

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUDMILA CAMARGO LOPES

**Composição e características físico-químicas do leite
instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca,
Estado de São Paulo**

Pirassununga

2008

LUDMILA CAMARGO LOPES

**Composição e características físico-químicas do leite
instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca,
Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

L864c	<p>Lopes, Ludmila Camargo</p> <p>Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo. / Ludmila Camargo Lopes - Pirassununga, 2008. 63 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira</p> <p>Unitermos: 1. LINA 2. Frações de caseína 3. Cromatografia 4. Estabilidade da caseína 5. Análises físico-químicas. I. Título.</p>
-------	--

DEDICATÓRIA

Á minha querida mãe Sandra Mara (*in memorian*),
por tudo o que fez e significa para mim. De diversas formas você
continua presente em minha vida.

Saudades.

Ao meu pai Luiz, por tudo.

Ao José Renato pela companhia, amor, dedicação e
cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela orientação, ensinamentos transmitidos e confiança em mim depositada.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Senhor Celestino dos Santos Pantaleão, pela permissão da coleta de amostras no Laticínio Trevo de Casa Branca.

Aos funcionários do Laticínio Trevo de Casa Branca, pela colaboração na coleta das amostras.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga – USP, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À Raquel Cardoso Franco e Fabiane Mascari, estagiárias de Iniciação Científica, pela dedicação ao experimento.

À minha amiga, madrinha e companheira de laboratório Juliana Victorino, por me ajudar e sempre estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha querida amiga Josiane Ortolan, por tudo.

À Roice Eliana Rosim, técnica do LMMA, por sua paciência, amizade e essencial ajuda nas análises laboratoriais.

À Andrezza Maria Fernandes, pela incalculável ajuda, tanto em assuntos científicos como nos mais corriqueiros.

Às colegas de pós-graduação e amigas Andrezza Felício, Érika e Marcinha.

Aos professores e funcionários dos departamentos de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela amizade e convívio durante todos esses anos.

Às minhas eternas amigas Flávia, Ellen, Camila (Sama) e Cláudia.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o mais profundo agradecimento.

RESUMO

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) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

O objetivo do estudo foi determinar a composição e as características físico-químicas (pH, acidez, estabilidade ao álcool, sólidos totais, gordura, lactose, teor de extrato seco desengordurado e proteína total), contagem de células somáticas (CCS) e as frações de caseína (α -s₁, α -s₂, β e κ) dos leites identificados como leite instável não ácido (LINA) e de leites estáveis à prova de álcool a 78% (v/v). A amostragem contemplou todas as propriedades leiteiras fornecedoras de leite de um laticínio localizado no município de Casa Branca – Estado de São Paulo, nos meses de março, maio, julho e setembro de 2007. Considerou-se, como critério de identificação de LINA, a amostra de leite de conjunto de cada propriedade que apresentasse instabilidade à prova do álcool a 72% (v/v) e acidez inferior a 18°D. Do total de amostras instáveis ao teste do álcool a 72% (v/v), 64,77% foram identificadas como LINA. A frequência de amostras de LINA variou de acordo com o mês de amostragem, indicando uma possível influência sazonal sobre a ocorrência deste problema nos rebanhos analisados. No mês de julho, a incidência de LINA foi maior, coincidindo com o período seco, quando a disponibilidade e a qualidade das forragens são reduzidas. No mês de setembro, época de chuvas em que ocorre maior oferta de forragens de melhor qualidade, a incidência de LINA diminuiu. Em julho, houve um aumento significativo nos níveis de gordura, lactose e CCS, observando-se, porém, uma diminuição significativa nas concentrações de proteína bruta nas amostras. Neste mês, notou-se também uma menor concentração de κ -caseína no LINA, embora as diferenças entre as caseínas α -s₁, α -s₂, β e κ do LINA e do leite estável não tenham sido significativas nos meses de amostragem. Os resultados evidenciaram que a ocorrência de LINA é frequente nos rebanhos leiteiros da região estudada, o que pode acarretar perdas significativas à indústria de laticínios e aos produtores devido ao descarte do leite.

Palavras-chave: LINA; frações de caseína; cromatografia; estabilidade da caseína; análises físico-químicas.

ABSTRACT

LOPES, L.C. **Composition and physical-chemical characteristics of unstable non-acid milk in the region of Casa Branca - São Paulo State.** 2008. 63f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

The aim of this study was to determinate the composition and the physical-chemical characteristics (pH, acidity, alcohol stability, total solids, fat, lactose, non fat solids and total protein), somatic cells counts (SCC) and casein fractions (α -s₁, α -s₂, β and κ) of unstable non-acid and stable milks at the alcohol test at 78% (v/v). Samples were collected from all the dairy farms that provide milk to a dairy plant located in Casa Branca – São Paulo State. Sampling procedures were done on March, May, July and September 2007. Milk samples from each dairy farm presenting instability to alcohol test at 72% (v/v) and acidity less than 18°D were considered as unstable non-acid milk. From the total of unstable samples to alcohol test at 72% (v/v), 64.77% were identified as unstable non-acid milk. The frequency of unstable non-acid milk samples varied according the month of sampling, hence indicating a possible seasonal influence on the occurrence of this problem in the dairy herds studied. On July, the incidence of unstable non-acid milk was higher, coinciding with the dry season, when the quality and availability of forage are reduced. On September, at rainfall season, when the availability and quality of forage are better, the incidence of unstable non-acid milk decreased. There was a significant increase in the levels of fat, lactose and SSC in samples collected on July, although a significant decrease was observed in the concentrations of total protein. In this month, a lower concentration of κ -casein was also noted in unstable non-acid milks. However, the differences between the α -s₁, α -s₂, β and κ casein of unstable non-acid milk and stable milk were not significant in all sampling months. Results showed that the occurrence of unstable non-acid milk is common in dairy herds in the studied area, which can cause significant losses to the dairy industry and dairy farms due to the discharging of milk.

Keywords: unstable non-acid milk; casein fractions; chromatography; casein stability; physical -chemical analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frascos etiquetados contendo as amostras de leite e placas de petri onde eram realizadas as leituras diante do teste do álcool.	32
Figura 2. Soluções de álcool nas concentrações 72, 74, 76 e 78% (v/v).....	33
Figura 3. Demonstração do teste do álcool (Etapa I): Colocação de 4 mL de leite da amostra nas placas de petri.....	33
Figura 4. Demonstração do teste do álcool (Etapa II): Colocação de 4 mL de solução de álcool nas placas de petri.....	34
Figura 5. Demonstração do teste do álcool (Etapa III): Homogeneização.....	34
Figura 6. Demonstração do teste do álcool (Etapa IV): Interpretação do resultado: Ausência de formação de grumos, resultado negativo.	35
Figura 7. Demonstração do teste do álcool (Etapa IV): Interpretação do resultado: Presença de grumos, resultado positivo.....	35
Figura 8. Injeção da amostra no sistema CLAE.	38
Figura 10. Resultados da prova do álcool em diferentes percentuais (v/v) e meses de realização da análise. n = 451.....	42
Figura 11. Ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) e de amostras ácidas em relação às amostras positivas ao teste do álcool a 72% (v/v) em diferentes meses.....	43
Figura 12. Cromatograma obtido na análise das frações de caseína. Padrão contendo 4,0 mg/mL de α_s -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína.	15
Figura 13. Cromatograma das frações de caseína de uma amostra de leite estável.	15
Figura 14. Cromatograma das frações de caseína de uma amostra de LINA.....	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição (porcentagem) do leite de vacas de diferentes raças especializadas de 15 regiões temperadas.	15
Tabela 2. Requisitos físico-químicos do leite cru resfriado.	15
Tabela 3. Número de amostras por período de amostragem.	31
Tabela 4. Composição e características físico-químicas dos leites estáveis e LINA.	48
Tabela 5. Concentrações das frações de caseína nos leites estáveis e LINA nos diferentes meses de colheita.	17
Tabela 6. Percentuais de cada fração em relação ao total de caseína ($\alpha_{S1} + \alpha_{S2} + \beta + \kappa$) nos leites estáveis e LINA nos diferentes meses de colheita.	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ca	Cálcio
CMT	California Mastitis Test
cel	Células
CCS	Contagem de células somáticas
ESALQ	Escola de Agricultura Luiz de Queiroz
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Grama
IN 51	Instrução Normativa n. 51
LMMA	Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos
LINA	Leite Instável Não Ácido
L	Litros
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
P	Fósforo
USP	Universidade de São Paulo
UHT	Ultra High Temperature
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade formadora de colônia
SILA	Síndrome do Leite Anormal
ST	Sólidos totais

