ESTABILIDADE TÉRMICA DA CASEÍNA E ESTABILIDADE AO ÁLCOOL 68, 72, 75 E 78%, EM LEITE BOVINO

Heat stability of casein and ethanol stability at 68, 72, 75 e 78%, in bovine milk

Livia Cavaletti Corrêa da SILVA[1]
Vanerli BELOTI[2*]
Ronaldo TAMANINI[1]
Alberto Koji YAMADA[1]
Cristiane Jaci GIOMBELLI[1]
Márcia Rocha SILVA[3]

SUMÁRIO

A estabilidade térmica do leite, avaliada através da prova do álcool ou do alizarol, é afetada por diversos fatores, sendo o principal a acidificação do leite. No entanto, hidrólise enzimática, alta contagem de células somáticas (CCS), excesso de íons cálcio e adição de etanol, também afetam sua estabilidade ao álcool, reduzindo sua correlação com a estabilidade térmica. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de leite instável não ácido (LINA) no município de Sapopema-PR, avaliar a estabilidade térmica do LINA e sua relação com CCS e contagem bacteriana total (CBT) e, além disso, a influência da concentração alcoólica utilizada para a prova do álcool na estabilidade do leite. Foram avaliadas 85 amostras por meio da prova do álcool à 68, 72, 75 e 78%, determinação da acidez Dornic, prova da fervura, CCS e CBT. Observou-se elevada ocorrência de LINA. A maior frequência de LINA 65,88% ocorreu frente à graduação alcoólica de 78% v/v e a menor 15,29% à 68% v/v. Com uma exceção, as amostras de LINA foram estáveis à prova da fervura, demonstrando que sua rejeição pela indústria produtora de leite pasteurizado e derivados seria desnecessária. As médias obtidas para CCS e CBT foram elevadas tanto nas amostras que apresentaram LINA como nas amostras instáveis com acidez adquirida.

Termos para indexação: leite; caseína; estabilidade térmica; prova do álcool; alizarol.

1 INTRODUÇÃO

A primeira prova do controle de qualidade do leite é o alizarol, às vezes substituída pela prova do álcool. Deve ser realizada sempre que ocorrer a mistura de leites durante toda a cadeia produtiva, como nos resfriadores comunitários, na coleta pelos caminhões tanque e na recepção pela indústria (BRASIL, 2002). O objetivo desta prova é verificar a estabilidade da caseína, criando uma situação de estresse à proteína por meio de uma solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pela pasteurização (O'CONNELL *et al*., 2001).

De acordo com a Instrução Normativa 51 (IN 51), o leite instável ao alizarol é rejeitado pelo laticínio (BRASIL, 2002), pois sendo a caseína instável, o aumento da temperatura durante a pasteurização pode promover a coagulação do leite, trazendo grandes transtornos à indústria. No Brasil, segundo a legislação anterior a prova do álcool deveria ser realizada utilizando a graduação de 68% (v/v) (BRASIL, 1981), atualmente a graduação mínima obrigatória é de 72% (v/v) BRASIL, 2002), no entanto, graduações de 76, 78 e até 80% têm sido praticadas por diversas indústrias, na expectativa de selecionar leite de melhor qualidade.

1 Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná – Brasil.
2 Docente do Departamento de Medina Veterinária Preventiva (DMVP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná – Brasil.
3 Médica Veterinária Residente em Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná – Brasil.
* Autor para correspondência. e-mail: lipoa.uel@gmail.com.

Recebido/ Received: 23/08/2011
Aprovado / Approved: 27/09/2011

Vários fatores podem promover a instabilidade da caseína, sendo o principal a acidificação causada pela fermentação da lactose por microrganismos incorporados ao leite, quando na ordenha ocorrem falhas de higiene. No entanto, a acidificação do leite não é o único fator que promove instabilidade da caseína (OLIVEIRA e TIMM, 2006). Outras variantes como a hidrólise enzimática da caseína, tratamento térmico, excesso de íons cálcio, altas contagens de células somáticas e adição de etanol também provocam a instabilidade da caseína, mesmo na ausência de acidez (O'CONNELL *et al*., 2006).

A ocorrência de leite instável sem acidez têm sido frequentemente relatada por pesquisadores no Brasil (LOPES, 2008; MARQUES *et al*., 2007; OLIVEIRA *et al*., 2007; OLIVEIRA *et al*., 2011; ZANELA *et al*., 2006) e outros países, como Uruguai (BARROs *et al*., 1999) e Argentina (CHAVEZ *et al*., 2004; NEGRI, 2002). O leite com estas características tem sido denominado LINA, leite instável não ácido. Existe ainda uma discussão acerca da real capacidade da prova do álcool em determinar a estabilidade térmica do leite. Falhas nessa correlação já foram apontadas por diferentes autores (CHAVEZ *et al*., 2004; HORNE e MUIR, 1990; MOLINA *et al*., 2001).

