

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

JOSLAINE APARECIDA DEZONE

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO LEITE NA PROVA DO ALIZAROL PARA A  
DETECÇÃO DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA)

PONTA GROSSA  
2019

JOSLAINE APARECIDA DEZONE

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO LEITE NA PROVA DO ALIZAROL PARA A  
DETECÇÃO DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Produção Animal.

Orientador (a): Prof. Dr. Adriana de Souza Martins

PONTA GROSSA  
2019

JOSLAINE APARECIDA DEZONE

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DO LEITE NA PROVA DO ALIZAROL PARA A  
DETECÇÃO DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para a obtenção do título de graduação em  
Zootecnia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Produção Animal - Zootecnia.

Ponta Grossa, 14 de junho de 2019

---

Adriana de Souza Martins - Orientadora

Doutorado em Produção Animal – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho – UNESP -  
Jaboticabal

---

Victor Breno Pedrosa

Doutorado em Zootecnia – Universidade de São Paulo - USP

---

Erisa Spinard

Graduação em Zootecnia – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico aos meus pais Jorge e Rosane por me apoiarem e acreditarem em mim, aos meus irmãos Gustavo, Kettlyn e Cristian por todo apoio, ao meu namorado Carlos Rafael pelo apoio e carinho e minha cunhada Maria pelo incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu a vida.

Aos meus pais Jorge Augusto Dezone e Rosane de Jesus Juscinski Dezone, por todo apoio, carinho, dedicação, esforço, incentivo, confiança, respeito, que nunca mediram esforços pra me proporcionar uma vida digna, por sempre acreditarem em mim. Agradeço por todo conhecimento, educação e caráter que me ensinaram, com certeza levarei pra toda minha vida. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Gustavo Dezone, Kettlyn Rayane Dezone e Cristian Andrei Dezone por todo carinho, confiança e apoio.

Ao meu namorado Carlos Rafael Silva de Almeida por todo carinho, apoio, dedicação, incentivo e confiança depositada em mim.

Aos meus vizinhos Anderson (Bim), Regina Thaís Bastos, Joice Rodrigues, Rafael de Souza Aliski pelo apoio, companheirismo, confiança, pelas horas de conversas, brincadeiras e descontração.

A Prof. Dr Adriana de Souza Martins, pela contribuição dos seus conhecimentos, pela sua orientação, pelas suas idéias durante o experimento, por acreditar na minha competência e por todo apoio prestado durante a minha vida acadêmica.

A Fabiane Saad Talegnani, Caroline de Almeida Ribas, Fernanda Antunes Martins colegas de graduação, pelo apoio, incentivo, companheirismo, a amizade durante esse período, pelas conversas e momentos de descontração.

## RESUMO

Diante do constate aumento do consumo de leite e derivados, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade e procedência dos alimentos consumidos. Sendo assim é crescente a preocupação das indústrias de laticínio com a qualidade da matéria prima recebida. Uma das causas de alterações da qualidade é perda da estabilidade do leite. Diante disso, objetivou-se avaliar a influência da temperatura do leite (5° e 12° C) na prova do alizarol para a detecção do LINA e a sua relação com a composição e a contagem de células somáticas (CCS) do leite. Foram avaliadas 189 amostras de 20 vacas da raça Holandesa e mestiças Holandês x Jersey x Illawarra, durante os meses de março, abril, maio e primeira semana de junho, colhidas na ordenha da manhã (8:00 h) no setor de bovinocultura de leite na Fazenda Escola Capão da Onça. As amostras que foram consideradas LINA, apresentavam o seguinte comportamento, coagulação a prova do álcool na concentração de 72% e coloração pardo avermelhada. Foram realizadas análises de acidez titulável, pH, Alizarol à 72%, composição e CCS. A instabilidade do leite não causou alterações nos parâmetros avaliados para a composição do leite (gordura, lactose, proteína, N-uréico), da mesma forma não alterou a acidez natural do leite e não influenciou nos valores de CCS e pH. Em relação à temperatura das amostras foi observado que a medida que a temperatura do leite aumentou (12°C) a coagulação aumentou sua intensidade, isto porque a temperatura influencia na  $\beta$ -caseína alterando a sua migração. Ao avaliar a temperatura de 5 e 12°C foi observado que na temperatura de 12°C os casos positivos para LINA aumentaram, pois com a ação do calor há alterações no leite, sendo observado principalmente alterações no tamanho das micelas.

**Palavras-chave:** Acidez, coagulação, gordura, instabilidade, prova do álcool.

## ABSTRACT

Faced with the constant increase in the consumption of milk and dairy products, consumers are increasingly concerned about the quality and provenance of food consumed. Thus, the dairy industry's concern with the quality of the raw material received is growing. One of the causes of quality changes is loss of milk instability. The objective of this study was to evaluate the influence of milk temperature (5° and 12°C) on the alizarol test for the detection of LINA and its relation to milk composition and somatic cell count (CCS). A total of 189 samples of 20 holstein and crossbred Holstein x Jersey x Illawarra cows were evaluated during the months of March, April, May and the first week of June, harvested at 8:00 am in the dairy cattle breeding sector in Fazenda Escola Capão da Onça. The samples that were considered LINA, presented the following behavior, coagulation the alcohol test in the concentration of 72% and reddish brown coloration. Analyzes of titratable acidity, pH, Alizarol at 72%, composition and CCS were performed. The milk instability did not cause changes in the parameters evaluated for milk composition (fat, lactose, protein, N-ureic), nor did it alter the natural milk acidity and did not influence the values of CCS and pH. In relation to the temperature of the samples, it was observed that as the temperature of the milk increased (12 ° C), the coagulation increased its intensity, because the temperature influenced  $\beta$ -casein altering its migration. It was observed that at temperature of 12° C the positive cases for LINA increased because the alterations in the milk duet the heat action. Changes in the micelles sizewere observed.