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	Beta
κ	Kapa
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
r	Coefficiente de correlação
r^2	Coefficiente de determinação
m	Massa
μ	Micro
v	volume
$=$	Igual
$>$	Maior
®	Marca Registrada
\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Composição e Características físico-químicas do leite	14
2.2 Considerações Gerais sobre Proteínas no Leite.....	16
2.2.1 Classificação das Proteínas no Leite	17
2.3 Estabilidade das Micelas de Caseína.....	19
2.4 Avaliação da Estabilidade das Proteínas do leite	20
2.5 Ocorrência do Leite Instável Não Ácido (LINA).....	22
2.6 Composição e Características Físico-Químicas do Leite Instável Não Ácido (LINA)..	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Descrição do Universo Amostral.....	30
4.2 Colheita de Amostras de Leite	30
4.3 Avaliação da Estabilidade do Leite à Prova do Álcool.....	32
4.4 Caracterização do Leite Instável Não Ácido (LINA) e do Leite Estável	36
4.5 Análises de Composição e Físico-Química do Leite.....	36
4.6 Avaliação das Frações de Caseína.....	37
4.7 Análise dos Resultados.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Avaliação da Estabilidade do Leite à Prova do Álcool.....	42
5.2 Caracterização do Leite Instável Não Ácido (LINA) e do Leite Estável	43
5.3 Composição e Físico-Química do Leite	46
5.4 Frações de Caseína do Leite	14
6. CONCLUSÕES.....	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

O leite constitui a matéria-prima para as indústrias de laticínios, apresentando grande valor nutritivo para a nutrição humana, e, portanto, merecendo atenção especial e um controle de qualidade adequado (DONATELE et al., 2003).

Ao se falar em qualidade do leite, os avanços foram lentos e por etapas, pois o transporte do leite era realizado em latões não refrigerados. A implantação definitiva da coleta a granel só veio ocorrer na década de 90, quando uma palavra chave contaminou a economia brasileira e mundial: globalização. A partir deste momento a sociedade passa a ter uma postura mais crítica em relação aos produtos que compra, exigindo leite de melhor qualidade (RUBEZ, 2007).

A qualidade do leite está diretamente relacionada à saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualificação da mão-de-obra, higiene dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, bem como o transporte adequado até a indústria. Todos esses fatores influenciam a sua composição original e, conseqüentemente, as características de sabor, cor, cheiro e viscosidade (PINNA e LIZIEIRE, 2000).

O principal fator que tem impulsionado a melhoria da qualidade do leite no Brasil é a demanda crescente por parte dos laticínios, indústrias e dos consumidores por produtos de qualidade aumentada, refletindo assim, na necessidade de implantação de medidas visando seu aumento na matéria-prima.

O tratamento térmico do leite tem como objetivo a garantia da segurança ao consumidor e o aumento da conservação dos produtos, o que é obtido pela redução de microrganismos patogênicos e deteriorantes, assim como da atividade enzimática (SPREER, 1991).

A indústria de laticínios busca a recepção de leite de elevada estabilidade térmica, uma vez que tal característica é essencial para o processamento de derivados lácteos, principalmente para os que sofrem tratamentos térmicos severos ou com vida de prateleira longa. Atualmente, a redução da estabilidade térmica do leite é um problema freqüentemente encontrado em vários estados do Brasil (BALBINOTTI et al., 2003).

A acidez elevada, principalmente aquela decorrente da proliferação de bactérias mesófilas, constitui o principal fator que diminui a estabilidade térmica do leite. Entretanto, a

perda da estabilidade pode ocorrer em leites não ácidos, determinando a ocorrência do produto conhecido como Leite Instável Não-Ácido (LINA).

Este problema pode provocar enormes prejuízos ao setor lácteo, pois a perda da estabilidade da caseína frente à prova do álcool, que causa a sua precipitação, ocorre mesmo sem o aumento da acidez do leite. Em muitos casos, o leite com tais alterações é erroneamente interpretado como ácido, penalizando o produtor sem que este possa identificar o que acontece no rebanho. Por outro lado, acredita-se que caso esse leite chegue à indústria, não resista ao processo térmico, especialmente Ultra High Temperature (UHT) (BALBINOTTI et al., 2003; DONATELE et al., 2003).

Estes fatos justificam a importância do presente trabalho, cuja finalidade foi determinar a ocorrência de LINA no Estado de São Paulo, comparando seus parâmetros físico-químicos, contagem de células somáticas e frações de caseína com os obtidos por leites estáveis à prova do álcool a 78% (v/v).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Composição e Características Físico-Químicas do Leite

O leite, sem outra especificação, é o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa, ininterrupta e em condições de higiene, de vacas sadias (MAPA, 1980). O leite bovino é um líquido complexo que contém água, glicídios (basicamente lactose), gorduras, proteínas (principalmente caseína), minerais e vitaminas em diferentes estados de dispersão (WALSTRA e JENNESS, 1987). O leite e seus derivados são os principais componentes da dieta humana em muitas partes do mundo (FOX e MCSWEENEY, 2003).

A função biológica do leite é o fornecimento de nutrientes e proteção imunológica para o recém nascido, uma vez que estão presentes na sua composição todos os nutrientes requeridos para a manutenção e o crescimento (energia, aminoácidos, minerais e vitaminas), o que caracteriza o leite como alimento completo. O leite é uma combinação de várias substâncias na água e pode ser caracterizado como: suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas ao cálcio (Ca) e fósforo (P); emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis e solução de lactose, proteínas solúveis em água, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTOS e FONSECA, 2007).

A mudança na composição do leite pode alterar significativamente o seu valor como matéria-prima para a fabricação de derivados. Para ilustrar esse fato, Santos e Fonseca (2007), citam que, uma diminuição de 0,5% de sólidos totais ou 0,1% em proteínas pode significar uma perda de até 5 toneladas de leite em pó ou 1 tonelada de queijo, respectivamente, para cada milhão de litros de leite processados.

Segundo Santos e Fonseca (2007), a composição média do leite de vacas das diferentes raças leiteiras é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição (porcentagem) do leite de vacas de diferentes raças especializadas de regiões temperadas.

Componentes	Colostro ²	Holandesa	Jersey	Pardo-suíço	Ayrshire	Guernsey
Proteína (%)	14,30	3,29	3,98	3,64	3,48	3,75
Gordura (%)	3,60	3,54	5,13	3,99	3,95	4,72
Cinzas (%)	5,20	0,72	0,77	0,74	0,72	0,76
Lactose (%)	3,10	4,68	4,83	4,94	4,60	4,71
EST ¹ (%)	22,10	12,16	14,42	13,08	12,77	14,43

¹ Extrato seco total.

