINA e  $6,81 \pm 0,02$  para leite estável. Resultados semelhantes foram encontrados por vários autores (Machado, 2010; Zanela, 2004; Barbosa, 2011) evidenciando que o LINA não pode ser classificado como leite

com acidez adquirida.

O teste de acidez Dornic ( $^{\circ}$ D) tem por objetivo detectar aumentos na concentração de ácido láctico no leite. Os resultados de acidez Dornic entre os dois tipos de leite não apresentaram diferenças significativas (Tabela 2). Os dados mostram que o LINA está dentro do padrão exigido pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 1981), que considera normal valor de 14 – 18  $^{\circ}$ D.

**Tabela 2-** Média e desvio padrão de acidez titulável, pH, contagem de células somáticas e contagem total de bactérias de vacas da raça Jersey.

Características	Jersey / LINA	Jersey/Leite Estável
Número de amostras	22	36
Teste ao etanol	72 $^{\circ}$ GL	72 $^{\circ}$ GL
Acidez Dornic ( $^{\circ}$ D)	15,86 $\pm$ 0,35	15,28 $\pm$ 0,41
pH	6,82 $\pm$ 0,02	6,81 $\pm$ 0,02
CCS (cel x 10 <sup>3</sup> )	350,26 $\pm$ 90,15	359,85 $\pm$ 107,08*
CBT (Log)	4,41 $\pm$ 0,14	4,72 $\pm$ 0,34

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

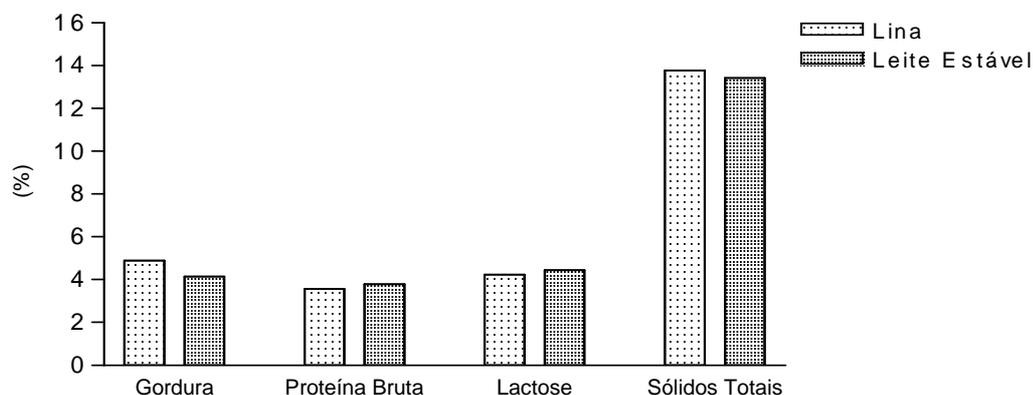
Os resultados mostrados na tabela 2, corroboram os estudos de Negri et al. (2001), que estudando 85 amostras de leite, não detectaram diferenças significativas na acidez titulável, pH e contagem bacteriana total para os distintos tipos de leite. Em relação a CCS observou-se diferenças significativas, o leite positivo ao teste do etanol apresentou menor CCS do que o leite negativo, evidenciando que não existe relação entre a mastite subclínica com o LINA.

Marques et al. (2002) determinaram a variação na composição do leite de acordo com a CCS. Esses autores relataram que, conforme aumentaram as células somáticas, houve diminuição da lactose e aumento dos teores de gordura e proteína bruta. Esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho, uma vez que não foi obtida a mesma relação desses atributos com a CCS.

Para a contagem bacteriana total foram observadas menores contagens para o LINA ( $4,41 \pm 0,11$ ) do que para o leite estável ( $4,72 \pm 0,34$ ), sendo que ambas as contagens estão dentro dos parâmetros exigidos pela legislação brasileira (Brasil, 2011).

### 3.4 Composição Química

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de leite em relação à composição química. Os resultados da composição química do LINA e leite estável estão apresentados na Figura 4



**Figura 4.** Média da composição química de leite instável não ácido (LINA) e leite estável de amostras de leite bovino individual.

Ponce Ceballo & Hernández (2001) e Fischer et al. (2012) relatam que o LINA é o resultado de alterações nas propriedades físico-químicas do leite, associadas a transtornos fisiológicos, metabólicos e/ou nutricionais com implicações nos mecanismos de síntese e secreção láctea. Neste trabalho, os teores de gordura encontrados para o LINA ( $4,81 \pm 0,24$ ), apresentaram uma tendência superior ao leite estável ( $4,49 \pm 0,37$ ), apesar dessas diferenças não serem significativas para o teor de gordura encontrado. Esses resultados concordam com os dados encontrados por Chavez, Negri, Taverna & Cuatrin (2004), Ponce Ceballo &

Hernandez (2001), Roma Jr., Montoya, Martins, Cassoli, & Machado, (2009) e Sobhani, Valizadeh & Naserian (1998), o qual não encontraram diferenças significativas no teor de gordura entre esses dois tipos de leite. Vários autores Barros, Denis, González & Galain, (1999), Barros, (2001); Oliveira, Lopes, Franco & Corassin, (2011) e Marques, Zanela, Ribeiro, Stumpf Junior & Fischer (2007) encontraram teores de gordura superiores significativos para o LINA em relação ao leite estável. Já Fischer, Marques, Zanela, Frucalso & Ribeiro (2006) obtiveram valores de gordura inferiores.

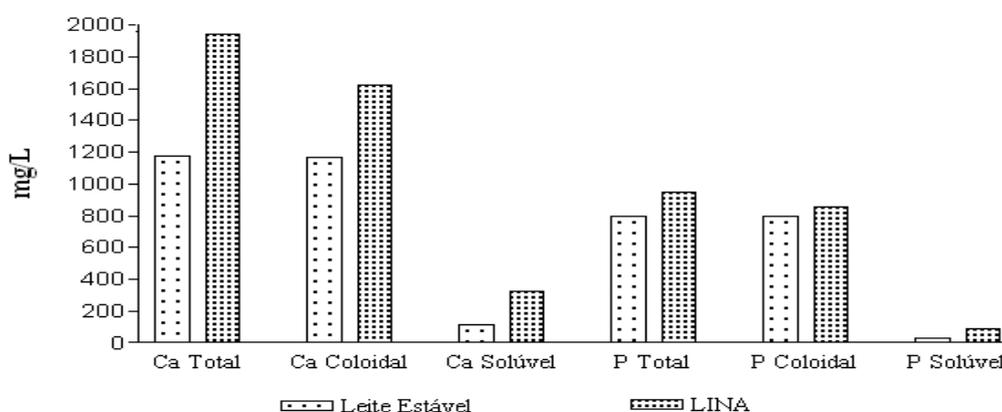
Os teores de proteína bruta não apresentaram diferenças significativas para o leite estável ( $3,78 \pm 0,10$ ) e, para o LINA ( $3,59 \pm 0,10$ ), os quais corroboram os resultados de Chavez, Negri, Taverna & Cuatrin (2004), Montoya, Martins, Cassoli, & Machado, (2009), Sobhani, Valizadeh & Naserian (1998) e, Machado (2010). Vários autores Ponce Ceballo & Hernandez (2001); Zanela (2004); Fischer, Marques, Zanela, Frucalso & Ribeiro (2006), encontraram valores significativos inferiores de proteína bruta no LINA. No entanto, Barros (2001) encontrou valores superiores no leite estável. Há de se considerar que as diferenças nas concentrações médias de gordura e proteína encontradas neste estudo podem estar associadas a alterações nas concentrações dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen, causada por variações na ingestão de volumosos ou devido a alterações na proporção concentrado: volumoso (Agenäs, Dahlborn & Holtenius, 2003). O aumento do volumoso leva ao aumento na concentração de ácido acético, principal precursor de gordura no leite, e ao decréscimo na concentração de ácido propiônico, precursor da lactose, cuja redução é acompanhada pelo decréscimo dos outros componentes do leite (Corassin, Machado Coldebella, Cassoli & Soriano, 2004).