**Key words:** Acidity, alcohol-proof, coagulation, fat, instability.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios dos teores de gordura, proteína, lactose, uréia, Contagem de Células Somáticas (CCS) e do pH e acidez titulável do leite em função da ocorrência (positivo) ou não (negativo) de LINA (Leite Instável Não Ácido) por meio da prova do alizarol ..... 16
- Tabela 2 – Valores médios do pH e da acidez titulável de amostras do leite em função da temperatura de armazenamento ..... 19
- Tabela 3 - Frequência relativa (%) da coagulação de amostras de leite submetidas ao teste do Alizarol, em função da temperatura do leite ..... 20
- Tabela 4 - Frequência relativa (%) da coloração de amostras de leite submetidas ao teste do Alizarol, em função da temperatura do leite ..... 21
- Tabela 5 - Frequência relativa (%) da ocorrência de LINA (Leite Instável Não Ácido) por meio da prova do alizarol em função da temperatura de armazenamento do leite ..... 22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
Ca	Cálcio
Ca:P	Relação Cálcio e Fósforo
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
Cels	Células
CMETL	Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite
dL	Decilitro
g	Gramas
IN	Instrução Normativa
LINA	Leite instável não ácido
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
P	Fósforo
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UHT	Ultra High Temperature
$\beta$	Beta
$\kappa$	Kappa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>23</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>

## 1. Introdução

Diante do consumo de leite e derivados, os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à qualidade e procedência dos alimentos. Sendo assim, é crescente a preocupação das indústrias de laticínios com a qualidade da matéria-prima recebida, uma vez que esta irá influenciar diretamente sobre as características do produto final. Uma das causas de alterações na qualidade do leite é a perda de estabilidade, que o torna impróprio ao processo de pasteurização, realizado na indústria. A estabilidade do leite refere-se à capacidade do mesmo em suportar o tratamento térmico, sem apresentar coagulação (BRASIL; NICOLAU e SILVA et al., 2015b).

Durante anos, a principal causa da perda da estabilidade do leite ocorria devido à ação de bactérias no leite causando acidez, quando o mesmo era armazenado sob temperaturas elevadas. No entanto, no início do século XXI, com a melhoria da qualidade do leite devido às boas práticas de manejo na propriedade, transporte adequado e o armazenamento em tanques de resfriamento, atendendo as exigências da legislação, problemas relacionados à instabilidade do leite passaram a ser indagados (ZANELA et al., 2017). Com estes avanços, o mercado de lácteos tornou-se mais atrativo, exigente e competitivo. Sendo assim, houve alterações nas legislações e a criação de Instruções Normativas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como, por exemplo, a criação da Instrução Normativa (IN) 51, que posteriormente foi substituída pela IN nº62, a qual foi substituída recentemente pelas IN nº76 e 77.

Dentre as exigências das IN nº76 e 77 está à realização do teste do alizarol no momento da coleta do leite, com o intuito de avaliar a estabilidade do leite na propriedade, antes do seu carregamento. De acordo com a legislação, o leite deve ser estável em álcool a 72%. Leite que coagula neste teste (resultado positivo para o teste do alizarol) resulta na condenação do produto pela indústria (ZANELA et al. 2017).

Apesar dos avanços quanto à melhoria na qualidade do leite, problemas com a instabilidade continuaram ocorrendo, porém, na maioria das vezes, sem a presença de acidez. Neste caso, o leite é denominado Leite Instável Não Ácido (LINA). O LINA é definido como um conjunto de alterações físico-químicas no leite, sendo observada principalmente a perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool (MARQUES et al., 2007). Quando apresenta coagulação e acidez entre 14 e 18 °Dornic, considera-se a ocorrência de LINA. Apesar de não apresentar acidez, este leite apresenta-se instável quando submetido ao processamento pela

indústria. A estabilidade do leite é definida pelas micelas de caseínas, durante o tratamento térmico ou no teste do alizarol, devido à desnaturação das proteínas. Essas micelas são compostas por subunidades proteicas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e k-caseína) ligadas a íons. Por esse motivo as indústrias de captação do leite, realizam o teste do alizarol em concentração do álcool mais elevado (76%, 78% e/ou 80%) e a acidez titulável mais rígida, entre 14 a 16 °Dornic.