² Adaptado de Roy, 1980.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Resfriado, (MAPA, 2002), o leite cru resfriado deve apresentar os seguintes requisitos mínimos de qualidade dentro da propriedade rural.

Tabela 2. Requisitos físico-químicos do leite cru resfriado.

Requisitos	Limites
Gordura, g/100g	>3,0 (leite integral) ¹
Densidade relativa a 15°C g/mL	1,028 a 1,034
Acidez titulável, g ácido láctico/100mL	0,14 a 0,18 (14-18°D)
Extrato seco desengordurado, g/100g	>8,4
Índice crioscópico	Máx. - 0,512°C
Proteínas, g/100g	>2,9

¹ É proibida a realização de padronização ou desnate na propriedade rural.

Fonte: MAPA, 2002.

O conhecimento da composição do leite é uma ferramenta estratégica para o produtor que pode planejar e aplicar os efeitos da alimentação, do manejo reprodutivo e da genética sobre a lactação. Também é importante para a indústria processadora para manipulação das

características físico-químicas do leite para a elaboração de diferentes produtos lácteos (SANTOS e FONSECA, 2007).

A gordura possui importantes funções e características específicas, dentre elas: é a maior fonte de energia do leite, possui inúmeras propriedades que permitem diversificação nas indústrias lácteas, é responsável por boa parte das características sensoriais do leite. Existem essencialmente três maneiras de influenciar o teor de gordura do leite: seleção genética, identificação e manipulação dos genes que controlam a composição do leite e pela nutrição. Apesar do melhoramento genético ser uma importante via para o aumento da gordura no leite, a nutrição é a forma mais rápida de se atingir tal objetivo (SANTOS e FONSECA, 2007).

De acordo com Harris e Bachamn (1988) o fator que mais interfere no percentual de gordura do leite é o teor de fibra da dieta, ou a relação concentrado/volumoso. Assim, quanto maior o teor de fibra na alimentação, maior o teor de gordura do leite, devido à variação na proporção de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen. Uma maior ingestão de fibra aumenta a produção de ácido acético e reduz a proporção de ácido propiônico. O ácido acético é um dos principais precursores da gordura do leite e seu acréscimo está diretamente relacionado com o aumento desta no leite (CARVALHO, 1977).

2.2 Considerações Gerais sobre Proteínas no Leite

Uma das principais funções fisiológicas do leite é a de fornecer proteção ao organismo de quem o consome, sendo a maior parte desta função proporcionada pelas proteínas e peptídeos em sua composição (FOX e MCSWEENEY, 2003).

A proteína é atualmente o componente do leite mais valorizado na maioria dos países. A valorização da proteína em detrimento da gordura tem se tornado uma tendência, uma vez que muitos consumidores estão mais conscientes dos valores nutricionais e calóricos dos alimentos e a sua relação com a saúde (SANTOS e FONSECA, 2007).

A facilidade com que o leite pode ser convertido em uma extensa variedade de diferentes e atrativos produtos é, provavelmente, a sua mais importante característica do ponto de vista industrial. A fabricação de muitos destes produtos depende de algumas propriedades únicas das proteínas do leite, que vêm recebendo uma atenção considerável da pesquisa (FOX e MCSWEENEY, 2003).

Segundo Ribas (1998), as porcentagens de proteína nos leites oriundos de vacas das raças Holandesa, Jersey e Pardo-Suiça são 3,11; 3,68 e 3,37%, respectivamente.

Dentre os parâmetros de qualidade, a proteína do leite é uma das mais importantes, principalmente para a indústria, em decorrência da sua relação com o rendimento industrial. Assim como esta visa a proteína do leite, a legislação nacional com a Instrução Normativa 51 (IN51) do Ministério da Agricultura, estabelece o teor de proteína mínimo de 2,9% para o leite ser passível de comercialização entre produtor e indústria (MAPA, 2002). Com isso intensificaram-se as pesquisas na área de quantidade de proteína no leite.

Diversos fatores podem afetar a produção de proteína láctea da vaca, entre os quais destacam-se as características genéticas, estágio de lactação, alimentos utilizados, formulação da dieta, manejo alimentar e condições ambientais. Dentre esses fatores, a grande maioria apresenta possibilidades limitadas de manipulação, quando comparado com a gordura do leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

Embora a quantidade de proteína seja importante para o rendimento industrial, existe também a preocupação com a qualidade da proteína em termos de estabilidade térmica, uma vez que as indústrias de laticínios buscam matérias primas que resistam ao processamento térmico (ROMA JUNIOR et al., 2007).

2.2.1 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 e enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

As proteínas do soro do leite apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto, elevado valor nutritivo (SGARBIERI, 1996). Constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (WONG et al., 1996). No soro de leite bovino predomina a β -lactoglobulina (β -LG), que praticamente não ocorre no leite humano. Cerca de 12 variantes genéticas já foram identificadas no soro de leite bovino, sendo as duas principais as β -LG A e B (PANICK et al., 1999). A β -LG é uma proteína termossensível e vários efeitos são produzidos por ação da temperatura, entre eles, a perda de solubilidade (IAMETTI et al., 1996). Durante o processamento do leite em escala industrial, a β -LG é apontada como

responsável pelo início do processo de agregação que conduz a uma obstrução e à conseqüente perda de eficiência dos trocadores de calor (SAWYER e KONTOPIDIS, 2000).

Outra importante proteína encontrada no soro de leite é a α -lactoalbumina (α -LA), sendo que duas variantes genéticas já foram identificadas (A e B), porém somente a variante B tem sido encontrada em leite das raças bovinas ocidentais (SGARBIERI, 2005). A α -LA tem uma alta afinidade pelo Ca^{++} e outros íons metálicos.

Das proteínas do soro, a proporção das frações de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina corresponde a 3:1 (m/m), respectivamente (WALSTRA e JENNESS, 1984).

As caseínas compreendem as principais proteínas encontradas no leite, sendo que aproximadamente 80% da proteína total do leite bovino, é formada pela caseína (CHEFTEL et al., 1989).

A caseína é uma fosfoproteína sintetizada nas células epiteliais da glândula mamária e secretada na forma de micelas. Normalmente, a caseína é bastante estável em altas temperaturas e não é afetada pela pasteurização, entretanto quando há acidificação do leite, ocorre a desestruturação das micelas e formação do coágulo (SANTOS e FONSECA, 2007). São classificadas em quatro subgrupos: caseínas α , β , κ e γ , sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferenciadas (α_{S0} a α_{S5}). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas, que são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na seqüência primária da cadeia polipeptídica (SGARBIERI, 2005).

As proporções de ocorrência para α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseínas, são, respectivamente, 4:1:4:1 (m:m:m:m) (WALSTRA e JENNESS, 1984).

A caseína α_{S1} precipita com níveis de cálcio muito baixos, já a caseína α_{S2} caracteriza-se por ser mais sensível a esta precipitação. A β -caseína é uma fosfoproteína sensível ao cálcio, porém em menores níveis do que as caseínas α . Diferentemente das outras caseínas, a κ -caseína é uma glicoproteína, sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio e assumindo importante papel na estabilidade da micela de caseína (WALSTRA, 1999).

Cerca de 80-90% de toda a caseína presente no leite bovino está na forma de micelas (SGARBIERI, 1998). As micelas de caseína apresentam estrutura supramolecular, cujo arranjo molecular ainda não foi totalmente esclarecido. Vários modelos são encontrados na literatura para representar as micelas de caseína. Nos últimos anos tem ganhado suporte a estrutura

proposta por Walstra (1999), com as seguintes características: as micelas apresentam-se essencialmente esféricas, contudo sua superfície não se apresenta lisa; são formadas de unidades menores denominadas submicelas, contendo principalmente caseína, mas apresenta composição mista; as submicelas variam em composição, existindo particularmente dois tipos principais, isto é, um tipo formado pelas caseínas α -s, β e κ e outro formado pelas caseínas α -s e κ ; as submicelas parecem permanecer ligadas por aglomerados de fosfato de cálcio; as submicelas se agregam até formação completa da micela, em que a caseína κ se posiciona na superfície da micela; a porção C-terminal da caseína κ (glicopeptídeo) projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne por repulsões estáticas e eletrostáticas qualquer agregação posterior de submicelas.