A ocorrência de leite sem acidez adquirida, com baixa contagem bacteriana, instável à prova do álcool pode levar ao descarte de leite com boa qualidade (MOLINA *et al*., 2001), trazendo prejuízo ao produtor.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de leite instável não ácido no município de Sapopema-PR, avaliar a interferência da concentração alcoólica utilizada para a realização da prova do álcool na estabilidade da caseína e, além disso, relacionar a estabilidade térmica da caseína com a estabilidade ao álcool, à contagem de células somáticas e à contagem bacteriana total.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho faz parte do Projeto "Leite do Paraná" do programa Universidade Sem Fronteiras, da Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná. O projeto tem como foco principal o desenvolvimento sustentado da pecuária leiteira, a melhoria tecnológica dos processos produtivos e a melhoria da qualidade do leite e derivados principalmente em pequenas propriedades leiteiras.

Foram coletadas, entre os meses de junho e julho de 2009, 85 amostras de leite cru de propriedades leiteiras do município de Sapopema, na região do Norte Pioneiro do Paraná. As amostras foram colhidas em *bags* estéreis e mantidas em caixas isotérmicas com gelo reciclável até a chegada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina. Todas as amostras foram analisadas no momento da sua chegada no laboratório.

As amostras foram inicialmente avaliadas quanto a sua estabilidade, pela prova do álcool nas graduações de 68, 72, 76 e 78% (v/v). Em seguida, foram realizadas as provas de acidez Dornic e prova da fervura, de acordo com a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006).

A contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) foram realizadas por citometria de fluxo pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), laboratório de referência do Paraná.

Os resultados das análises de amostras consideradas instáveis ao alizarol sem acidez adquirida (LINA) foram então comparados com os resultados das amostras estáveis ao alizarol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um grande número de amostras de leite instável sem acidez adquirida foi detectado nesse estudo (Figura 1). Das 53 amostras instáveis ao alizarol 72% (v/v) apenas 16 (30,19%) possuíam acidez acima de 18° Dornic, o restante das 37 (69,81%) amostras apresentou acidez Dornic entre 14 e 18ºD (Tabela 1).

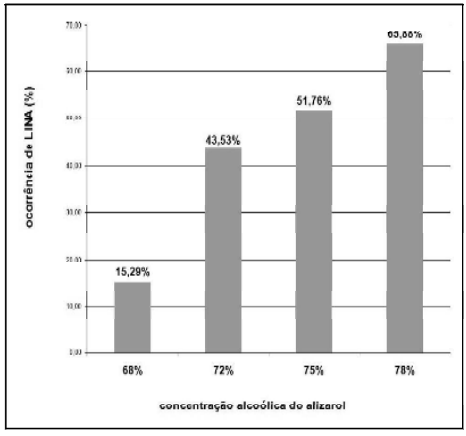

Figura 1 – Frequência de amostras de leite instável não ácido em diferentes concentrações alcoólicas (68, 72, 75 e 78% v/v), em 85 amostras de leite cru do município de Sapopema-PR, analisadas entre de junho e julho de 2009.

Neste estudo o aumento da graduação alcoólica intensificou a instabilidade da caseína,

resultando num maior número de amostras de leite instável não ácido (LINA) (Figura 1). Foi evidenciado que ao alizarol 68% (v/v) a maioria das amostras era estável e, conforme a graduação alcoólica aumentou, as mesmas amostras se tornaram gradativamente instáveis. Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados por Molina *et al*. (2001), que analisaram 96 amostras de leite cru sem acidez adquirida e encontraram que o aumento progressivo da graduação alcoólica de 75% para 80% e posteriormente para 85% resultou no aumento da instabilidade do leite, sendo respectivamente 8,3%, 61,5% e 94,8%.

Na prova do álcool, o etanol reduz a estabilidade coloidal da micela de caseína e provoca coagulação dessa fração protéica (O'CONNELL *et al*., 2001), consequentemente, quanto maior a concentração de álcool utilizada, menor será a estabilidade caseína.

Ao utilizar uma maior concentração de álcool nessa prova, uma maior desestabilização das proteínas ocorrerá pela alteração na constante dielétrica do meio que reduzirá a repulsão entre cargas iguais das proteínas, fazendo com que estas se aproximem e coagulem (ZADOW, 1993).

Enquanto no Brasil a graduação alcoólica tende a aumentar, em diversos países como os da União Européia, EUA e Canadá, o teste foi abandonado devido à melhora na qualidade microbiológica do leite. Além disso, outros fatores foram relacionados à instabilidade do leite ao álcool como a estação do ano, dieta e estágio da lactação (BRITO *et al.*, 2009).