Dentre os fatores que mais afetam a estabilidade do leite, com exceção do pH, são as subunidades da caseína e a concentração do cálcio iônico. As maiores proporções de caseína são as frações  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo estas hidrofóbicas e sensíveis à presença do cálcio, o que pode contribuir para a formação de grumos, caso a concentração de Ca iônico no leite aumente. Para que estas frações suportem a presença do cálcio, a fração k-caseína é muito importante, pois a mesma é hidrofílica e estável na presença de cálcio. Portanto, a estabilidade do leite depende da presença da k-caseína, pois esta “protege” a região da micela da água e do cálcio solúvel. Cerca de 10% do cálcio total do leite é iônico e este atua como adjuvante, ou seja, realiza ligações entre as micelas de caseínas (MAGALHÃES e SANTOS., 2013)

O equilíbrio do cálcio é muito importante para a estabilidade do leite, pois com o seu aumento, a quantidade de cálcio ligado reduz as cargas negativas das micelas, o que contribui com a redução da coagulação, pois aumenta a repulsão entre elas (MAGALHÃES e SANTOS., 2013). A instabilidade do leite reflete em consequências negativas para a indústria, pois este leite pode apresentar características indesejáveis, como a redução de rendimento na fabricação de queijos, maior perda de sólidos da massa do queijo, aumento da taxa de viscosidade e sedimentação do leite e derivados, precipitação dentro do equipamento durante o processo térmico, entre outros (FISCHER et al., 2012). Além disso, a instabilidade reduz o tempo de validade do leite UHT (ultra high temperature), maior fragilidade do coágulo, maior possibilidade de precipitação para o leite UHT, aumento no tempo de coagulação por culturas e enzimas e precipitação do leite durante a pasteurização (SANTOS, 2001).

As causas da instabilidade térmica do leite são diversas, como distúrbios metabólicos, nutricionais e fisiológicos dos animais, desequilíbrios energéticos e proteicos, problemas com suplementação mineral, estação do ano, estágio de lactação, subnutrição, acidose ruminal e metabólica, raça, escassez de alimentos, estresse calórico e período de cio (ZANELA et al., 2009). Outros fatores que também podem afetar a instabilidade do leite são: o desbalanço na relação Ca:P, ação dos micro-organismos sobre a caseína, animais com mastite, presença de

colostro e de agentes desinfetantes nos equipamentos de ordenha ou no tanque de refrigeração (SANTOS, 2001).

A composição química do LINA não afeta seu uso como alimento, apresentando apenas limitações em relação ao tratamento térmico utilizado durante o processamento industrial. De acordo com Magalhães e Santos. (2013), o leite instável na prova do álcool a 72% ou em concentrações superiores (74%, 78%, 80% de álcool) pode ser utilizado em tratamentos térmicos mais brandos, desta forma, o descarte poderá ser evitado.

Preocupada com a qualidade de leite recebido, a indústria realiza rotineiramente o teste do álcool/Alizarol, que consiste na adição de partes iguais de alizarol e leite, este teste é realizado na propriedade antes do seu carregamento, pois é rápido, fácil e de baixo custo, porém, subjetivo, observando-se se houve precipitação do leite. Na presença de grumos, o leite não é coletado e o produtor penalizado, com descontos. Inicialmente, este teste foi desenvolvido para detectar a instabilidade do leite devido à acidez, uma vez que a principal causa da instabilidade estava relacionada com falhas no resfriamento do leite. Porém, mesmo com grande parte dos produtores utilizando tanques de resfriamento nas propriedades nos dias atuais, os casos de instabilidade do leite continuaram a existir.

A prova do álcool pode não detectar com precisão a ocorrência de instabilidade do leite devido à questões metodológicas e, com isso, prejudica o produtor e a indústria. Entre as fontes de variação da prova do alizarol estão o tempo de homogeneização da amostra de leite, a temperatura da amostra, o tempo de refrigeração, a concentração do álcool e o seu pH. Segundo Nornberg; Tondo e Bradelli. (2009) é de suma importância a refrigeração do leite cru, pois este procedimento reduz os custos operacionais de produção e principalmente evita a proliferação das bactérias mesófilas, que fermentam a lactose e produzem o ácido láctico. Entretanto, o armazenamento por longos períodos podem resultar em queda da qualidade dos produtos lácteos. De acordo com a IN 76 o leite deve estar a 4°C, até 3 horas após a ordenha. Zanela; Ribeiro e Fischer. (2015) relataram que, no que diz respeito ao LINA, pouco se sabe sobre a influência da temperatura sobre a ação do álcool e o resultado desta prova como forma de detectar a instabilidade do leite. Desta forma, objetivou-se avaliar a influência da temperatura do leite (5° e 12° C) na prova do alizarol para a detecção do LINA e a sua relação com a composição e a contagem de células somáticas (CCS) do leite.

## 2. Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura de leite da Fazenda Escola Capão da Onça, pertencente à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nos meses de março, abril, maio e primeira semana de junho em 2017. Foram avaliadas amostras de leite de 20 vacas da raça Holandesa e mestiças Holandês x Jersey x Illawarra. A amostragem do leite foi realizada semanalmente, exceto nos meses de maio e abril, totalizando 189 amostras. O DEL (dias em leite) apresentou valor médio de 169 dias, ou seja, os animais estavam com o DEL estável, pois sabe-se que o DEL de um rebanho tem de se apresentar < 180 dias. O número de lactações dos animais variou para 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> lactação, cujos valores foram de 33,33%, 5%, 29%, 19% e 9%, respectivamente.

Durante o experimento, as vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 8:00 horas e às 15:00 horas, sendo as amostras de leite colhidas na ordenha da manhã e armazenadas em frascos de 100 mL, identificados e acondicionados em uma caixa térmica com gelo, para posterior análise.