2.3 Estabilidade das Micelas de Caseína

A estabilidade da micela de caseína depende da presença de κ -caseína na sua superfície, a qual se constitui na fração hidrofílica da caseína, que reage com a água e impede a agregação das micelas (CREAMER et al., 1998). Segundo Tuinier e Kruif (2002), a estabilidade estérica gerada pela relativamente esparsa camada externa de κ -caseína em forma de escova é o fator estabilizante mais importante.

Hidrólise enzimática de κ -caseína, temperatura, pH, excesso de Ca^{++} e adição de etanol estão entre os principais fatores que afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína (O'CONNELL et al., 2006).

A hidrólise enzimática da κ -caseína reduz a estabilização estérica das micelas, bem como a repulsão eletrostática intermicelar, resultando na coagulação do leite (FOX et al., 1996).

Microrganismos psicrotóxicos, ao se multiplicarem no leite armazenado em baixas temperaturas, produzem enzimas proteolíticas termoestáveis, a maioria das quais tem ação sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas e coagulação do leite (FAIRBAIN e LAW, 1986).

A 4-5°C a interação hidrofóbica fica fraca e parte das caseínas, em especial, a β -caseína inicia a dissociação das micelas. A hidratação aumenta, já que as cadeias de β -caseína projetam-se da superfície micelar, e uma pequena parte do fosfato de cálcio se dissolve. Estas trocas são responsáveis pela ligeira desintegração das micelas. A 0°C a agregação micelar é difícil de acontecer e, em altas temperaturas, a quantidade de fosfato de cálcio associado às

micelas aumenta e ocorre dissociação da κ -caseína, diminuindo a estabilidade (WALSTRA, 1999).

As ligações que mantêm as micelas de caseína juntas são mais fracas e escassas a pH 5,2 ou 5,3. A pH inferior, com o aumento da atração eletrostática entre as moléculas de caseína, as micelas mantêm-se mais fortemente juntas; a pH superior uma quantidade crescente de fosfato de cálcio coloidal faz o mesmo (WALSTRA, 1999).

Leite mastítico e do final da lactação têm três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da lactação. O fator responsável por este efeito é o aumento do pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e íons (HOLT, 2004).

O excesso de Ca^{++} diminui a solubilidade das proteínas em água. O excesso de sais domina as cargas do solvente (água), diminuindo, conseqüentemente, o número de cargas disponíveis para se ligarem ao soluto (proteína). Desta forma, aumenta a interação soluto/soluto, ocorrendo a precipitação das proteínas (HOLT, 2004).

De acordo com Varnam e Sutherland (1995), a concentração de citrato afeta o conteúdo de cálcio solúvel e a estabilidade do leite. O citrato seqüestra o cálcio iônico, reduzindo o cálcio disponível para unir-se com a caseína e estabilizando as micelas, evitando sua agregação.

2.4 Avaliação da Estabilidade das Proteínas do leite

A estabilidade térmica do leite pode ser definida como o tempo necessário para ocorrer coagulação visível, em determinado pH e temperatura. Esta estabilidade está diretamente relacionada com a capacidade do leite resistir à coagulação pelo calor e, portanto às suas características de processamento (SILVA, 2003). De forma geral, considera-se aceitável estimar a estabilidade térmica do leite pelo emprego da prova do álcool ou do alizarol, que é um teste muito utilizado para determinar a aptidão do leite para o tratamento térmico (SILVA, 2003).

A prova do álcool é o principal teste utilizado nas plataformas de recepção dos laticínios, a fim de detectar a termoestabilidade do leite cru (MOLINA et al., 2001).

Segundo Ponce (2000), tal prova pode ser considerada como a mais simples na recepção de leite em uma indústria de laticínio. Ela pode ser usada como método rápido para estimar a estabilidade das proteínas do leite, uma vez que este teste mede indiretamente a estabilidade do leite ao tratamento térmico (BARROS, 2001). Inicialmente, a prova do álcool

foi utilizada como estimativa da presença de ácido láctico oriundo da fermentação de microrganismos mesófilos, mas atualmente, em condições de refrigeração do leite na própria fazenda, o seu uso está relacionado com a definição da aptidão do leite ao processamento.

Os microrganismos mesófilos predominam em situações em que há falta de condições básicas de higiene ou falhas de refrigeração do leite. Nessas circunstâncias, bactérias como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e algumas enterobactérias atuam pela fermentação da lactose, produzindo ácido láctico e gerando, assim, acidez do leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

A prova do álcool apresenta, como princípio, a atuação do álcool como um desidratante, simulando as condições do 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 proteína, sendo esta amostra considerada não apta para a industrialização (MOLINA et al., 2001).

Deve-se destacar que, inicialmente, o Ministério da Agricultura recomendava que a prova do álcool fosse realizada utilizando-se 68% de álcool, e que atualmente a grande maioria das indústrias utiliza este mesmo teste na concentração de até 78%, o que, segundo Molina et al. (2001), pode levar ao descarte de leite de forma injustificada.

No estudo de Molina et al. (2001), realizado no Chile, a estabilidade térmica do leite foi correlacionada com os resultados da prova do álcool a 70, 75, 80 e 85% (v/v), sendo que o leite estável a 75% de álcool apresentou estabilidade térmica de 60 – 70 segundos a 135°C. Não foi observada uma correlação significativa entre a resistência à prova do álcool e a estabilidade térmica do leite, o que não justificaria a utilização desta prova em concentração acima de 75% de álcool. Ressalta-se que, para a fabricação de leite UHT (Ultra High Temperature) o produto é submetido, durante 2-4 segundos, à temperatura entre 130°C e 150°C.

Zadow (1993) menciona que já nos primeiros estudos sobre a estabilidade do leite ao etanol, determinou-se que os cátions bivalentes e a concentração do etanol teriam um importante efeito na prova do álcool, estabelecendo que a concentração de etanol requerida para coagular a caseína, em um volume igual de leite, estava inversamente relacionada com a concentração do íon cálcio. Ao se utilizar uma maior concentração de etanol na prova do álcool, produz-se uma maior desestabilização das proteínas, devido à redução da constante dielétrica ao meio, modificando a carga das proteínas.

Hone e Parker (1981) afirmaram que o álcool reduz a constante dielétrica ao meio, eliminando a barreira de energia que previne a coagulação. Se a constante dielétrica é

reduzida até um valor de pH crítico, as micelas de caseína precipitam. Hone e Parker (1980) indicam que a estabilidade do leite ao etanol ocorre em função do pH, entre pH 6,4 a 7,0; obtendo-se uma curva sigmóide ao relacionar o pH *versus* concentração de etanol.

De acordo com Pierre (1989), ocorrem variações nas cargas das micelas de caseína. O pH referente à mínima estabilidade será diferente segundo a amostra, visto que dependerá da carga inicial das micelas, o que poderia estar relacionado com a composição química das caseínas do leite.

A estabilidade do leite frente às soluções de etanol depende da composição dos sais e também da composição das caseínas (SCHMIDT e KOOPS, 1977). Guo et al.(1998), ao compararem a estabilidade do leite de cabra e de vaca frente à prova do álcool, determinaram um valor médio para leite de cabra de 44% e para leite de vaca de 72%, o qual foi explicado pela carência de α_{S1} caseína no leite de cabra e seu maior conteúdo de sais.