A indústria busca utilizar graduações alcoólicas cada vez mais elevadas na triagem do leite na tentativa de obter a matéria-prima de melhor qualidade e garantir um leite estável a temperaturas mais elevadas de beneficiamento, principalmente para produção de leite UHT. A correlação entre o aumento da graduação alcoólica e o aumento na resistência térmica, contudo, não é verdadeira (MOLINA *et al*., 2001). Alguns estudos apontam que a prova do álcool não é capaz de fornecer uma boa previsão da estabilidade térmica (CHAVEZ *et al*., 2004; HORNE e MUIR, 1990; MOLINA *et al*., 2001).

Neste estudo, apenas 1 amostra de LINA (nas graduações de 75% e 78%) foi instável à prova da fervura (Tabela 1), porém, essa amostra apresentava fraude por aguagem com crioscopia de -0,504°H, e acidez de 14°D. A adição de água melhora a estabilidade e reduz a acidez. Isso demonstra que o LINA é estável ao tratamento térmico e que poderia ser pasteurizado, mostrando ser desnecessária a rejeição desse leite pela indústria. Donatele *et al*.(2003) analisaram 847 amostras de leite cru, no Rio de Janeiro, e encontraram 257 (30,34%) das amostras instáveis ao alizarol a 72% e sem acidez adquirida, porém estáveis termicamente.

As concentrações de 68 e 72% deixaram de detectar 1 amostra que foi instável à prova da fervura (Tabela 1). Por outro lado as concentrações de 75 e 78% descartariam indevidamente o leite de 44 e 56 produtores, respectivamente.

Altas contagens de microrganismos psicrotróficos podem estar relacionadas à ocorrência de instabilidade da caseína, devido à produção de enzimas proteolíticas que atuam sobre a caseína (SANTANA *et al*., 2004). Do mesmo modo, altas contagens de células somáticas (CCS) podem estar relacionadas à instabilidade da caseína (SANTOS e FONSECA, 2006). Em relação à CCS e à contagem bacteriana total (CBT) as médias para o LINA foram de 2,86 x 10^5 CCS/mL e 4,49 x 10^6 CBT/mL; para o leite instável com acidez adquirida acima de 18°D as médias foram de 3,61 x 10^5 CCS/mL e 4,32 x 10^6 CBT/mL.

Não foi observada relação entre aumento da graduação alcoólica e melhoria da qualidade microbiológica do leite, demonstrando que a prova do álcool não deve ser utilizada para realizar essa avaliação. A tabela 2 demonstra a relação entre a

Tabela 1 – Comparação entre os resultados obtidos na prova do álcool utilizando diferentes concentrações (68, 72, 75 e 78% v/v) e a prova da fervura, em amostras de leite instável ácido – LIA (com acidez maior que 18°D) e de leite instável não ácido – LINA, oriundas de 85 propriedades leiteiras de Sapopema-PR, analisadas entre junho e julho de 2009.

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

* esta amostra apresentou fraude por aguagem (-0,504°H) e acidez de 14°D.

ocorrência de LINA, CCS e CBT. Pode-se observar que das 6 amostras que apresentaram CCS acima de 750 mil/mL 4 foram detectadas como instáveis quando se utilizou graduações de 68 e 72% e todas foram instáveis nas graduações de 75 e 78%. Entretanto, essas últimas graduações também descartaram diversas amostras com CCS abaixo de 750 mil/mL, 59 e 71, respectivamente à 75 e 78%.

A mesma situação pode ser observada em relação à CBT (Tabela 2), a graduação de 68% detectou 12 das 43 amostras com CBT acima de 750mil/mL enquanto a graduação de 78% detectou 38, contudo na prova do álcool à 68% foram descartadas apenas 10 amostras com CBT dentro do limites da legislação (BRASIL, 2002), já a graduação de 78% descartou indevidamente 39 amostras. Esses resultados demonstram que a prova do álcool não é adequada para avaliar a qualidade do leite, e que inferências não devem ser realizadas baseadas nos resultados desta prova.

Uma das amostras, por exemplo, apresentou acidez de 17°D, CBT de 4,02 x 10^6/mL e CCS de 9,9 x 10^4/mL. Essa amostra permaneceu estável em todas as graduações alcoólicas, já outra amostra com acidez de 18°D, CBT de 5,0 x 10^3/mL e CCS de 3,4 x 10^4/mL se mostrou instável nas quatro graduações. Neste caso o leite de qualidade superior seria descartado enquanto o leite com qualidade inferior seria aceito. Isso indica que a interação de diversos fatores é que deve determinar a estabilidade da caseína ao álcool. Quanto maior a graduação alcoólica acima de 68%, maior a importância desses outros fatores, contudo, na graduação 68%, a acidez parece ser o principal determinante da instabilidade.