As vacas eram mantidas em sistema semi-intensivo, recebendo alimentação duas vezes ao dia: após a ordenha da manhã e da tarde. Após a ordenha da tarde, as vacas eram encaminhadas para piquetes onde permaneciam até a manhã do dia seguinte. Os animais recebiam silagem de milho e concentrado (55% milho, 26% farelo de soja, 15,5% farelo de trigo, 3% de suplemento mineral e vitamínico e 0,5% de bicarbonato de sódio) duas vezes ao dia, em comedouros coletivos, sendo a água ofertada a vontade.

Após a ordenha, as amostras de leite foram encaminhadas ao laboratório do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL) para análises, sendo mantidas sob refrigeração. Foram avaliadas duas temperaturas de refrigeração, 5°C e 12°C, monitoradas por meio de um termômetro de mercúrio. A temperatura de 5°C simulou a temperatura do tanque de resfriamento na propriedade (1°C acima) e a temperatura de 12°C foi avaliada visando simular problemas que ocasionalmente ocorrem com o resfriamento do leite, causando aumento da temperatura.

Para atestar a qualidade do leite realizou-se a prova do alizarol, que consiste na avaliação da instabilidade do leite, utilizando-se a metodologia descrita por Tronco (2010). As amostras de leite foram previamente homogeneizadas e então pipetados dois mL de leite

em tubos de ensaio e 2 mL de solução de alizarol, com o álcool na concentração de 72%. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente e avaliada a presença de grumos e a coloração da solução. Quanto aos grumos, as amostras foram classificadas em três níveis: 0 (sem formação de grumos), 1 (poucos grumos), 2 (quantidade intermediária) e 3 (muitos grumos).

Para a coloração, a classificação seguiu o seguinte critério: coloração violeta (amostra alcalina); coloração pardo avermelhada (amostra com pH dentro do padrão de normalidade) e coloração pardo amarelada (amostra com pH ácido), segundo Tronco (2010). A identificação dos casos de LINA foi realizada da seguinte forma: amostras de leite com grumos na intensidade 1, 2 ou 3 e acidez entre 14 a 18° D, foram caracterizadas como leite instável não ácido.

O pH de cada amostra foi avaliado por meio de um potenciômetro digital, em triplicata. A acidez foi determinada por titulometria, utilizando-se a solução Dornic. Nesta análise usou-se uma bureta de 25 mL, com a solução de hidróxido de sódio (NaOH, solução Dornic). Foram pipetados 10 mL de leite homogeneizado em um erlenmeyer de 25 mL. Em seguida adicionou-se 3 a 4 gotas de fenoftaleína 1%, aos poucos foi adicionado NaOH com o auxílio da bureta. No ponto de viragem (coloração rosada) foi registrado o valor da titulação. Esta análise foi realizada em duplicata. Para o cálculo da acidez, utilizou-se a seguinte fórmula:

Acidez = volume da solução de NaOH x fator de correção da solução x 10.

A composição do leite (teores de proteína, gordura, lactose e sólidos totais) foi determinada por meio do analisador portátil de leite (marca ASKO). A análise de uréia no leite foi determinada por espectrofotômetro de infravermelho (B 2300 Combi, Bentley) e a contagem de células somáticas (CCS) por Citometria de Fluxo (Somacount 500), realizadas no laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH).

Para as temperaturas de 5 e 12° C foi utilizada a análise estatística por meio de teste não paramétrico Binomial, com distribuição de Bernoulli. Considerando que  $Y_i$ ,  $i= 1, 2, \dots$ , em que  $i$  representa uma das variáveis mensuradas,  $Y_i \sim \text{Bernoulli}(\pi)$ , e  $\pi$  a probabilidade de acontecimento (ocorrência ou não de LINA, em relação a composição e temperatura de armazenamento do leite), a função de probabilidade de  $Y_i$  foi calculada por:

$$P(Y_i = y_i) = \pi y_i^{y_i} (1 - \pi)^{1 - y_i}, y_i = 0, 1$$

Os dados relativos à frequência (coloração e coagulação das amostras de leite pela prova do alizarol e ocorrência ou não de LINA), foram analisados por meio de regressão logística multivariada utilizando-se o procedimento GLIMMIX do pacote estatístico SAS (Versão 9.3 do sistema SAS para Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA- 2014). Por meio da análise de variância (ANOVA) foi avaliado o efeito da temperatura e sua interação com a coloração (pardo amarelado, pardo avermelhado e violeta), formação de grumos (0, 1, 2 e 3) no leite, composição do leite e ocorrência ou não de LINA, utilizando o teste de F, ao nível de significância de 5 %.

### 3. Resultados e Discussão

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios dos componentes do leite e CCS em função da ocorrência ou não de LINA.

**Tabela 01** – Valores médios dos teores de gordura, proteína, lactose, uréia, Contagem de Células Somáticas (CCS), nitrogênio uréico (N-uréico), pH e acidez titulável do leite em função da ocorrência (positivo) ou não (negativo) de LINA (Leite Instável Não Ácido) por meio da prova do alizarol

Parâmetro	Negativo para LINA	Positivo para LINA	P
Gordura (%)	3,57	3,68	0,478
Proteína (%)	3,23	3,19	0,415
Lactose (%)	4,59	4,58	0,820
CCS (cels/mL x 1.000)	695	335	0,519
N-uréico (g/dL)	10,08	9,19	0,125
pH	6,86	6,86	0,923
Acidez titulável (° Dornic)	17,4	16,57	0,081

Valores de P <0,05 entre as médias na mesma linha, diferem pelo teste de F. LINA= amostras de leite com grumos na intensidade 1, 2 ou 3 e acidez entre 14 a 18° D.