Farah e Atkins (1992) encontraram valores distintos de termoestabilidade entre os leites de camela e vaca. A menor termoestabilidade determinada no leite de camela, justificase pela menor concentração de κ -caseína e β -caseína.

Guo et al. (1998) mencionam que a estabilidade coloidal das micelas de caseína depende de vários fatores, entre eles, composição das micelas e/ou sua estrutura, pH do meio, temperatura, força iônica e balanço de sais, especialmente o nível de Ca^{++} e distribuição de fosfatos. De acordo com Holt (1991), uma elevada concentração de Ca^{++} tende a unir as micelas de caseína favorecendo a coagulação.

Segundo Santos e Fonseca (2007), de forma semelhante ao cálcio, o citrato do leite encontra-se na forma solúvel e coloidal. A adição de citrato ao leite aumenta a estabilidade térmica em razão de seu efeito de seqüestrar o cálcio iônico.

2.5 Ocorrência do Leite Instável Não Ácido (LINA)

O Leite Instável Não Ácido (LINA) é definido como o produto que apresenta perda da estabilidade da caseína do leite ao teste do álcool, porém como acidez titulável abaixo de 18°D (graus Dornic). 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).

Há várias décadas existem dados sobre alterações nas características físico-químicas do leite por causas não totalmente esclarecidas. O aparecimento de leite que reage

positivamente à prova do álcool ou à prova do cozimento, sem estar ácido nem ser originário de vacas com mastite, é um problema prático que acomete com frequência rebanhos leiteiros e/ou indústrias lácteas (PONCE, 2000).

Em trabalho sobre coagulação do leite fresco frente ao álcool, Mitamura (1937) menciona variações na estabilidade do leite que ocorreram em Utrecht, na Holanda, em 1930.

De acordo com Davies e White (1958), nos casos de Utrecht, a instabilidade da proteína ao calor e ao etanol estava relacionada com a concentração de íons de cálcio no leite. A adição de substâncias alcalinas ou ânions que combinam com o cálcio, como citrato de sódio, reduz a concentração de íons de cálcio, aumentando a estabilidade do leite ao etanol.

Alterações dessa natureza foram relatadas pela literatura em diferentes regiões do mundo, como no Japão (YOSHIDA, 1980), na Itália (PECORARI et al., 1984), no Iran (SOBHANI et al., 1998), no Uruguai (BARROS et al., 1999), na Bolívia (ALDERSON, 2000), em Cuba (PONCE, 2000), na Argentina (NEGRI et al., 2001) e no Brasil (CONCEIÇÃO et al., 2001; DONATELE et al., 2003; MARQUES, 2004; ZANELA, 2004).

Na Itália, Pecorari et al. (1984), estudando leite com tempo de coagulação anormal, encontraram valores baixos para os teores de caseína, lactose e minerais (cálcio e fósforo) e alterações nas propriedades físico-químicas, como baixa acidez titulável, alto pH e resultado positivo na prova do álcool.

No Uruguai, Barros et al. (1999), estudando variações na composição do leite individual em função da positividade à prova do álcool, encontraram 146 amostras de leite negativas na prova do álcool e 70 positivas. Segundo esses autores, a estabilidade do leite ao teste do álcool depende da composição das pastagens, da composição química do leite, das propriedades das micelas de caseína e dos componentes do soro lácteo. A reação positiva de leite com pH normal (6,6 a 6,8) ao teste do álcool pode estar relacionada com variações metabólicas ou nutricionais e com o período de lactação das vacas.

Em Cuba, Ponce (2000) relatou que desde 1976 ocorria, em uma região deste país, produção de leite com reação alcalina e resultado positivo à prova do álcool, sem que este leite fosse proveniente de vacas com mastite ou com lactação prolongada. A única condição associada a estas alterações foi a alimentação de animais da raça Holandesa de alto potencial genético baseada na utilização de cana-de-açúcar como forragem durante a época de seca. O autor propôs a denominação Síndrome do Leite Anormal (SILA) para este tipo de anormalidade do leite.

A SILA, de acordo com Ponce e Hernández (2001), refere-se a um conjunto de alterações nas propriedades físico-químicas do leite, caracterizadas por diminuição dos sólidos totais, da estabilidade térmica e da capacidade tamponante, que causam transtornos nos processos de elaboração de derivados lácteos, no seu rendimento e/ou na sua qualidade final. É um fenômeno ainda não bem identificado em todos os casos, de causa multifatorial associada a transtornos fisiológicos metabólicos e/ou nutricionais com implicações nos mecanismos de síntese e secreção lácteas. Os desequilíbrios em energia e proteína associados às características da ração, com implicações no ambiente ruminal e comprometimento do metabolismo geral (acidose), são os fatores de maior consideração nos casos que ocorreram em Cuba. Essa síndrome teve maior ocorrência em bovinos com alto potencial genético e em épocas de estresse nutricional e/ou calórico.

No período de seca do ano de 1993, em Havana, foi realizado um estudo em 227 propriedades leiteiras com 15.000 vacas em ordenha. Das amostras analisadas, 79% apresentaram resultado positivo no teste do álcool, com acidez menor que 13°D, indicando que nem sempre o resultado positivo no álcool está relacionado com acidez elevada. Nesse estudo, foi acompanhado o processo de ordenha para excluir adulteração por aguagem, bem como foi verificada a ocorrência de mastite, excluindo amostras positivas ao California Mastitis Test (CMT) com duas ou mais cruces. A maior parte dos rebanhos que apresentavam leite instável se caracterizava por apresentar animais com baixa condição corporal e sofrendo de subnutrição, e a alimentação atendia a cerca de 50 a 70% das necessidades básicas. (PONCE e HERNÁNDEZ, 2001).

No Brasil, a incidência do LINA ainda carece de diagnóstico devido à escassez de trabalhos de pesquisa (RIBEIRO et al., 2007).

Em estudo realizado por Balbinotti et al. (2003), foi avaliada a ocorrência de instabilidade do leite na região Sul do Rio Grande do Sul. Foram analisadas 3.353 amostras de leite quanto à prova do álcool (76% (v/v)) e acidez titulável. De acordo com os resultados, a grande maioria (72,2%) das amostras positivas à prova do álcool (com instabilidade da proteína) apresentou acidez titulável normal, caracterizando que a instabilidade do leite observado no estudo não tinha origem da presença de ácido láctico.

Zanela (2004), ao analisar 2.396 amostras de leite provenientes da região noroeste do Rio Grande do Sul de setembro de 2002 a agosto de 2003, verificou que 55,2% destas apresentaram LINA.

Na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Donatele et al. (2003) constataram que 59,6% dos quartos analisados de vacas leiteiras produziram leites positivos ao teste do

Alizarol diluído em álcool a 72% (v/v), sem que houvesse nenhum fator conhecido determinante de acidificação. Observou-se que 13,6% das amostras positivas possuíam acidez entre 18,1 e 20°D, ou seja, dentro do padrão normal estabelecido pela legislação brasileira (15-20°D) (MAPA, 1980). Segundo os autores, esse problema acarreta perdas econômicas ao produtor, já que o leite é pago atualmente pela negatividade neste teste. No mesmo estudo, os autores verificaram que 89,55% das amostras positivas para o teste do Alizarol estavam dentro da faixa normal de pH, onde nenhuma amostra apresentou valor de pH inferior a 6,4. Scarlatelli (1999) considera o pH normal do leite entre 6,4 e 6,8.