Considerando as concentrações médias de lactose para o LINA ( $4,23 \pm 0,05$ ) e, para o leite estável ( $4,42 \pm 0,11$ ) observa-se uma tendência de redução da concentração de lactose em LINA (Figura 4). Esse fato pode estar associado à subnutrição (Sobhani, Valizadeh &

Naserian, 1998; Barros, Denis, González & Galain, 1999; Marques, Zanela, Ribeiro, Stumpf Junior & Fischer (2007). Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes a outros estudos (Barros, Denis, González & Galain, 1999; Marques, Zanela, Ribeiro, Stumpf Junior & Fischer (2007); Zanela, Ribeiro & Fischer, 2009; Oliveira & Timm, 2006). Neste contexto, não há justificativa para a rejeição do LINA pelas indústrias lácteas, por apresentar estabilidade térmica, CCS, CBT e composição química dentro de parâmetros normais de acordo com a Instrução Normativa 62 (Brasil, 2011).

### 3.5 Cálcio e Fósforo de Amostras de LINA e Leite Estável

A distribuição de cálcio entre a fase difusa e fase coloidal é importante para a estabilidade da micela de caseína. Avaliou-se a concentração de cálcio e fósforo total, micelar e sol em Leite estável e LINA (Figura 5).



**Figura 5.** Valores médios da concentração de cálcio e fósforo total, coloidal e solúvel em LINA e Leite estável de amostras de leite bovino individual

Os resultados indicam que o teor de cálcio no LINA é maior quando comparado com o leite estável, concordando com (Barros, 2001; Barros, 2002). Pode-se observar que o teor de cálcio na fração solúvel é consideravelmente maior no LINA. O cálcio iônico é considerado o principal componente de interferência na estabilidade do leite (Horne & Muir, 1990; Chavez,

Negri, Taverna & Cuatrin (2004). Os mecanismos que levam a instabilidade da micela da caseína podem ser explicados pelas alterações na concentração de íons cálcio, já citados nesse trabalho, as quais promovem modificações no balanço salino do leite, aumentando a força iônica. O aumento da força iônica reduz a constante dielétrica do meio diminuindo a barreira energética que previne a coagulação (Chavez, Negri, Taverna & Cuatrin (2004). Os níveis de cálcio no leite são afetados pela temperatura, adição de cálcio, pH e período de lactação (Barros, 2001; Barros 2002). Em leite com maiores teores de cálcio iônico, observa-se menor estabilidade da proteína, e conseqüente menor estabilidade ao teste do etanol (Fonseca & Santos, 2007). Existe uma correlação negativa entre a estabilidade ao etanol e a concentração de cálcio iônico em leite *in natura* ( $r = - 0,887$   $P < 0,05$ ), confirmando a sua importância na estabilidade do leite (Horne & Muir, 1990; Barros, 2002).

O cálcio tem sido relatado como possível fator da desestabilização da fração de caseína do leite em diversos trabalhos realizados no Uruguai (Barros, Denis, González & Galain, 1999; Barros et al 2000; Barros, 2001; Barros, 2002). Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,001$ ) do teor de cálcio em leites com caseína instável em relação a leites com caseína estável ao teste do etanol foram evidenciadas, os valores foram de  $0,110 \pm 0,014$  e  $0,083 \pm 0,017$  g/L (Barros, Denis, González & Núñez, 1998) respectivamente. Esse autor constatou a presença do cálcio em concentrações superiores em leites sem acidez adquirida, sendo o cálcio considerado o responsável pela instabilidade da micela de caseína no leite.

Chavez, Negri, Taverna & Cuatrin (2004) analisou os parâmetros que interferem com a estabilidade do leite, e constatou que o único parâmetro que reduz a estabilidade tanto para o teste do etanol como para o tratamento térmico, é o teor de Cálcio.

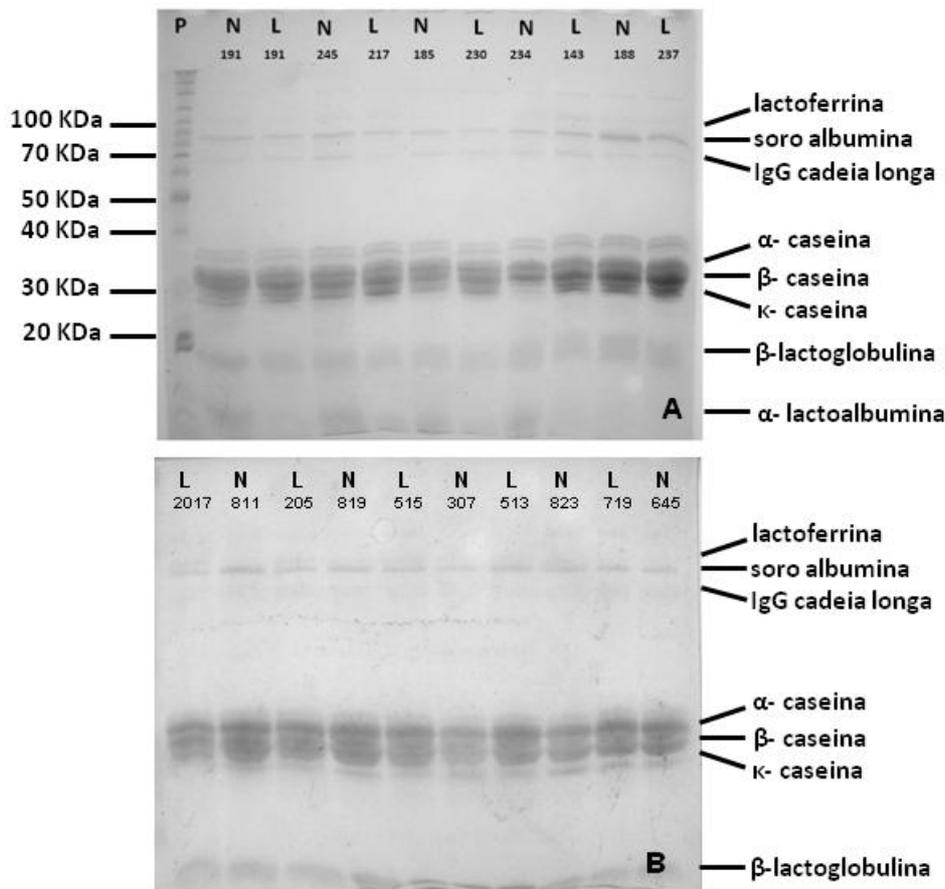
Lin, Lewis, Grandison (2006) relatam que os níveis de  $Ca^{2+}$  são afetados pela temperatura, com o aquecimento do leite, ocorre o deslocamento do cálcio coloidal para a fase solúvel. Isso leva a precipitação do fosfato tricálcico, devido a sua pouca solubilidade a altas

temperaturas. Esses autores constataram que amostras instáveis ao etanol 75% apresentavam níveis de cálcio iônico mais alto do que as amostras estáveis. A estabilidade do etanol apresentou maior relação com a concentração de cálcio iônico do que com estágios de lactação ou valores do pH.

As micelas de proteína estão negativamente carregadas, conferindo a estabilidade em solução. Na teoria, a relação Ca/P, para que ocorra a neutralização do fosfato negativamente carregado é igual a 1,5/1. Os íons cálcio no leite estão ligados com caseína, citrato e fosfato. Neste trabalho encontrou-se uma relação Ca/P igual a 1,1/1 para o leite estável. Sugere-se que esta relação pode ser adotada como um modelo quantitativo, o qual permite prever a estabilidade da caseína mantendo a caseína estável. Segundo Cheftel, Cuq & Lorient (1989), quando a relação é igual a 1,5/1, favorece a precipitação do complexo caseína-Ca<sup>++</sup>, devido a fixação de duas unidades de cálcio para reduzir a carga negativa e a repulsão eletrostática. Ao realizar o teste do etanol, simulando a estabilidade térmica do leite, observou-se que a relação Ca/P se manteve em 1,6/1, para o LINA, evidenciando que esta relação contribui para a instabilidade da caseína, quando comparada com o leite estável. Portanto, pode-se sugerir que o maior teor de cálcio em relação ao fósforo no LINA provavelmente contribuiu para a sua desestabilização e que quando a relação se aproximar de 1,5/1 aumenta a possibilidade de resultado positivo ao teste do etanol.

### **3.6 Avaliação do perfil eletroforético das caseínas de leite estável e LINA**

O uso da metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida na área de laticínios vem sendo utilizadas com bastante sucesso, conforme podemos constatar em trabalhos publicados por Egito et al. (2001, 2002, 2006, 2007). Neste estudo o perfil eletroforético das proteínas do LINA demonstra não ser o fator responsável pela desestabilização da micela por não se evidenciar diferenças entre as amostras de leite estável e de LINA (Figura 6).