O teor de gordura não causou alterações (P>0,05) na estabilidade do leite. Zanela et al. (2009) relataram que a porcentagem de gordura não varia em função da ocorrência ou não de LINA. Por outro lado, Marx et al. (2011) observaram maior teor de gordura do leite com a ocorrência de LINA. Não existe um consenso entre os autores para a alteração ou não do percentual de gordura no leite instável. A variação do teor de gordura no leite esta relacionada com estágio da lactação, idade, raça, época do ano e nutrição do rebanho (MARX et al., 2011), sendo este o componente de maior variação na composição do leite.

Da mesma forma, o teor de proteína não apresentou alterações (P>0,05) na ocorrência ou não de LINA, sendo este resultado semelhante ao encontrado por Marx et al. (2011).

Segundo os autores, o LINA não exerce influência quantitativa nos teores de proteína. As caseínas são as principais proteínas do leite, correspondendo a cerca de 80%. As de maior importância econômica são:  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\alpha_{s1}$ - e  $\alpha_{s2}$ -caseína, responsáveis pela estabilidade térmica do leite. A proporção das caseínas é que garantem à indústria realizar tratamentos ou processamentos sob elevadas temperaturas. Os outros 20% representam as proteínas do soro (Albumina do soro,  $\alpha$ - lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteoseptonas). Essa proporção entre as micelas de caseínas e proteínas do soro pode variar em função da raça, da alimentação, época do ano, estágio de lactação e estresse (BRASIL et al., 2015a) e estão relacionadas com a estabilidade térmica do leite. A estabilização das micelas é comprometida por causa da hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína, interferindo diretamente na repulsão intermicelar, resultando na coagulação do leite (Food Ingredients Brasil, 2016).

A lactose é o componente do leite de menor variação. Não foi observado diferenças ( $p>0,05$ ) para os valores de lactose referente à ocorrência ou não de LINA. Porém, Lopez (2008) avaliando a composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo, observou que os teores de lactose foram inferiores nas amostras positivas para LINA. Por outro lado, de acordo com Fagnani et al. (2016), os teores de lactose normalmente são menores no LINA quando comparados ao leite normal. Isto se deve, segundo eles, à atuação da lactose no equilíbrio osmótico, na passagem de componentes do sangue para o leite. Com a redução deste componente há interferência no equilíbrio osmótico, aumentando a concentração de minerais no leite e, com isso a força iônica. Estas alterações causam redução do pH, aumentando a dissolução do cálcio iônico, e desestabilizando as micelas de caseína, causando a instabilidade.

Não houve diferença ( $p>0,05$ ) nos teores de CCS em função da instabilidade do leite. Porém, os casos negativos para LINA apresentaram valores numericamente maiores de CCS. De acordo com Zanela et al. (2009) não há relação de positividade entre a ocorrência de LINA e a CCS. Para Machado (2010), a CCS pode influenciar na instabilidade do leite devido ao aumento da permeabilidade da glândula mamária, permitindo a passagem de componentes do sangue para o leite, como por exemplo, do cálcio, fósforo e cloro, que podem interferir na estabilidade.

Zanela e Ribeiro. (2018) relataram que não há um consenso entre os autores em relação a influência do LINA e a CCS pois, segundo os autores, alguns trabalhos avaliaram

amostras individuais dos animais e outros em conjunto, o que de certa forma pode interferir nos resultados.

Outros fatores podem influenciar a estabilidade do leite, ao avaliar o efeito da degradabilidade da proteína bruta na dieta e o processamento do milho no desempenho da lactação, composição da proteína do leite e estabilidade, Martins et al. (2019) observaram que o aumento da degradabilidade da proteína bruta diminuí a estabilidade do leite ao teste do álcool, a acidificação do sangue também pode interferir na estabilidade do leite, pois, para manter o equilíbrio ácido-base, ocorre um aumento na concentração de cálcio iônico.

Os teores de N-uréico no leite variam de 10 a 14 mg/dL. Teores abaixo deste valor indicam falhas na nutrição dos animais, especialmente quanto aos teores de proteína. O N-uréico no leite é um indicativo de aumento de amônia ruminal, em relação à energia digestível para o crescimento microbiano (PERES, 2002). Não houve diferença nos teores de N-uréico nas amostras positivas e negativas para LINA.

O desequilíbrio no ecossistema ruminal pode influenciar na concentração dos produtos da fermentação e, conseqüentemente, no pH sanguíneo, alterando o metabolismo das células epiteliais mamárias. Este desequilíbrio contribui com alterações na composição do leite relacionadas a instabilidade, principalmente a capacidade de resistir a desidratação no teste do álcool (MARQUES et al., 2010). O pH do leite varia entre 6,6 à 6,8 e um dos fatores que pode alterar este parâmetro é a incidência de mastite no rebanho, que contribui com a elevação do mesmo. No entanto, o pH das amostras de leite foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os casos positivos e negativos para LINA (BRASIL; NICOLAU e SILVA et al., 2015b).