Roma Junior et al. (2007) realizaram um estudo em que 2.981 amostras provenientes dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, foram analisadas no período de outubro de 2005 a setembro de 2006. Foram consideradas, neste estudo, como LINA, as amostras que apresentaram coagulação na prova do álcool (78% v/v), acidez titulável menor que 18°D e pH acima de 6,6. Como resultado, os autores verificaram que 222 amostras foram classificadas com proteína instável (7,4%).

No mesmo experimento foram avaliados os períodos de maior incidência de LINA, que resultaram nos meses de março e agosto de 2006. Os autores atribuíram tal resultado ao fato de haver uma relação direta entre a incidência de LINA e a nutrição animal, onde ocorre sua maior incidência no início do outono (março) e a queda da incidência a partir do início da primavera (setembro), fato este explicado pela estacionalidade de produção e qualidade das forragens entre os períodos citados.

As pastagens representam a fonte de alimento mais importante para a produção de bovinos no Brasil, assim, a produção dos rebanhos depende, fundamentalmente, da produção de forragem, principalmente de gramíneas e leguminosas das pastagens (MARQUES, 2003). No Brasil, existem duas estações climáticas bem definidas, que afetam diretamente a produção de forragem: a das águas e a da seca. Na estação das águas, as condições de umidade, temperatura e luminosidade são geralmente favoráveis ao crescimento das espécies tropicais. Por outro lado, esses fatores climáticos, durante a estação da seca quase sempre são adversos ao crescimento dessas espécies. Como consequência, ocorre uma marcante estacionalidade anual na produção de forragem e na disponibilidade de leite bovino (MARQUES, 2003).

Zanela et al. (2006), realizaram um experimento com o objetivo de avaliar o efeito da restrição alimentar na incidência do LINA e concluíram que a restrição alimentar de 40%, nas exigências nutricionais de matéria seca, proteína e energia, aumenta a ocorrência de LINA em vacas Jersey, quando se utiliza álcool 76% na avaliação da instabilidade.

2.6 Composição e Características Físico-Químicas do Leite Instável Não Ácido (LINA)

Oliveira e Timm (2006) analisaram 282 amostras de leite cru obtidas na Região Sul do Brasil; comparando as amostras com instabilidade da caseína (LINA) com as amostras de leites normais. O componente do leite que apresentou maior variabilidade foi a gordura, havendo um aumento significativo da média dos teores de gordura do leite normal (3,04%) em relação ao LINA (3,30%). Por outro lado, o leite normal apresentou teores médios de lactose (4,33%) significativamente mais elevados que a média da lactose do LINA (4,16%). Marques et al. (2007) verificaram um aumento significativo nos níveis de gordura ao compararem os valores apresentados pelo leite normal (3,52%) com os do LINA (3,62%).

Outros autores obtiveram resultados semelhantes. Barros et al. (2001), estudando variações do leite individual em função da positividade à prova do álcool, encontraram para teores de gordura e lactose, respectivamente, médias de 3,95% e 4,65%, para resultados positivos, e de 3,40 e 4,84%, para resultados negativos.

Ponce e Hernández (2001) observaram aumento nos teores de gordura e diminuição nas concentrações de lactose no leite após a reprodução experimental de um quadro de síndrome do leite anormal (SILA). Marques (2004) também obteve uma queda nos níveis de lactose, sendo que os valores médios obtidos para leite normal e LINA foram respectivamente, 4,42% e 4,32%.

Já Zanela et al. (2006), encontraram uma tendência de aumento no teor de gordura no LINA, porém não estatisticamente significativa. Sobhani et al. (1998) não encontraram diferença significativa para a variação de gordura no leite instável ao álcool, porém a lactose para as amostras deste tipo de leite apresentou valores inferiores quando comparados com os do leite normal.

Uma alimentação rica em fibras explicaria as alterações de composição observadas e, conseqüentemente, levantaria a hipótese da ligação deste tipo de alimentação com a ocorrência de instabilidade da caseína, possivelmente através de desequilíbrios minerais que provocariam alterações iônicas no leite (OLIVEIRA e TIMM, 2006).

A composição do leite com caseína estável é sugestiva, devido aos mecanismos metabólicos mencionados, de que os animais que o produziram tenham recebido suplementação com concentrados, em geral melhor balanceados, o que permitiria a produção de leite com equilíbrio iônico normal e com caseína estável. Esta hipótese é corroborada pelo estudo de Rodas et al. (2000), que, trabalhando com rebanhos suplementados e não suplementados com alimento concentrado, observaram que o leite proveniente de rebanho que

não recebeu suplementação apresentou positividade no teste do álcool, com acidez variando de 14°D a 15°D.

Oliveira e Timm (2006) também verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o teor de proteína do leite normal (2,91%) e do leite com instabilidade da caseína (2,89%). Segundo os autores, talvez seja possível que, como o conteúdo protéico do leite não é tão variável quanto a gordura, os fatores que promoveram a elevação desta não tenham sido suficientemente fortes a ponto de alterar os teores de proteína do leite com caseína instável. Também não houve diferença significativa entre o teor de extrato seco total do leite normal (11,17%) e do leite com instabilidade da caseína (11,25%), o que pode ser explicado pela compensação da queda no teor de lactose pelo aumento no teor de gordura. O mesmo ocorreu com o estudo de Sobhani et al. (1998), em que os valores para proteína não se diferenciaram.

Porém, Barros et al. (2001) encontraram diferença significativa entre o teor de proteína em amostras negativas no teste do álcool, com média de 3,23%, e positivas, com média de 3,49%. Já Marques (2004), verificou que os níveis de proteína bruta diminuíram no leite classificado como LINA (3,03%) quando comparado com o leite normal (3,06%). Resultados semelhantes foram obtidos por Ponce e Hernández (2001).

A contagem de células somáticas (CCS) apresentou diferença estatística no experimento de Marques (2004). Para as amostras normais foi encontrado o valor de 401.000 cél/mL, enquanto que para o LINA, 463.000 cél/mL. Tais resultados diferem dos obtidos por Donatele et al. (2003) e Zanela et al. (2006), que analisaram amostras de leite e não encontraram relação entre leite positivo ao álcool e alta CCS.

No Brasil, a incidência do LINA ainda necessita de diagnósticos devido à falta de trabalhos de pesquisa. As causas do LINA ainda não estão totalmente esclarecidas, entretanto, sabe-se que o LINA é um problema multifatorial. Há indícios de que o padrão de proteína produzido possa ter importante influência na estabilidade do leite. Além disso, há citações da ação de microrganismos como causa da instabilidade. Também existem indícios de que níveis elevados de cálcio iônico resultem em menor estabilidade, e por outro lado, a temperatura provocaria alteração na conformação da caseína aumentando a estabilidade do leite (RIBEIRO et al., 2007).

Zanela et al (2006) afirmam que a etiologia do LINA não se encontra associada apenas a fatores nutricionais, mas pode estar associada também a fatores genéticos. Tais autores ainda afirmam que há necessidade de maior número de trabalhos para avaliar com maior precisão as causas do LINA. Ressalta-se que a ocorrência do LINA tem sido constatada em

várias regiões do Brasil, porém as causas relacionadas ainda não foram completamente esclarecidas. Conseqüentemente, leites identificados como LINA são erroneamente interpretados como ácidos, penalizando o produtor sem que este possa identificar o que acontece no rebanho.

A Instrução Normativa nº 51, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento evidencia a preocupação com as condições higiênico-sanitárias do leite, porém não faz referência à composição química, que também é importante para a obtenção de produtos de qualidade, e pode estar relacionada com as causas para a ocorrência do LINA. Não há muitas referências de estudos disponíveis na literatura sobre a participação relativa das frações protéicas nos leites identificados como LINA.