**Figura 6.** Caracterização eletroforética das proteínas de leite bovino estável e LINA oriundos de vacas Jersey (A) e Holandês (B)

Concordando com nosso estudo, Lopes (2008), analisou as frações de caseína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), verificou que o cromatograma de uma amostra de LINA não apresenta diferenças nos picos das frações de caseína quando comparado com os cromatogramas apresentados por amostras estáveis ou pela amostra padrão. Botaro et al., (2007, 2009) não observaram diferenças entre o leite instável e estável quanto ao polimorfismo da  $\beta$ - lactoglobulina e da  $\kappa$ - caseína.

Oliveira, Lopez, Rosim, Fernandes, & Corassin, (2013) analisou setenta e sete amostras de leite, quanto as frações proteicas e, não encontraram diferenças nos percentuais de  $\alpha$  e  $\beta$  caseínas dos leites estáveis e instáveis. Por outro lado, Barros (2001) constatou em seus

estudos, que o LINA apresenta diferença nas frações proteicas em relação ao leite estável. Corroborando com esse autor Barbosa et al. (2012) encontrou nas amostras de leite instáveis ao teste do etanol menor concentração de  $\kappa$ -caseína e, maiores concentrações de  $\beta$ - caseína.

#### 4. Conclusões

Os resultados permitem concluir que a concentração ideal de etanol para distinguir o LINA do leite normal é igual a etanol 72% (v/v). Já que 100% das amostras foram positivas ao teste para o LINA e (0%) para o leite estável. Com relação ao teste de estabilidade térmica, o leite estável e o LINA obtiveram o mesmo comportamento para o teste de etanol a 72% (v/v), mostrando que os dois testes não estão correlacionados.

Portanto o uso de soluções de etanol mais concentradas são utilizadas de forma injustificada pela indústria levando ao descarte de leite de boa qualidade nutricional e segura sob o ponto de vista higiênico-sanitário. No entanto, para o processo *UHT*, não é recomendado, porém é possível o seu aproveitamento para a pasteurização e elaboração de derivados lácteos.

Quanto ao pH, acidez titulável, e à caracterização físico-química, os dados do LINA mostraram que estão dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura (Brasil, 1981). Neste sentido, o LINA e o leite normal apresentam composições semelhantes. No entanto, apesar desta semelhança, o teste do etanol evidenciou a maior instabilidade do LINA. Procurando uma explicação para elucidar os mecanismos que levam a desestabilização da micela de caseína, fica evidente que a concentração de íons cálcio é determinante nas reações químicas entre o cálcio ligado (coloidal) e o cálcio na camada difusa. O cálcio é compartilhado com o equilíbrio de precipitação do fosfato de cálcio, desestabilização da ligação fosfoserina e quelação com o citrato, portanto se ocorrer qualquer alteração na

distribuição de cálcio iônico pode-se prever que todos estes equilíbrios sofrerão alterações para restabelecer um novo estado de equilíbrio. No entanto, de acordo com a relação molar Ca/P, os equilíbrios podem se manter estáveis ou desestabilizar a micela. Para a relação ideal, sugere-se que concentrações próximas ou superiores a 1,5/1 aumentam a possibilidade de desestabilização da caseína, e consequente resultado positivo ao teste do etanol.

O perfil eletroforético das proteínas do LINA demonstra não ser o fator responsável pela desestabilização da micela.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a colaboração da EMBRAPA/cpact e o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Brasil.

## Referências Bibliográficas

- Agenäs, S.; Dahlborn, K.; Holtenius, K. (2003). Changes in metabolism and milk production during and after feed in primiparous cows selected for different milk fat content. **Livestock Production Science**, v.83, p.153-164.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2007). Official Methods of Analysis. 19th Edition. Washington, DC.
- APHA - American Public Health Association; American Water Works Association, Water Environment Federation. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22. ed. Denver: A. D. Eaton, E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Clesceri.
- Backes, R.G.; Stefani, L.M.; Pasetti, M. (2012). Leite termicamente instável-problemas e soluções tecnológicas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages v.11, p.254-260.
- Barbosa, R.S. (2011). Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no teste do álcool. **Tese de doutorado** em Zootecnia e Produção Animal da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. Brasil.
- Barbosa, R.S.; Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Zanela, M.B.; Stumpf, M.T. & Kolling, G.J.; Schafhäuser, J. Jr.; Barros, L.E.; Egito, A.S. (2012). Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesq. agropec. bras.** Brasília, v.47, n.4, p.621-628.
- Barros, L.; Denis, N.; González, A.; Núñez, A. (1998). Ionic calcium related to alcohol test in milk. In: 10 th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, Anais... Utrecht – Holanda.
- Barros, L.; Denis, N.; González, A.; Núñez, A. (1999). Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Práticas Veterinárias**. Publicación del Centro Veterinario de Florida-Uruguay, n.9, p. 315.

- Barros, L., González, O., Galain, D., González, P., Torres, E., Denis, N., et al. (2000). Variaciones de la leche y prueba del alcohol. In: XXI Congresso Mundial de Buiatria, Anais...Punta del Este – Uruguay.
- Barros, L. (2001). Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: González, F.H.D.; Dürr, J.W.; Fontaneli, R.S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.44-57.
- Barros, L. (2002). Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais (sangue, leite e urina). In: Congresso Nacional de Medicina Veterinária, 29., Gramado. Anais... Gramado, p.18-26.
- Botaro, B.G.; Lima, Y.V.R. de; Aquino, A.A. et.al. (2007). Polimorfismo da betalactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.747-753.
- Botaro, B.G., Lima, Y.V.R. De, Cortinhas, C.S., Silva, L.F.P. , Renno, F.P.; Santos, M.V. (2009). Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2447-2454.
- Brasil. (1981) Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite fluido. In: \_\_\_\_\_. MÉTODOS analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, v. II, cap. 14.
- Brasil, (2002) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2001. Aprova e oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru e refrigerado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.
- Brasil (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Alteração do Caput da

- Instrução Normativa Mapa nº51 de 18 de setembro de 2002. (Instrução Normativa nº 62).  
Brasília.
- Chavez, M.; Negri, L.; Taverna, M.A.; Cuatrín, A. (2004). Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p. 201-206.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias. Bioquímica – Propiedades funcionales – valor nutricional – Modificaciones químicas. Traducido del original francés por el Dr. Francisco López Capont. Zaragoza – Espanha: Editorial Acribia AS.
- Corassin, C.H.; Machado, P.F.; Coldebella, A.; Cassoli, L.D. & Soriano, S. (2004). Avaliação das ferramentas utilizadas no balanceamento de dietas completas para vacas em lactação. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.26, n.2, p. 241-249.
- Dalgleish D. G. (1998). Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. **Journal of Dairy Science** v.81,p. 3013-3018.
- Dalgleish D.G.; Law A.J.R. (1988). pH induced dissociation of bovine casein micelles.1-Analysis of liberated caseins. **Journal. Dairy Ressearch**. 55 529-538.
- De Kruif, C.G.; Holt, C. (2003) Casein Micelle Structure, Functions and Interactions advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins, Third Edition A, Chapter 5 Ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney Kluwer Academic, New York.
- De Kruif C.G.; Grinberg V.Y. (2002). Micellisation of  $\alpha$ -casein. **Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp**, 210:183-190.
- Egito, A.S.; Girardet, J.M; Miclo, L.; Mollé, D.; Humbert,G.; Gaillard, J.L. (2001). Susceptibility of equine  $\kappa$ —and  $\beta$ -caseins to hydrolysis by chymosin. **International Dairy Journal**, v.11, p. 885-893.
- Egito, A.S., Miclo, L., López, C., Adam, A., Girardet, J.M., Gaillard. J.L. (2002).Separation and characterization of mares milk  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  caseins,  $\gamma$ -casein like, and proteose peptone

- component 5-like peptides. **Journal. Dairy Science**, v. 85, p. 697-706.
- Egito, A.S.; Rosinha, G.M.S.; Laguna, L.E.; Miclo, L.; Girardet, J.M. & Gaillard, J.L. (2006). Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.58, n.5.**
- Egito, A.S.; Girardet, J.M.; Laguna, L.E.; Poirson, C.; Mollé, D.; Miclo, L.; Humbert, G.; Gaillard, J.L. (2007). Milk- clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825.
- Fischer, V.; Marques, L.T.; Zanela, M.B.; Fruscalso, V.; Ribeiro, M.E.R.; Stumpf, W.J.; Silveira, I.D.B.; Barbosa R.S. (2006). Blood chemical composition of cows producing unstable non-acid milk. In: International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista de Ciências Veterinárias**. Pirassununga, v.4, p.53.
- Fischer, V., Ribeiro, M.E.R., Zanela M.B., Marques L.T., Abreu A.S. de, Machado S.C. et al. (2012). Leite instável não ácido um problema solucionável? **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. v.13, p. 838-849.
- Fonseca, L, F. L. Santos, M. V. (2000). Qualidade do Leite e Controle da Mastite. São Paulo; Lemos Editorial, 175 p.
- Fonseca, L. F. L. & Santos, M. V. (2007). Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. - Barueri, SP: Manole; Pirassununga,SP: Ed.dos autores, p. 163-171.
- Fox, P.F.; Brodkorb, A. (2008). The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v.18, p.677-684.
- Fruscalso, V. (2008). Influência da Ofertada Dieta, Ordem e Estádio de Lactação Sobre as Propriedades Físico-químicas e Microbiológicas do Leite Bovino e a Ocorrência de Leite Instável Não Ácido. 2008. 147p. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Programa de**