Segundo Brasil; Nicolau e Silva. (2015b) o leite apresenta acidez titulável normal entre 14-18°Dornic ou 0,14 a 0,18 g/ácido láctico/100mL. Neste trabalho, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os valores de acidez referente aos casos positivos e negativos para LINA. Segundo Tronco (2010) a acidez pode ser influenciada pelo estágio de lactação, mastite, ação enzimática, composição do leite, como exemplo, teores de caseínas, citratos, albumina entre outros.

Problemas relacionados com a má higienização dos equipamentos de ordenha podem proporcionar a proliferação de micro-organismos indesejáveis no leite, contribuindo para a elevação da acidez e contaminação, influenciando nos teores de CBT (Contagem Bacteriana Total), acidez titulável e na prova do alizarol. Este efeito é devido à ação das bactérias sacarolíticas que degradam a lactose e produzem ácido láctico, o qual altera a estabilidade da

proteína (JUNIOR et al., 2013). O leite ácido é instável ao processamento pela indústria, além de apresentar alterações no sabor.

Na Tabela 2, encontram-se os resultados dos valores médios do pH e da acidez titulável das amostras de leite em função da temperatura de armazenamento.

**Tabela 02** – Valores médios do pH e da acidez titulável de amostras do leite em função da temperatura de armazenamento

Parâmetro	Temperatura	
	5° C	12° C
Ph	6,8b	6,9a
Acidez titulável (°Dornic)	17,29a	17,23a

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem (<0,05) pelo teste F.

Para o pH do leite foi observado elevação ( $P < 0,05$ ) com o aumento da temperatura de armazenamento. Este resultado diverge das informações encontradas na literatura, pois à medida que a temperatura aumenta, o pH tende a diminuir, decorrente da ação microbiana e produção de ácido láctico.

De acordo com Brasil et al. (2015a), o pH é um indicador da estabilidade do leite, uma vez que valores inferiores a 6,2 comprometem a estabilidade do mesmo. Sob estas condições, a estabilidade do leite é mínima, pois a quantidade de cálcio iônico se eleva, favorecendo a ocorrência de precipitação. A acidificação compromete a hidratação das proteínas e reduz as cargas do meio. Em pH 5,2 ou 5,3 as ligações que mantêm as micelas de caseínas unidas são mais fracas ou ausentes (COSTA et al., 2014). De acordo com os autores, a coagulação das micelas de caseína depende do perfil do pH, dos elementos iônicos, como metais bivalentes, especialmente íons de cálcio, que interferem na estabilidade.

Não foi observada diferença na acidez ( $P > 0,05$ ) em relação às temperaturas de armazenamento. De acordo com Fischer et al., (2012) o leite possui acidez natural que varia de 14 a 18° Dornic. A acidez natural é causada pela presença de citratos, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e caseína. A acidez adquirida é resultado da soma da acidez natural com os ácidos resultantes da fermentação da lactose (ácido láctico, acético, fórmico, butírico). A acidez se eleva quando o leite é adquirido sob más condições de higiene e armazenamento incorreto em temperaturas elevadas (ROSA et al., 2017).

Na Tabela 3 encontram-se as frequências relativas (%) da coagulação das amostras de leite em função da temperatura. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nos parâmetros avaliados, porém, observou-se aumento numérico na instabilidade do leite com o aumento da temperatura 5 para 12°C. Conforme mencionado anteriormente, a coagulação do leite na prova do alizarol pode estar relacionada com o aumento da temperatura, devido à presença de bactérias que irão degradar a lactose e produzir ácido lático, havendo redução no pH e, conseqüentemente, aumento na instabilidade do leite.

**Tabela 03** – Frequência relativa (%) da coagulação de amostras de leite submetidas ao teste do Alizarol, em função da temperatura do leite

Coagulação	Temperatura do leite	
	5° C	12° C
0	70,8	61,5
+	25,0	30,8
++	4,2	5,1
+++	0,0	2,6
	P = 0,4144	

Valores de  $P < 0,05$  entre as médias na mesma linha e coluna diferem pelo teste F. 0 = sem coagulação. + = pouca coagulação. ++ = coagulação intermediária. +++ = muita coagulação.

De acordo com as Instruções Normativas nº 76 e 77, de 26 de novembro de 2018, a temperatura máxima de armazenamento na propriedade é de 4°C, sendo que esta deve ser alcançada até três horas após a ordenha. Durante o transporte do leite, é permitido pela legislação, um acréscimo de 3°C, ou seja, na indústria de processamento a matéria prima poderá ser recebida com até 7°C. Segundo Arcuri et al. (2006) no leite cru refrigerado existem micro-organismos capazes de se desenvolver a 7°C ou menos, como é o caso das bactérias psicotróficas. As bactérias termodúricas sobrevivem ao tratamento térmico da pasteurização e as lácticas são responsáveis pela acidificação do leite. Por esse motivo a temperatura e o tempo de armazenamento do leite são de suma importância para garantir a qualidade microbiológica do leite.