Com relação à possível influência do LINA sobre o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos, Ponce (2000) observou maior deposição de sujidades nos equipamentos de processamento térmico, ocasionando interrupções adicionais durante o processo para realização de limpezas nos trocadores de calor. Além disso, o autor também relatou alterações na fabricação de derivados lácteos (especialmente de queijos e iogurtes), tais como: redução no rendimento, aumento no tempo de coagulação, surgimento de características indesejáveis no coágulo, alta retenção de água, perda de proteínas no soro. Estes resultados, no entanto, diferem dos obtidos por Ribeiro et al. (2007), que compararam o efeito do LINA na industrialização do iogurte batido com iogurtes fabricados com leites considerados normais. Neste experimento, os autores observaram que não houve 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.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a ocorrência e as características físico-químicas do LINA no leite de propriedades leiteiras da região de Casa Branca, Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar o LINA em amostras de leite de conjunto das propriedades leiteiras citadas no período de março a setembro de 2007;
- b) Determinar as características físico-químicas (pH, acidez, sólidos totais, gordura, lactose, proteína total), contagem de células somáticas (CCS) e as frações de caseína (caseínas α -S₁, α -S₂, β e κ) dos leites identificados como LINA e de leites estáveis à prova do álcool;
- c) Avaliar comparativamente os resultados obtidos nos leites identificados como LINA e estáveis à prova do álcool.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição do Universo Amostral

As amostras de leite foram colhidas em propriedades leiteiras fornecedoras de uma usina de beneficiamento localizada no Município de Casa Branca, Estado de São Paulo, cujo volume médio de leite captado atualmente encontra-se em torno de 40.000 L/dia. A referida empresa conta no momento com cerca de 100 produtores, sendo a coleta de leite totalmente granelizada.

Tal empresa possui em média 9 linhas para a captação do leite, contemplando diversos produtores da região de Casa Branca/SP. Todas as propriedades cadastradas para o fornecimento de leite possuem tanques de expansão, visando à manutenção da qualidade desta matéria prima. Durante o ano, ocorre uma pequena variação no número de produtores cadastrados, ou seja, não há um número fixo de produtores ao longo dos meses.

O transporte do leite das propriedades até a usina de beneficiamento é feito através de caminhões isotérmicos conduzidos por seus respectivos motoristas, estes passam por um treinamento, onde são instruídos sobre a correta maneira de realizar as colheitas das amostras de cada propriedade.

A usina processa, principalmente, leite longa-vida, mas apresenta também, outras linhas de processamento, tais como diversos tipos de queijos, manteiga, bebidas lácteas e doce de leite, além de leite pasteurizado tipo B.

4.2 Colheita de Amostras de Leite

Foram realizadas amostragens nos meses de março (verão), maio (outono), julho (inverno) e setembro (primavera) de 2007 (Tabela 3). As amostragens contemplaram todos os produtores fornecedores de leite do laticínio nos respectivos períodos, totalizando 451 amostras de leite durante o experimento.

Tabela 3. Número de amostras por período de amostragem.

Período	Amostras de Leite
Março	117
Maio	100
Julho	125
Setembro	109
Total	451

De acordo com a rotina de procedimentos da usina, o leite de conjunto de cada propriedade rural foi colhido em sacos plásticos, de capacidade de 300 mL, regularmente no momento da coleta a granel e encaminhado ao laboratório da indústria para a realização de uma série de testes físico-químicos (MAPA, 1981).

Antes do início do experimento, o laticínio forneceu uma lista com os nomes e as respectivas linhas de todos os produtores fornecedores de leite para a empresa. Com estes dados recipientes plásticos de 200 mL com tampa de rosca foram identificados. Em cada pote foram colocadas pastilhas do conservante Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) com 1 tablete para cada 40 mL de leite, com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano no leite por até 7 dias.

No momento em que os caminhões chegavam ao laticínio com os sacos plásticos contendo amostras de leite dos tanques de mistura de cada propriedade rural, cerca de 200 mL do seu volume era transferido para os recipientes plásticos identificados e era realizada uma leve agitação para dissolver as pastilhas do conservante.

Após a coleta, os recipientes eram colocados em uma caixa de isopor identificada e encaminhados à câmara fria do estabelecimento.

Após um período médio de três dias, ou seja, no momento em que as amostras de todos os produtores de todas as linhas já estavam coletadas, os potes eram enviados em caixas de isopor para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), em Pirassununga/SP.

4.3 Avaliação da Estabilidade do Leite à Prova do Álcool

No laboratório, era realizada a identificação das amostras no mais curto tempo possível, para evitar que as amostras se deteriorassem, afinal elas ainda seriam enviadas a outro laboratório para realização de outras análises.

Em uma bancada eram colocados quatro potes por vez, com suas respectivas Placas de Petri (Figura 1) para a realização da prova do álcool a 72%, 74%, 76% e 78% (v/v) (Figura 2). Optou-se por utilizar as Placas de Petri, ao invés de tubos de ensaio, para uma identificação mais clara e precisa das amostras positivas através da visualização de grumos.

O teste do álcool era realizado da seguinte forma: colocava-se 4 mL (Figura 3) de leite e em seguida o mesmo volume da solução de álcool (Figura 4), realizava-se uma leve mistura (Figura 5) e, imediatamente era feita a interpretação do resultado (Figuras 6 e 7).

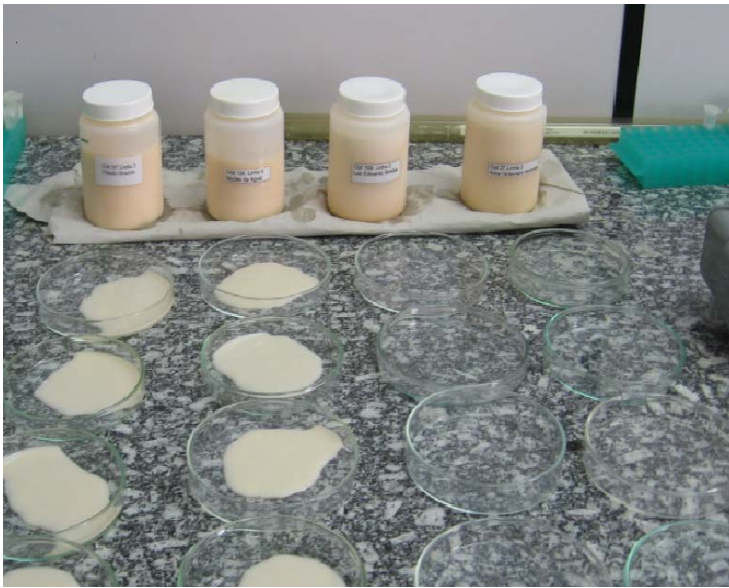


Figura 1. Frascos etiquetados contendo as amostras de leite e placas de petri onde eram realizadas as leituras diante do teste do álcool.



Figura 2. Soluções de álcool nas concentrações 72, 74, 76 e 78% (v/v).



Figura 3. Demonstração do teste do álcool (Etapa I): Colocação de 4 mL de leite da amostra nas placas de petri.



Figura 4. Demonstração do teste do álcool (Etapa II): Colocação de 4 mL de solução de álcool nas placas de petri.



Figura 5. Demonstração do teste do álcool (Etapa III): Homogeneização.