- pós-graduação em Zootecnia. Universidade do Estado do Rio Grande de Sul, Porto Alegre.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, v.45, p.473–483
- Goff, D. (2006). University of Guelph. Dairy Science and Technology. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>.10/05/2006.
- Haque, Z.; Kinsella, J.E. (1988). Interaction between heated  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. **Journal of Dairy Research**, v.55, p.67-80.
- Holt, C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, v.43, p.63-151.
- Holt, C.; Horne, D.S. (1996). The hairy casein micelle evolution of the concept and its implication for dairy technology. **Netherlands Milk and Dairy Journal** v.50, p.85-11.
- Horne, D.S. (1987) Ethanol stability of casein micelles – a hypothesis concerning the role of calcium phosphate, **Journal of Dairy Research** v.54, p.389-395.
- Horne, D.S. (1998). Casein interactions : Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**. v.8, p.171- 177.
- Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.11, p.148–153.
- Horne, D.S.; Muir, D.D. (1990). Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Research**.v.46, n.3, p.433-439.
- Horne, D.S.; Parker, T.G. (1981). Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 2, p. 273-284.
- Horne, D.S.; Parker, T. G. (1983). Factors affecting the ethanol stability of bovine skim-milk. VI. Effect of concentration. **Journal of Dairy Research** v.50, p.425-432.
- Hurley, W.L. (2006). *Milk Composition & Synthesis: Physicochemical properties*. Resource

Libray.University of Illinois, Disponível em:

< <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/Milkcompsynth/milkcompsyn> thresources.html >

Laemmli, U.K.; Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. **Journal of Molecular Biology**, v.80, p.575\_599.

Lin, M.J.; Lewis, M.J.; Grandison, A.G. (2006). Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**. v.59, nº 3, p. 192-199.

Lopes, L. C. (2008). Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo. Pirassununga. **Dissertação de mestrado em Qualidade e Produtividade Animal**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo.

Machado, S.C. (2010) Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino. **Tese de doutorado em produção Animal**. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Marques, L.T.; Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Stumpf Junior, W.; Fischer, V. (2007). Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeitos sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v:13, p.91-97.

Mikheeva, L.M.; Grinberg, N.V.; Grinberg, V.Y.; Khokhlov, A.R.; de Kruif, C.G. (2003) Thermodynamics of micellization of bovine  $\alpha$ -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir** 19, 2913-2921.

Molina, L.H.; González, R.; Brito,C.; Carrillo, B.; Pinto, M. (2001). Correlación entre la termoestabilidad y proba de alcohol de la leche a nível de um centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 33, n.2, p.233 – 240.

Negri, L.M.N.R. (2002). Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que Inciden sobre la estabilidad térmica. **Tese. Facultad de Ingeniería Química**, Universidad Nacional Del Litoral, Argentina.

- O'connell, J. E.; Saracino, P.; Huppertz, T.; Uniake, T.; De Kruif, C. G.; Kelly, A. L. et al. (2006). Influence of ethanol on the rennet- induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v.73, p. 312-317.
- Oliveira, C.A.F.; de, Lopes, L.C.; Franco, R.C.; Corassin, C.H. (2011). Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.508-515.
- Oliveira, D.S.; Timm, C.D. (2006). Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26, p. 259-263.
- Oliveira, C.A.F., Lopez, L.C., Rosim, R. E., Fernandes, A.M. & Corassin, C.H. (2013). **Acta Scientiarum. Technology** . Maringa, v. 35, n. 1, p. 153-156.
- Palazolo, G.; Rodriguez, F.; Farrugia, B.; Pico, G.; Delorenzi, N. (2000). Heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin: structural changes studies by partitioning and fluorescence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 3.817-3.822.
- Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v.27,p. 201-212.
- Photchanachai, S. & Kitabatake, N. (2001). Heating of  $\beta$ -lactoglobulin. A solution in a closed system at high temperatures. **Journal of Food Science**, v.66, p.647-652.
- Ponce Ceballo, P. ; Hernández, R. (2001). Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, p. 58-68.
- Roma Jr., L.C.; Montoya, J.F.G.; Martins, T.T.; Cassoli, L.D.; Machado, P.F. (2009). Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.61, p.1411-1418.

- Sawyer, W.H. (1969). Complex of Beta-lactoglobulin and kappa-casein: a review. **Journal of Dairy Science** v.52, p.1347- 1355.
- Sgarbieri, V.C. (2005). Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p.43-56.
- Silva, P.H.F.; Almeida, M.C.F. (1998). Estabilidade térmica do Leite. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v.53, p 157-163.
- Silva, L.C.C., Beloti, V.,Tamanini, R., Yamada, A.K., Giombelli, C.J. & Silva, M.R. (2012). Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68,72, 75 e 78%, em leite bovino. *Revista Instituto Laticínios. “Cândido Tostes”* 67 55-60.
- 104.
- Singh, H. (2004) Heat-stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p. 111-119.
- Singh, C.B.; Sohi D.S.; Dhaka J.P. (1995). Impact of integrated dairy and crop production technologies in the rural households. Karnal: Operational Research Project, National Dairy Research Institute.
- Sobhani, S., Valizadeh, R. & Naserian, A. (1998). Alcohol stability of Milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science** 80  
**Journal of Dairy Science** 85, Suppl.
- Tronco, V.M. (1997). Manual para inspeção da qualidade do leite, (Ed. Universidade de Santa Maria).
- Tsioulpas, A., Lewis, M J.; Grandison, A.S. (2007). Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.167–173.
- Viero, V.(2008). Efeito da suplementação com selênio no perfil bioquímico sanguíneo e características físico-químicas do leite normal e do leite instável não ácido. Dissertação de Mestrado em Zootecnia-Produção animal, faculdade de Agronomia, Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.91p.

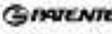
Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**. v.73, p. 1965–1979.

Zanela, M.B. (2004). Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do leite instável não ácido (LINA) 150p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Fischer V. (2009) Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 61, p. 1009- 1013.

## **CAPÍTULO III**

### **PATENTE DESENVOLVIDA**

05/08/2014 0000221405824080	860140131978 17:17 NPWD	BR 10 2014 019340 5	
Protocolo	Número	Código QR	
		INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Diretoria de Patentes Sistema e Patentes/Depósito	
		Tipo de Documento: Recibo de Petição Eletrônica	DIRPA Página: 1 / 2
Título do Documento: <b>Recibo</b>		Código: RECIBO	Versão: 01
DIRPA.FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição		Modo: Produção	
<p>O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa: Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:</p>			
<b>Dados do INPI:</b>			
Número de processo:	BR 10 2014 019340 5		
Número da GRUJ principal:	00.000.2.2.14.0562488.0 (serviço 200)		
Número do protocolo:	860140131978		
Data do protocolo:	05 de Agosto de 2014, 17:17 (BRT)		
Número de referência do envio:	52854		
<b>Dados do requerente ou interessado:</b>			
Tipo de formulário enviado:	DIRPA-FQ001 v.006		
Referência interna:	Detecção LINA		
Primeiro requerente ou interessado:	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL		
CNPJ do primeiro requerente ou interessado:	88.548.761/0001-03		
Número de requerentes ou interessados:	1		
Título do pedido:	KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO		

## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

Foram selecionadas sete amostras de LINA e o mesmo número de amostras de leite estável da ordenha individual de 98 vacas da raça Holandês em Caxias do Sul. As amostras foram padronizadas em volumes iguais, para serem utilizadas nos ensaios com cinco repetições. As amostras de leite foram encaminhadas em caixas isotérmicas contendo gelo para o laboratório de Microbiologia Aplicada, da Universidade de Caxias do Sul (UCS) para o desenvolvimento de “Kit”- teste, com o propósito de discriminar o leite com acidez adquirida, estável e LINA. Os “Kits”- testes serão apresentados em forma de patente.