O comportamento de coagulação verificado neste trabalho é contrário ao encontrado por Costa et al. (2014). Segundo os autores, à medida que a temperatura de resfriamento do

leite diminui, há mudanças do equilíbrio do cálcio coloidal, presente nas micelas de caseínas, e no cálcio solúvel, como consequência da desagregação de fosfato de cálcio coloidal. Devido a esse fator, ocorre redução de cargas elétricas nas micelas e as ligações de cálcio contribuem com a diminuição da estabilização. Portanto, os autores encontraram maior estabilidade das amostras de leite em temperaturas mais altas. No presente trabalho, o aumento de temperatura do leite proporcionou maior percentual de casos de leite instável, com níveis de coagulação +, ++ e +++. Neste caso, a principal justificativa para o aumento da coagulação seria a ocorrência de acidez, porém, este parâmetro não sofreu diferença em função da temperatura (Tabela 2).

De acordo com Costa et al. (2014) a temperatura do leite interfere na estrutura da  $\beta$ -caseína, contribuindo com a diferença de migração deste componente da forma micelar agregada para a forma molecular, dispersa na fase solúvel do leite. É possível que este comportamento colabore com a maior instabilidade do leite. Com a diminuição da temperatura (4°C), ocorre à migração, as micelas diminuem o tamanho liberando água e cálcio para a fase aquosa. Isso pode alterar as cargas das micelas, o que ocasiona maior junção entre elas, refletindo diretamente na estabilidade do leite, apresentando coagulação frente à prova do álcool.

Na Tabela 04 encontra-se a frequência relativa da coloração das amostras submetidas ao teste do Alizarol, em função da temperatura do leite. Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) na coloração das amostras pelo teste do alizarol em função da temperatura do leite. Todavia, em termos numéricos, foram observados comportamentos distintos para as respectivas colorações.

**Tabela 04** – Frequência relativa (%) da coloração de amostras de leite submetidas ao teste do Alizarol, em função da temperatura do leite

Coloração	Temperatura	
	5° C	12° C
Pardo Amarelado	29,2	26,9
Pardo Avermelhado	52,8	30,8
Violeta	18,1	42,3
	P= 0,5324	

Valores de  $P < 0,05$  entre as médias na mesma linha e coluna diferem pelo teste F. Pardo Amarelado: amostra com pH ácido; Pardo Avermelhado: amostra com pH dentro do padrão de normalidade (6,6 a 6,8); Violeta: amostra com pH alcalino.

Com o aumento da temperatura, verificou-se que a ocorrência de coloração violeta aumentou 42,3%, ou seja, houve aumento do número de amostras de leite alcalino (pH acima

de 6,8), embora este resultado não tenha sido significativo. No presente estudo a temperatura do leite pode ter influenciado o indicador do alizarol, alterando sua cor no momento da realização do teste. Por isso a confirmação da acidez é realizada na indústria, por meio da acidez titulável. A coloração da amostra obtida pela prova do alizarol é uma medida subjetiva de se estimar o pH. Costa et al. (2014) relataram que a temperatura da amostra do leite interfere no resultado do teste do alizarol.

O tempo de armazenamento no tanque pode interferir na qualidade do leite. Durante o armazenamento do leite na propriedade, há adição de um novo volume de leite a cada ordenha, podendo haver oscilações de temperatura, que contribuem com a proliferação de micro-organismos indesejáveis, comprometendo a composição física e química do leite. Desta forma, esperava-se aumento da coloração amarelada (pH ácido) do leite com o aumento da temperatura, porém, este resultado não foi observado.

Na Tabela 05 encontram-se os resultados da frequência dos casos de LINA (%) em função da temperatura de armazenamento.

**Tabela 05** – Frequência relativa (%) da ocorrência de LINA (Leite Instável Não Ácido) por meio da prova do alizarol em função da temperatura de armazenamento do leite

Parâmetro	Temperatura	
	5° C	12° C
Negativo para LINA	83,3	75,6
Positivo para LINA	16,7	24,4
	P=0,2493	

Valores de  $P < 0,05$  entre as médias na mesma linha e coluna diferem pelo teste Qui-quadrado. LINA = amostras de leite com grumos na intensidade 1, 2 ou 3 e acidez entre 14 a 18° D.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) nos casos de ocorrência ou não de LINA em função da temperatura. No entanto, numericamente, nota-se que na temperatura de 5°C, os casos de LINA foram menores (16,7%) em relação aos da temperatura de 12°C, cujos casos positivos aumentam para 24,4%. Estes resultados foram contrários aos encontrados por Costa et al. (2014). Segundo os autores, à medida que a temperatura do leite aumentou, a estabilidade ao teste do álcool foi maior. De acordo com o referido estudo, na temperatura de 4°C, a concentração do álcool necessária para que houvesse coagulação foi de 82,59%, já para as temperaturas de 10°C, 15°C e 20°C, as concentrações de álcool que apresentaram coagulação foram 83,67%, 85,67%, e 87,44%, respectivamente. Sendo assim, à medida que a temperatura das amostras aumentou, a estabilidade ao teste do álcool foi maior.

Isso é explicado por meio da reação de coagulação induzida pelo etanol, pois é um processo de precipitação isoelétrica e é dependente da quantidade de cargas presentes nas camadas das proteínas que compõem as micelas da caseína. Os íons de cálcio presentes nas nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal são responsáveis pela estabilização das proteínas, porém, com a diminuição da temperatura do leite há solubilização dos íons presentes, contribuindo para a maior instabilidade do leite.