4 CONCLUSÕES

A ocorrência de leite instável não ácido no município de Sapopema-PR é elevada. Outros fatores além da acidez reduzem a estabilidade da caseína quando se utilizam graduações alcoólicas maiores na prova do álcool ou do alizarol.

O aumento da graduação alcoólica na prova do álcool leva ao descarte desnecessário de leite pela indústria.

Não foi observada relação entre o aumento da graduação alcoólica e melhoria na qualidade microbiológica do leite.

A prova do álcool na graduação de 68% (v/v) se mostrou eficiente na avaliação da estabilidade térmica do leite. Contudo, para avaliar a qualidade do leite outras provas são necessárias como CCS, CBT, acidez Dornic entre outras.

SUMMARY

Milk heat stability, evaluated through alcohol or alizarol test, is affected by several factors, the main one is milk acidification. However, enzymatic hydrolysis, high somatic cells counts (SCC), excess of calcium ions and ethanol addition also affect its stability to alcohol, reducing its correlation with heat stability. The objective of this work was to determine the occurrence of instable non acid milk (LINA) in Sapopema-PR, evaluate heat stability of LINA and its relation with SCC and total bacteria count (TBC) and also evaluate the interference of alcohol concentration, used to perform alcohol test, on milk stability. A total of 85 samples were submit to alcohol test

Tabela 2 – Acidez Dornic, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite cru submetidas à prova do álcool em diferentes concentrações alcoólicas (68, 72, 75 e 78% v/v) colhidas no município de Sapopema-PR, entre junho e julho de 2009.

			Acidez Dornic		CBT		CCS	
		n	>14°D e <18°D	>18°D	<750 mil/mL	<750 mil/mL	<750 mil/mL	<750 mil/mL
Total		85	63	22	42	43	79	6
álcool 68%	instável	22	13	9	10	12	18	4
	estável	63	50	13	32	31	61	2
álcool 72%	instável	53	37	16	28	25	49	4
	estável	32	26	6	14	18	30	2
álcool 75%	instável	63	44	19	32	31	59	4
	estável	22	19	3	10	12	20	2
álcool 78%	instável	77	56	21	39	38	71	6
	estável	8	7	1	3	5	8	0

at 68, 72, 75 e 78%, determination of Dornic acidity, boiling test, SCC and TBC. High occurrence of LINA was observed. The highest frequency of LINA 65,88% occurred at alcohol concentration of 78% v/v and the lowest 15,29% at 68% v/v. With one exception, LINA samples were stable to boiling test, showing that its rejection by industry that produces pasteurized milk and dairy products would be unnecessary. The means obtained to SCC and TBC were elevated in both LINA samples and instable samples with acquired acidity.

Index terms: milk, casein; heat stability; alcohol test; alizarol.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L. et al. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Prácticas Veterinárias**, v. 9, p. 315-318, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1, de 07 de outubro de 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 out. 1981, 2002, p. 19381, Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 20 set. 2002, Seção I, p. 8-13.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRITO, M. A. et al. **Estabilidade ao Alizarol**. (2009) Juiz de Fora: EMBRAPA gado de leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/ Agencia8/AG01/arvore/AG01_195_21720039246.html>. Acesso em: 01 ago. 2011.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 201-206, 2004.

DONATELE, D. M.; VIEIRA, L. F. P.; FOLLY, M. M. Relação do teste de alizarol 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, 2003.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3613-3626, 1990.

LOPES, L. C. **Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo.** 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2008.

MARQUES, L. T. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, p. 91-97, 2007.

MOLINA, L. H. et al. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de um centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 233-240, 2001.

NEGRI, L. M. **Estudios de los factores fisicos-químicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica.** 2002. Dissertação (Mestrado) – Litoral National University, Santa Fe, Argentina. 2002.

O'CONNELL, J. E.; KELLY, A. L.; FOX, P. F.; DE KRUIF, K. G. Mechanism for the ethanol-dependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4424-4428, 2001.

O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T. *et al.* Influence of ethanol on the heat- induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 312-317, 2006.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 259-263, 2006.

OLIVEIRA, D. S. et al. Ocorrência de leite com instabilidade da caseína em Santa Vitória do Palmar, RS. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 14, p. 101-104, maio/ago. 2007.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. 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,** Salvador, v. 12, n. 2, p. 508-515, 2011.

SANTANA, E. H. W et al. Milk Contamination in different points of the dairy process. II – Psychotrophics and proteolytics microorganisms, **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, p. 349-358, 2004.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite.** Barueri: Manole, 2006. 314p.

ZADOW, J. The rate of addition of alcohol has a major effect on the alcohol stability of skim milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 48, p. 38-39, 1993.

ZANELA, M. B. et al. Leite instável não ácido e composição do leite de vacas jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 835-840, 2006.