## “Kit” e Método para Identificação do Tipo de Leite: Leite Estável e Leite Instável “Kit-LELI<sub>s</sub>” e Sistema Logístico para Coleta de Leite

Lelis Petrini Fortuna

Sergio Echeverrigaray Laguna

Anna Célia Silva Arruda

Luciana Bavaresco Andrade Touguinha

A presente invenção descreve “kits” e métodos para identificação do tipo de leite de uma amostra de leite, além de um sistema logístico para a coleta de leite. Particularmente, os kits e métodos da presente invenção permitem que sejam realizados testes em campo que identificam e diferenciam de forma rápida e eficiente as amostras de leite estável, leite instável não ácido e leite ácido. A presente invenção se situa no campo da química e agropecuária.

Existem três tipos de leites na propriedade rural, podendo ser captados pelo transportador em caminhões isotérmicos para a indústria captadora de leite nas propriedades rurais. Os três tipos de leite que podem ser produzidos e transportados até a indústria são:

(1) Leite normal ou estável: esse leite é o desejado por possuir caseína estável e utilizado para processamento UHT, pasteurização e derivados lácteos.

(2) Leite instável não ácido (LINA): é um tipo de leite não ácido com caseína instável. Pode ser utilizado para pasteurização e derivados lácteos, exceto para processamento UHT e queijo mussarela (até o presente momento).

(3) Leite ácido: é um leite com acidez adquirida devido a altas contagens bacterianas, onde o problema está relacionado ao manejo higiênico-sanitário. Por apresentar altas concentrações de ácido lático e baixa qualidade higiênica, este tipo de leite é descartado pela indústria e não pode ser utilizado para outra finalidade.

Nos últimos anos, tem se observado com certa frequência à positividade de leites não ácidos ao teste do etanol sem, entretanto, haver acidez elevada, isto é, acima de 18°D. A interpretação precipitada do resultado ao teste do etanol faz com que grandes quantidades de leite sejam descartadas, já que o LINA é interpretado erroneamente como sendo leite ácido. Assim, viabiliza-se que o LINA não seja descartado indevidamente, devido a falta de ferramenta para discriminação entre LINA e leite ácido, podendo ser aproveitado pelo produtor rural e pela indústria. O leite do tipo LINA, por possuir caseína instável, apresenta um fator positivo para o processamento de queijos e iogurtes sendo esta característica além de desejável, primordial para o processamento destes lácteos.

O sistema logístico para coleta de leite, também compreendido na presente invenção, torna viável ao produtor rural a separação e comercialização tanto do leite estável quanto do LINA.

A invenção apresenta três “kits” para identificação do tipo de leite que compreende pelo menos um reagente indicativo, podendo ser pelo menos um indicador de pH ou pelo menos um agente quelante, ou mistura de indicadores de pH que apresentem faixa de pH de variação de cor.

As bases teóricas- científicas serviram de referência para as patentes de invenção, uma vez que toda pesquisa tem por objetivo dar continuidade e subsídios para novos estudos e aplicações. Neste sentido, os kits de identificação de Leites Estáveis e Leites Instáveis denominados de “Kit” de identificação de LELI<sub>s</sub> têm uma teoria bem fundamentada por vários autores, porém nunca foi utilizado para diferenciar ou discriminar LINA de leites ácido e estável. Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de concretizações de “kits” e métodos para identificação do tipo de leite de uma amostra, além de um sistema logístico para a coleta de leite, a fim de evitar desperdícios indevidos e interpretações equivocadas acerca do tipo de leite.

A presente invenção apresenta um sistema logístico para coleta de leite, que compreende pelo menos um veículo de coleta que compreende pelo menos um compartimento de coleta para acondicionar um volume de leite estável e pelo menos um compartimento de coleta para acondicionar um volume de leite instável não ácido (LINA), em que o volume de cada um dos compartimentos se mantém separados.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução.

**“Kit” e Método nº 1: Método de identificação do leite instável não ácido (LINA) através de “kit” – substância A.**

A tecnologia baseia-se na utilização de um “Kit” de identificação do leite instável não ácido (LINA), utilizando a “substância A” como agente sequestrador do cálcio. Esse “kit”-test é confirmatório do LINA, utiliza-se após o teste do etanol nas concentrações estabelecidas por no mínimo 72% (v/v) (BRASIL, 2011). Pode ser realizado nas propriedades rurais e indústrias lácteas por diferenciar o leite instável não ácido (LINA) do leite com acidez adquirida.

**“Kit” e Método nº2: Método de identificação do leite instável não ácido (LINA) através de “Kit” - substância B.**

A metodologia baseia-se na utilização de um “Kit” de identificação do leite instável não ácido (LINA), utilizando pelo menos uma substância indicadora de pH. . Esse “Kit” tem por objetivo detectar aumentos na concentração de ácido láctico formado pela fermentação da lactose. Dessa forma, após a obtenção da amostra de leite utiliza-se esse “kit”, a qual diferencia os tipos de leite: estável, LINA e, leite com acidez adquirida. Contudo o resultado é

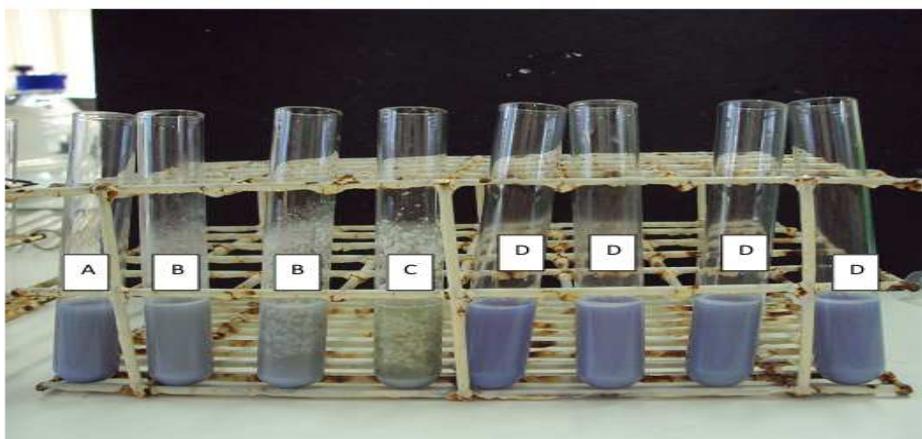
eficaz, ou seja, a solução final apresentará cores distintas e formação de coágulos para o LINA.

**“Kit” e Método nº3: Método diagnóstico de identificação do leite instável não ácido (LINA), de leite estável e, leite ácido através de “Kit” – substância C.**

A metodologia sugere a utilização de um “Kit” que classifica os diferentes leites: leite estável, ácido e LINA através de substância indicador misto de cor.

- As cores obtidas são comparadas com um padrão de cor:
- Leite muito ácido: verde para pH abaixo de 6,2;
- Leite ácido: cinza para faixas de pH entre 6,2 a 6,5;
- Leite Estável e LINA: roxa para faixas de pH entre 6,6 a 6,8.

Os dois tipos de leites apresentam coloração roxa nesta faixa de pH. O LINA pode ser diferenciado do leite estável por apresentar formação de coágulos ou grumos, enquanto que o leite estável permanecerá uma dispersão homogênea.



**Figura 1:** (A) leite estável pH 6,6 a 6,8; (B) leite com faixa de pH entre 6,2 a 6,5; (C) leite com pH abaixo de 6,2; (D) LINA

## Sistema Logístico para Coleta de Leite Compreendendo uso de “Kit” e Método para Identificação do Tipo de Leite de uma Amostra

A coleta de leite pelo transportador numa propriedade rural demanda que seja identificado qual o tipo de leite que está sendo coletado e comercializado. Com a realização somente do teste do etanol antes da coleta do leite, não é possível identificar entre os leites que apresentam resultado positivo ao teste de etanol, qual amostra se trata de leite ácido de fato e qual se trata de leite instável não ácido (LINA).

O uso do “kit” e método para identificação do tipo de leite permite que o LINA possa também ser comercializado ao invés de ser descartado juntamente com o leite ácido. Assim, o transportador de leite realiza o método para identificação do tipo de leite que compreende pelo menos duas etapas selecionadas dentre: coleta de uma alíquota de amostra de leite; adição de “kit “ para identificação de leite conforme definido anteriormente; realização de teste de etanol 72% (v/v).