Segundo Machado (2010) a ação do calor, causa modificações na composição física do leite, sendo observado o deslocamento do cálcio solúvel para a forma coloidal, influenciando o tamanho da micela de caseína, esse fator reduz a força de repulsão, formando o complexo  $\beta$ -lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína, alterando a superfície micelar e reduzindo o pH por formação de ácidos orgânicos a partir da decomposição da lactose. Ao avaliar 130 amostras de leite refrigeradas em temperaturas de 4° e 20°C, utilizando álcool nas concentrações de 68 e 80%, Machado (2010) observou que as temperaturas das amostras não influenciaram a prova do alizarol, esse resultado foi semelhante ao encontrado nesse estudo e contrário ao resultado encontrado por Costa et al (2014).

Os estudos sobre a influência da temperatura do leite em relação à ação do álcool sobre as caseínas e a ocorrência de coagulação ainda são controversos, pois na literatura há divergência entre os autores. Sabe-se que é recomendável realizar o teste do álcool com o leite refrigerado, pois o leite recém ordenhado possui CO<sub>2</sub> natural, o que pode aumentar o número de falsos positivos (ZANELA e RIBEIRO., 2018).

#### **4. Conclusão**

A ocorrência de casos de LINA no rebanho de vacas mestiças e da raça Holandesa não está relacionada com as variações nos teores de gordura, proteína, lactose, N-uréico, CCS, acidez e pH. Leite armazenado sob temperatura de 5 e 12° C não sofre alterações no teste do Alizarol, na concentração do álcool de 72%. A temperatura da amostra de leite é de suma importância para garantir a qualidade da matéria prima, uma vez que temperaturas mais elevadas podem torná-lo instável em função do pH. No entanto, outros fatores devem ser considerados, pois podem interferir na determinação da instabilidade, como tempo de armazenamento, pH da solução alcoólica e concentração do álcool.

## 5. Referências Bibliográficas

- ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Revista Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p 71-80, 2015a.
- BRASIL, R. B; NICOLAU, E. S; SILVA, M. A. P. Leite Instável não ácido e fatores que afetam a estabilidade do leite. **Revista Ciência Animal**. v. 25, n. 4, p. 15-26, 2015b.
- COSTA, F. F. et al. Efeito da temperatura das amostras de leite na concentração de cálcio solúvel e de beta-caseína: interferência no teste de estabilidade frente ao etanol. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 573-578, 2014.
- FAGNANI, R. et al. Estabilidade do leite ao álcool: Ainda pode ser um indicador confiável?. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 386-394, 2016.
- FISCHER, V. et al. Leite Instável Não Ácido: um problema solucionável?. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 13, n. 3, p. 838-849, 2012.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL**. In: **Dossiê Estabilizantes**. São Paulo: Insumos LTDA, v. 18, n. 38, p. 38-43, 2016. Anual. Disponível em:<<http://revista-fi.com.br/revista/80/mobile/index.html#p=97>>. Acesso em: 20 mai. 2019.
- JÚNIOR, J. C. R. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5-11, 2013.
- LOPEZ, L. C. **Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, estado de São Paulo**. 2008, 21 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- MACHADO, S. C. **Fatores que afetam a estabilidade do leite bovino**. 2010, 201 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- MAGALHÃES, C. M; SANTOS, M. V. Fatores que alteram a estabilidade do leite. **Revista Leite Integral**. n. 46, p. 18-21, 2013.
- MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista brasileira de zootecnia**. vol. 39, n. 12, p. 2724-2730, 2010.
- MARQUES, L. T; et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físicos-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 13, n. 1, p. 91-97, 2007.
- MARTINS, C. M. M. R. et al Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance and milk protein composition and stability. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 5, p. 4165-4178, 2019.

MARX, I. G; et al. Ocorrência de leite instável não ácido na região oeste do Paraná. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**. v. 13, n. 1, p. 101 -112, 2011.

NORNBERG, M. F. B. L; TONDO, E. C; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotóxicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Revista Acta Scientiae Veterinarie**, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

PERES, J. A. **Nutrição, nitrogênio ureico no leite reprodução**, 2002. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br>> Acesso: 28 Mai. 2019.

ROSA, P. P. et al. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o leite instável não ácido (LINA). **REDVET- Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 18, n. 12, p. 1-17, 2017.

SANTOS, Marcos Veiga. **Prova do álcool e sua relação com a qualidade do leite**, 2001. Disponível em:<<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/prova-do-alcool-e-sua-relacao-com-a-qualidade-do-leite-16199n.aspx>>. Acesso em: 25 mai. 2019.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4ª Ed. Santa Maria: Ed. UFSM. 2010. 195P.

ZANELA, M. B. et al. Lina: passado, presente e futuro. In: PRADIEÉ, J; PEGORARO, L. M. C; DERETI, R. M. **Evolução da pecuária leiteira**, 1º edição, Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2017. p. 27-30.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, MER; VIVIAN, F. Leite instável não ácido (LINA): do campo a indústria. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 6., 2015, Curitiba. Anais... Curitiba: CBQL, 2015., 2015.

ZANELA, M. B; RIBEIRO, MER. LINA-Leite Instável Não Ácido. **Embrapa Clima Temperado-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

ZANELLA, M. B. et al. Ocorrência do Leite Instável Não Ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 4, p. 1009-1013, 2009.