O leite identificado como normal ou estável é armazenado no compartimento específico para coleta do veículo, e destinado para processamento em altas temperaturas (UHT). O leite identificado como LINA é armazenado no compartimento específico para coleta do veículo, e destinado para pasteurização e derivados lácteos. O leite identificado como ácido é descartado.

Dessa forma, o sistema logístico para coleta de leite compreende:

- pelo menos um veículo de coleta que compreende pelo menos um compartimento de coleta para acondicionar um volume de leite estável e pelo menos um compartimento de coleta para acondicionar um volume de leite instável não ácido, em que o volume de cada um dos compartimentos se mantém separado.

O veículo de coleta compreende pelo menos um sistema de canalização em comunicação fluida com cada um dos recipientes de coleta, em que os sistemas de canalização atuam de forma independente entre si e atuam no transporte de fluido entre a fonte do leite e o recipiente de coleta do veículo e no transporte de fluido entre o recipiente de coleta do veículo e o sistema de recepção do leite.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos nesse estudo e, considerando o objetivo proposto, pode-se concluir que:

- . a positividade para LINA não implica em alterações na composição físico-química, contagem bacteriana total, mastite e, contagem de células somáticas.
- . não houve variação significativa para a produção de leite em relação aos dois tipos de leite (estável e LINA).
- . o perfil eletroforético das proteínas do LINA demonstra não ser o fator responsável pela desestabilização da micela de caseína.
- . a concentração ideal de etanol para distinguir o LINA do leite estável é igual a etanol 72% (v/v).
- . com relação ao teste de estabilidade térmica, o leite estável e o LINA obtiveram o mesmo comportamento para o teste de etanol a 72% (v/v), mostrando que os dois testes não estão correlacionados.
- . o etanol atua como base em pH baixo, formando alcoóis protonados  $R - OH^+$  e em valores mais elevados de pH, pode atuar como ácido, perdendo  $H^+$  formando íon alcóxido  $RO^-$ , o ponto no qual ocorre a mudança de comportamento do etanol é em aproximadamente 62% (v/v) de etanol;
- . a concentração de íons cálcio é um fator de interferência importante na estabilidade do leite, o cálcio é compartilhado com o equilíbrio de precipitação do fosfato de cálcio, desestabilização da ligação fosfoserina e quelação com o citrato;
- . de acordo com a relação molar Ca/P, os equilíbrios podem se manter estáveis ou desestabilizar a micela. Para a relação ideal, sugere-se que concentrações próximas ou superiores a 1,5/1 aumentam a possibilidade de desestabilização da caseína, e consequente

resultado positivo ao teste do etanol;

. o presente estudo deu origem a uma patente de invenção designada “Kit” e método para identificação do tipo de leite: leite estável e leite instável “Kit Leli<sub>s</sub>” e sistema logístico para coleta de leite, o qual diferencia de forma rápida e eficiente as amostras de leite estável, LINA e ácido.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho descreve métodos inéditos e inovadores para a discriminação de leite normal, ácido e LINA através de um ensaio utilizando o teste do etanol, indicador misto de pH e solução com íon quelante. Esses métodos estão protegidos pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), com o N° de registro BR 1020140193405. Os métodos são simples, práticos e de fácil aplicação na propriedade rural no momento da coleta do leite pelo transportador e na indústria de lácteos. Dessa forma evitam-se prejuízos ao produtor rural que tem seu leite rejeitado e ganho econômico para a indústria láctea, uma vez que o LINA poderá ser canalizado para a pasteurização, produção de queijos e de derivados lácteos, agregando valor socioeconômico na cadeia produtiva do leite. Estes métodos proporcionam de maneira segura a utilização do LINA na melhoria da qualidade de vida das populações rurais e da agropecuária familiar de países em desenvolvimento como o Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, A.S. (2008) Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey. **Dissertação de mestrado em Zootecnia** na Faculdade de Agronomia - UFRGS - Porto Alegre – RS, Brasil.
- Aires, T.A.C.P. (2010). Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. **Dissertação de mestrado Integrado em Medicina Veterinária**, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2007). Official Methods of Analysis. 19 th Edition. Washington, DC.
- APHA - American Public Health Association; American Water Works Association, Water Environment Federation. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22. ed. Denver: A. D. Eaton, E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Clesceri.
- Arcuri, E.F. (2003). Influência de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: Brito, J.R.F; Portugal, J.A.B.(Eds.) Diagnóstico da Qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. 1 ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite.p 105-115.
- Arcuri, E.F; Tavares, W.P.P; Pereira, D.B.C; Brito, M.A.V.P. (2004). O Compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo-RS: UPF Editora. **I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite - I CBQL**, 2004, Passo Fundo-RS, Brasil.
- Arcuri, E.F; Silva, P.D.L, Brito, M.A.V.P; Brito, J.R.F; Lange, C.K; Magalhães, M dos Anjos. (2008) Contagem, Isolamento e Caracterização de bactérias psicrotróficas co ntaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural* v.38, p. 2250 -2255.

- Barbosa, R.S.; Krolow, A.C.R.; Ribeiro, M.E.R.; Dellinghausen, C.; Zanela, M. B.; Fischer, V.; Hausen, L.J.V. (2006). Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do queijo tipo minas frescal. In: Primeiro Encontro de Iniciação Científica e Pós-graduação, Anais. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.
- Barbosa, R.S. (2007). Métodos de Armazenamento de Leite e Horários de Análise Para Determinação de Cálcio Iônico. **Dissertação de Mestrado**. – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. Brasil.
- Barbosa, J.G.; Gonzaga Neto.; Queiroga, R.C.R.E.; Medeiros, A.N.; Pereira, V.O.; Costa,T.P.; Lima, J.S.B.(2010). Características físico-químicas e sensoriais do leite de vacas Sindi suplementadas em pastagem. **Revista Brasileira de saúde e Produção Animal**, v.11, p. 362-370.
- Barbosa, R.S. (2011). Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no teste do álcool. **Tese de doutorado** em Zootecnia e Produção Animal da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. Brasil.
- Barbosa, R.S.; Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Zanela, M.B.; Stumpf, M.T.; Kolling, G.J.; Schafhäuser, J. Jr.; Barros, L.E.; Egito, A.S. (2012). Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.47, p.621-628.
- Barros, L.; Denis, N.; González, O.; Galain, C. (1999). Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. *Práticas Veterinárias. Publicación del Centro Veterinario de Florida-Uruguay*, n.9, 315p.
- Barros, L.; González, O.; Galain, D.; González, P.; Torres, E.; Denis, N.; et al. (2000). Variaciones de la leche y prueba del alcohol. In: XXI Congresso Mundial de Buiatria, Anais Punta del Este – Uruguay.
- Barros, L. (2001). Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite.). In: González,

- F.H.D.; Dürr, J.W.; Fontaneli, R.S.(Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, pp.44-57.
- Barros, L. (2002). Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais (sangue, leite e urina). In: Congresso Nacional de Medicina Veterinária, 29., Gramado. Anais... Gramado, p.18-26.
- Barrow, G.I.; Feltham, R.K.A. (1993). Cowan and Steel manual for the Identification of medical bacteria.3rd Edn., Cambridge University Press, London, UK.
- Botaro, B.G.; Lima, Y.V.R. de; Aquino, A.A. et. al. (2007). Polimorfismo da betalactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.747-753.
- Botaro, B.G.; Lima, Y.V.R. De; Cortinhas, C.S.; Silva, L.F.P.; Renno, F.P.; Santos, M.V. (2009). Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2447-2454.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. p 248-254.
- Brammer, S.P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 13p, 2001. Disponível em:  
<[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do06.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm)>. Acessado em: 13 set. 2013.
- Brasil. (1997). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico Mercosul de identidade e qualidade do queijo Minas frescal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, p.19684. Seção I.
- Brasil. (1981). Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária.

Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite fluido. In: Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, v. II, cap. 14.

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

Brasil. (2006). Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Instrução normativa Nº 68, de 12 dezembro de 2006. In: Brasil (Ed.). **Diário Oficial da União**. Brasília.

Brasil (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Alteração do Caput da Instrução Normativa Mapa nº51 de 18 de setembro de 2002. (Instrução Normativa nº 62). Brasília.

Bueno, V.F.F.; Mesquita, A.J.; Oliveira, A.N.; Nocolau, E.S.; Neves, R.B.S. (2008). Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e o período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, p. 40-44.

Chavez, M.; Negri, L.; Taverna, M.A.; Cuatrín, A. (2004). Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**. v.71, p. 201-206.

Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias. Bioquímica – Propiedades funcionales – valor nutricional – Modificaciones químicas. Traducido del original francés por el Dr. Francisco López Capont. Zaragoza – Espanha: Editorial Acribia AS.

Conceição, R.C.S.; Marques, L.T.; Gandra, E.A. et al. (2001). Correlação entre as provas do álcool e da acidez titulável para amostras de leite com síndrome do leite anormal (SILA).

In: 18 Congresso de Iniciação científica, UFPel. **Anais**. Pelotas, RS, Universidade

Federal de Pelotas.2001.

Costabel, L.M.; Cuatrín, A.L.; Paez, R.B.; Taverna, M.A.; Walter, E.; Campos, S.N.; Robledo, M.; Adorni, B. Estudio de la relación entre aptitud a La coagulación pro cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. In:52 Conferência Internacional do Leite Instável, 1.,2009. Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 1 CD-ROM

Cunha, R.P.L. et al. (2008). Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p. 19-24.

De Kruif, C. G.; Huppertz, T.; Urban V. S.; Petukhov A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, p. 36–52.

Donatele, D.M.; Vieira, L.F.P.; Folly, M.M. (2003) Relação do Teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite “in natura” de Vaca com Acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 95 – 100.

Egito, A.S.; Girardet, J.M; Miclo, L.; Mollé, D.; Humbert, G.; Gaillard, J.L. (2001). Susceptibility of equine  $\kappa$ —and  $\beta$ -caseins to hydrolysis by chymosin. **International Dairy Journal**, v.11, p. 885-893.

Egito, A.S.; Miclo, L.; López, C.; Adam, A.; Girardet, J.M.; Gaillard. J.L. (2002). Separation and characterization of mares milk  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  caseins,  $\gamma$ -casein like, and proteose peptone component 5-like peptides. **Journal Dairy Science** v.85, p.697-706.

Egito, A.S.; Rosinha, G.M.S.; Laguna, L.E.; Miclo, L.; Girardet, J.M. ; Gaillard, J.L. (2006). Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.

Egito, A.S.; Girardet, J.M.; Laguna, L.E.; Poirson, C.; Mollé, D.; Miclo, L.; Humbert, G.;

- Gaillard, J.L. (2007). Milk- clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**, v. 17 , p. 816-825.
- Philpot, W.N.; Nickerson,S.C. (2002).Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Ed. Milkbizz.
- Fischer, V. (2005). Incidência, caracterização, quadro experimental e tratamento do leite instável não ácido (Lina) no Rio Grande do Sul. In: Relatório Técnico Final das Atividades Desenvolvidas Relativas ao Projeto 474974/2003-0. 70 p.
- Fischer,V.; Marques, L.T.;Zanela, M.B.; Fruscalso, V.; Ribeiro, M.E.R.; Stumpf, W.J.; Silveira, I.D.B.;Barbosa R.S. (2006). Blood chemical cpmposition of cows producing unstable non-acid milk. In: International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista de Ciências Veterinárias**. Pirassununga. v.4, p.53.
- Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Zanela, M.B.; Marques, L.T.; Abreu, A.S.; de, Machado, S.C.; Fruscalso, V.; Barbosa, R. S.; Stumpf, M.T. (2012). Leite instável não ácido um problema solucionável? **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**. v.13, p. 838-849.
- Fonseca, L.F.L.; Santos, M.V. (2000). Qualidade do Leite e Controle da Mastite. São Paulo; Lemos Editorial, 175 p.
- Fox, P. F.; Mcsweeney, P.L.H. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. **Blackie Academic & Professional**, London.
- Fox, P.F.; Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v.18, p. 677-684.
- Fruscalso, V. (2008). Influência da oferta da dieta, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite bovino e a ocorrência do leite

- instável não ácido. **Dissertação de mestrado em Zootecnia e Produção Animal** da Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 473–483.
- González, F. H. D. (2001). Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: \_\_\_\_\_ **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. p. 5-21.
- González, F.H.D.; Silva, S.G. (2006). **Introdução à bioquímica Clínica Veterinária.** 2 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 358 p.
- Horne, D.S.; Parker, T.G. (1981). Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v.48, p. 273-284.
- Horne, D.S.; Muir, D.D. (1990). Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal Dairy Science.** v.73, p. 3613-3626.
- Horne, D.S. (1992). Ethanol stability. In **advanced dairy Chemistry-1 Proteins**, p-657-689.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Indicadores IBGE, Estatística de Produção Pecuária, novembro de 2014.
- Hurley, W.L. (2006). Milk Composition & Synthesis: Physicochemical properties. Resource Libray.University of Illinois, Disponível em:  
<[http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/Milkcompsynth/milkcompsyn\\_hresources.html](http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/Milkcompsynth/milkcompsyn_hresources.html)>
- Kolling, J.G. (2012). Influência da mastite na qualidade do leite e leite Instável não ácido em diferentes quartos mamários. **Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária.** Universidade Federal do Rio Grande do sul. UFRGS-Porto Alegre-RS.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage Ty. **Nature**, v. 227, p. 680 -685.

- Laemmli, U. K.; Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA
- Langoni, H.; Penachio, D da S.; Citadella, C.C.; Laurino, F.; Martins, P.Y.F.; Lucheis, S.B.; Menozzi, B.D.; Silva, A.V. (2011). Asp ctos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 31, p.1059-1065.
- Langoni, H. (2013). Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, p. 620-626.
- Leitner, G., Merin, U.; Silanikove, N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 648- 54.
- Lin, M.J.; Lewis, M.J.; Grandison, A.G. (2006). Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal Dairy Technology.**, v. 59, p.192-199.
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, p. 73–83.
- Lopes, L. C. (2008). Composi o e características físico-químicas do leite instável não  cido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo. Pirassununga. **Disserta o de mestrado em Qualidade e Produtividade Animal**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.Universidade de São Paulo.
- Machado, S.C. (2010). Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino. **Tese de doutorado em produ o Animal**. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Marques, L. T. (2004). Ocorrência do leite instável não  cido (LINA) e seu efeito sobre a composi o química e aspectos físicos. **Disserta o de mestrado em Zootecnia-Produ o Animal**. – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas.
- Marques, L.T.; Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Stumpf Junior, W.; Fischer, V. (2007). Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não  cido (LINA) e efeitos sobre os aspectos

- físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, p.91-97.
- Marx, I.G.; Lazzaroto, T.C.; Drunkler, D.A.; Colla, E. (2011). Occurrence of Non-acid Unstable Milk in west region of Parana. **Revista Ciências Exatas e Naturais** 13. 1-10.
- Mathiev, J.(1985). Comportamento físico-químico de la leche mantenida a baja temperatura. **Revista Española de Lacheria**, n.1, p. 33-37.
- Martins, R.P.; Silva, J.A.G.; Nakazato, L. et al. (2010). Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microregião de Cuiabá, MT. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.11, p. 181- 187.
- Mclean, D.M., Graham, E.R.B., Ponzoni, R.W., Mckenzie, H.A. (1984) Effects of milk protein genetic-variants on milkyield and composition. **Journal of Dairy Research**, v.51, p.531-546.
- Mikheeva, L.M.; Grinberg, N.V.; Grinberg, V.Y.; Khokhlov, A.R.; de Kruif, C.G. (2003) Thermodynamics of micellization of bovine  $\alpha$ -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir** v.19, p. 2913-2921.
- Molina, L.H.; González, R.; Brito,C.; Carrillo, B.; Pinto, M. (2001). Correlación entre la termoestabilidad y proba de alcohol de la leche a nível de um centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia. v.33, p.233 – 240.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2011). *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ed. Porto Alegre: Artmed. p. 425.
- Negri, L.; Chavez, M.; Taverna, M.; Roberts, L.; Speranza, J. (2001) Factores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol em leche cruda de calidad higiénica adecuada. Informe técnico final del projeto. INTA EEA/Rafaela – INTI CITIL Rafaela.
- Negri, L.M.N.R. (2002). Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

- Nero, L.A.; Viçosa, G.N.; Pereira, F.E.V. (2009). Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29(2), p.386-390.
- Ogola, H. et al. (2007). Effect of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal Veterinary Science**. v. 8, n. 3, p. 237-242.
- Oliveira, D.S.; Timm, C.D. (2006). Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26, p. 259-263.
- Oliveira, D.S.; Timm, C.D. (2007). Casein instability in milk without acquired acidity. **Magazine Portuguese Veterinárias of Sciences**. v.102, p. 17-22.
- Oliveira, C.A.F.; de, Lopes, L.C.; Franco, R.C.; Corassin, C.H. (2011). Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.508-515.
- Oliveira, J.M.B; Vanderlei, D.R; Moraes, W.S; Brandespin, D.F; Mota, R.A; Oliveira, A.A; Medeiros, E.S; Pinheiro, J.W Junior. (2012) Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 32, p. 391-395.
- Oliveira. C.A.F.; Lopez, L.C.; Rosim, R. E.; Fernandes, A.M.; Corassin, C.H. (2013). **Acta Scientiarum Technology** . Maringa, v. 35, n. 1, p. 153-156.
- Ordoñez, M. I. C.; Álvarez, L. F.; Sanz, M. L. G.; Minguillón, F. D. G. F.; Perales, L. H.; Cortecero, M. D. S. (2005). Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: \_\_\_\_\_ **Tecnologia de alimentos**. Tradução: Maria Murad. Porto Alegre/RS/Brasil: Artmed, v. 2, p. 13-40.
- Pecorari, M.; Fpssa E., Avanzini, G.; Marian, P. (1984). Milk with abnormal coagulation: acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. **Sci. Tec. Latt. Cas**. pp.263-278.

- Peters, M.D.; de Paula; Silveira, I.D.B.; Pegoraro, C.; Pedroso, C.E.; Silva, D.A.; Lourenço, L.A.; Casagrande, M. (2012). Perfil eletroforético qualitativo das proteínas do leite de vacas submetidas a manejo aversivo. **Revista Thema**.09 (01).
- Philpot, N.W.; Nickerson, S.C. (2002). Vencendo a luta contra a mastite. **Ed. Westfalia Landtechnik do Brasil**.
- Ponce Ceballo, P. (2000). Síndrome do leite anormal e qualidade do leite. In: 1ºCurso *on line* sobre qualidade do leite do Instituto Fernando Costa. <http://www.milkpoint.com.br> acesso em nov. 2014.
- Ponce Ceballo, P.; Hernández, R. (2001). Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Ed. Félix h.d. González et al., Porto Alegre.
- Ribeiro, M.E.R.; Stumpf JR., W.; Buss, H.; Alves, G.C.; Martins, P.R.; De conto, O. (2000). Qualidade de leite. In: Bitencourt, D.; Pegoraro, L.M.C.; Gomes, J.F. **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 175-195.
- Ribeiro, M.E.R.; Petrini, L.A.; Aita, M.F. (2003). Relação entre mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, p. 287-290.
- Ribeiro, M.E.R.; Krolow, A.C.R.; Barbosa, R.S; (2006). Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: 9º Congresso Brasileiro de Qualidade do leite. Goiânia-GO: Gráfica e Editora Talento.
- Ribeiro, M. E. R.; Krolow, A.C.R.; Barbosa, R.S; Borges, C. D.; Zanela, M B.; Fischer, V.; Hausen, L.J.V. (2007). Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. **Disponível (Online)**

<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p018.pdf>. 13 de dezembro 2013.

Ribeiro, M.E.R.; Kolling, G.J.; Zanela, M.B. et al. (2011). Monitoramento da mastite em um rebanho Jersey no sul do Rio Grande do Sul - Resultados parciais 201. In: XIV Fórum de Produção pecuária Leite e I Salão de Trabalhos Científicos. **Anais...**p.201-206.

Roma Júnior, L.C.; Zago, C.A.; Rodrigues, A.C.O.; Cassoli, L.D.; Machado, P.F.(2007). Estudo da proteína do leite em termos de qualidade e quantidade.

**Disponível (Online)** <http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p044.pdf>: (13 de dezembro).

Robitaille, G.; Britten, M.; Petitclerc, D. (2001). Effect of a differential allelic expression of kappa-casein gene on ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.145-149.

Rollema, H.S. (1992). Casein association and micelle formation, In: Advanced Dairy Chemistry, Vol.1: Proteins (ed. P.F. Fox), Elsevier Science Publisher, Ltd., Essex, p. 111-140.

Santos M.V. (2012). Cuidados com higiene melhoram contagem bacteriana total. Mundo do Leite v.55, 13-16.

Santos, M.V.; Laranja, F.L.F. (2001) Importância e efeito de bactérias psicrotólicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, p.13-19.

Santos, M.V.; Fonseca, L.F.L. (2007). **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1 ed. Barueri: Manole.

Sgarbieri, V.C. (1996). **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo – SP: Livraria Varela.

Sgarbieri, V. C. (2005) Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 8, p. 43-56.

Singh, H. (1995) Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins. In HEAT induced changes in milk. 2 ed. Brussels: International Dairy Federation. P. 86 – 143

104.

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

Sobhani, S.; Valizadeh, R.; Naserian, A. (1998). Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 80, Suppl. 1/**J. Dairy Science** v. 85, Suppl. 1.

Sobhani, S.; Valzadeh, R.; Naserian, A. (2003) The effect of intravenous infusion of glucose on ethanol stability of milk in Holstein dairy cows.

Disponível em:>[http:// www.bsas.org.uk/meetings/annlproc/pdf 2003/132.pdf](http://www.bsas.org.uk/meetings/annlproc/pdf_2003/132.pdf)>.

Acesso em: jun. 2013.

Stumpf J.R. (2000). W. Produção de leite no Rio Grande do Sul: produtividade e competitividade frente mercosul. In: **Anais do V Ciclo de Palestras em Produção e Manejo de Bovinos: ênfase em reprodução e alimentação de bovinos de leite**. Canoas, Ed. ULBRA, p. 19-30.

Stumpf, M.T. (2012) O uso de aditivos e variação do consumo de alimentos na dieta de vacas leiteiras sobre a composição e estabilidade do leite. **Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre.

Stumpf, M.T; Fischer, V.; Kolling, G.J.; Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Abreu, A.S. (2013). Metabolic Attributes, Yield and Stability of Milk in Jersey Cows Fed Diets Containing Sodium Citrate and Sodium Bicarbonate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, n.5, p. 564 – 467.

Tsioulpas, A., Lewis, M J & Grandison, A.S. (2007). Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.167–173.

Tronco, V.M. (1997). Manual para inspeção da qualidade do leite. Ed. Universidade de Santa Maria. 166 p.

- Velloso, C.R.V. (1998). Noções básicas da acidez In: Brito, J.R.F.; Dias, J.C. (Ed.) A qualidade do leite. Juiz de Fora: EMBRAPA/São Paulo: Tortuga, p. 91-98.
- Viero, V.(2008). Efeito da suplementação com selênio no perfil bioquímico sanguíneo e características físico-químicas do leite normal e do leite instável não ácido. Dissertação de Mestrado em Zootecnia-Produção animal, faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.91p.
- Viero, V.; Fischer, V.; Machado, S.C.; Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Barbosa, R.S.; Stumpf JR, W.; Cobuci, J.A. (2010). Efeito da suplementação com diferentes níveis de selênio orgânico e inorgânico na produção e na composição do leite e no sangue de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2.
- Waldner, D. N.; Stokes, S. R.; Jordan, E. R.; Looper, M. L. Ma-naging milk composition: normal sources of variation. Oklahoma Coopera-tive Extension Service ANSI-4016, Disponível em <http://www.osuextra.com>. Acesso em set/2014.
- Walstra, P.; Jenness, R. (1984). Química y física lactológica. Editorial Acribia (Zaragoza), 423p.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, p. 189-192.
- Walstra, P.; Wouters, J.T.M.; Geurts, T.J. **Dairy Science and Technology**. (2006). 2ed. Boca Raton: CRC Press.
- Werncke, D. Perfil das propriedades e ocorrência de leite instável não ácido na região do Vale do Braço do Norte, sul do estado de Santa Catarina. (2012). **Dissertação de Mestrado em Ciência Animal** - Área: produção Animal - Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages.

- Whist, A.C.; Osteras, O.; Solverod, L. (2006). Clinical mastitis in Norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. **Journal Dairy Science** v. 89, p. 4649-4659.
- Ye, A. (2011) Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. *International Dairy Journal*, v.21,p. 14- 20.
- Yoshida, S. (1980). Studies in the Utrecht abnormality of milk in the Miyuki. **Dairy Farm. Journal Japanese Applied Biology Science Hir. University** v.19, p. 39-54.
- Zanela, M.B. (2004). Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA). **Tese de doutorado em Zootecnia e Produção Animal** da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel. Pelotas.RS.
- Zanela, M.B.; Fischer, V.; Ribeiro, M.E.R.; Barbosa, R.S.; Marques, L.T.; Junior, W.S.; Zanela, C. (2006). Leite instável não ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p. 1 -11.
- Zanela, M.B.; Ribeiro, M.E.R.; Fischer, V. (2009). Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61., p. 1009- 1013.