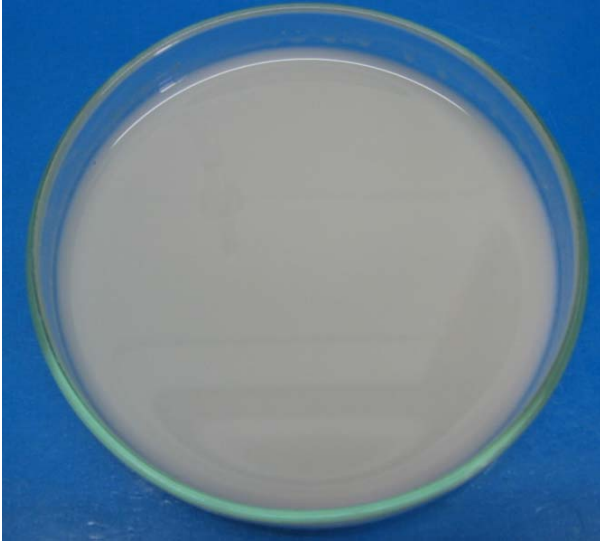


Figura 6. Demonstração do teste do álcool (Etapa IV): Interpretação do resultado: Ausência de formação de grumos, resultado negativo.

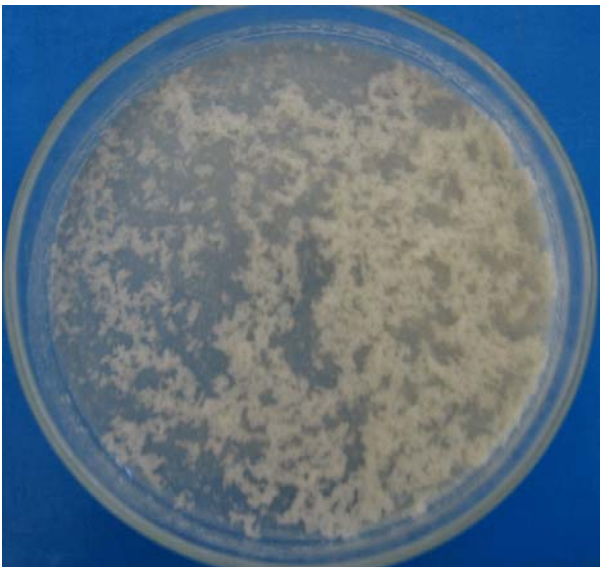


Figura 7. Demonstração do teste do álcool (Etapa IV): Interpretação do resultado: Presença de grumos, resultado positivo.

4.4 Caracterização do Leite Instável Não Ácido (LINA) e do Leite Estável

As amostras que, ao serem testadas na prova do álcool a 72% (v/v), apresentassem formação de grumos foram encaminhadas para a realização do teste de acidez Dornic, através da titulação com 0,1 N NaOH (Hidróxido de Sódio), usando como indicador uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1%, segundo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981).

As amostras que obtiveram acidez Dornic entre 14 e 18^oD foram consideradas como LINA e foram separadas.

Foram consideradas amostras de leite estável, aquelas que apresentaram resultado negativo diante da prova do álcool a 78% (v/v) e acidez titulável entre 14 e 18^oD. Estas amostras também foram separadas.

4.5 Análises de Composição e Físico-Química do Leite

As mensurações do pH foram realizadas logo após a identificação das amostras de LINA e leite normal (com caseína estável) no LMMA.

Utilizou-se um pHmetro de bancada (Digimed, DM20), o qual era ligado 15 minutos antes e calibrado, através das soluções padrões de pH 4,86 e 7,54. Em seguida colocava-se o bulbo do aparelho na amostra e fazia-se a leitura.

A partir das amostragens do mês de maio (334 amostras, Tabela 3), as amostras caracterizadas como LINA ou de leite estável foram separadas e parte do seu conteúdo (35 mL) foi transferida para tubos próprios para serem enviados à Clínica do Leite, localizada na Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba/SP. Neste local foram realizadas as análises de determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e teor de extrato seco desengordurado pelo método infravermelho, segundo Association Of Official Analytical Chemistry (AOAC, 1972).

Também na Clínica do Leite, localizada na Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba/SP, foi realizada a Contagem de Células Somáticas (CCS) nas amostras caracterizadas como LINA e de leite normal.

Tal procedimento foi realizado pelo aparelho Somacount 150[®] (Bentley Instruments, EUA), através de citometria de fluxo.

4.6 Avaliação das Frações de Caseína

As amostras identificadas como LINA e de leite estável foram avaliadas quanto às frações de caseína (caseínas α_{S1} , α_{S2} , β e κ), sendo que as análises foram realizadas em duplicata e o valor final para cada amostra foi obtido pelas suas respectivas médias.

A determinação quantitativa das frações de caseína e proteínas do soro foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia preconizada por Bobe et al. (1998) no LMMA.

O método estabelece que alíquotas de 500 μ L de leite devem ser colocadas em um tubo (ependorf) e congeladas em freezer a -20°C . Tal procedimento foi realizado em todas as amostras selecionadas.

No momento anterior às análises acrescentaram-se 500 μ L de solução contendo 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de cloridrato de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotreitol (pH 7), seguido de agitação por 10 segundos em temperatura ambiente. Após permanecerem 1 hora em repouso, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. A camada de gordura foi removida com uma espátula e o restante da amostra diluído com uma solução contendo 4,5 M de cloridrato de guanidina e mistura de solventes (solvente A, composto por acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 : 900 : 1, pH 2,0). Esta solução continha, aproximadamente, 4 mg/mL de proteínas totais foi utilizada para a determinação das frações no cromatógrafo. Estas amostras foram previamente filtradas através de membrana de PTFE (Millipore, USA) de 0,22 μ m e armazenadas em geladeira (7°C) até o momento da análise cromatográfica, onde 20 μ L de amostra são injetados no sistema CLAE (Figura 8).



Figura 8. Injeção da amostra no sistema CLAE.

A separação, identificação e quantificação das proteínas foram realizadas no mesmo sistema CLAE descrito anteriormente equipado com detector de luz UV. Foi utilizada coluna Júpiter C₁₈ (4 μm x 4,6 x 150 mm) (Phenomenex, Torrance, USA), sendo que 20 μL da solução foram injetadas no sistema CLAE. A corrida cromatográfica era realizada em temperatura ambiente nas condições preconizadas por Bobe et al. (1998), detalhadas a seguir:

Fases móveis: misturas de solventes A (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 : 900 : 1) e B (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 900 : 100 : 1). O programa de gradiente foi iniciado com 25% do solvente B, aumentando-se gradativamente a proporção do solvente B imediatamente após a injeção da amostra [34% (4min.), 48% (11 min.), 50% (13min), 10% (17min)], retornando em seguida às condições iniciais após 2 min; Fluxo: 1,0 mL/minuto; comprimento de onda do detector: 220 nm.

A quantificação das frações (caseínas α_{s1}, α_{s2}, β e κ) nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, obtidos nas amostras, nas equações de regressão das curvas de calibração, construídas utilizando-se padrões de proteínas do leite bovino purificadas (Sigma, USA), preparados nas mesmas condições descritas para as amostras de leite nas seguintes concentrações:

- Caseína α_{s1}: 0,375, 0,75, 1,50 e 3,00 mg/mL;
- Caseína α_{s2}: 0,125, 0,25, 0,50 e 1,00 mg/mL;
- Caseína β: 0,375, 0,75, 1,50 e 3,00 mg/mL;
- Caseína κ: 0,187, 0,375, 0,75 e 1,50 mg/mL.

Preliminarmente, os referidos padrões foram injetados 10 vezes no sistema CLAE (10 vezes cada um, separadamente) sendo que o desvio padrão relativo das áreas obtidas (consideradas, portanto, como replicatas) foi menor que 0,8% para os níveis descritos de proteínas. Deste modo as curvas de calibração foram construídas em cada dia de análise. O coeficiente de determinação (r^2) das curvas variou de 0,9627 a 0,9998, sendo a repetibilidade da técnica de preparação das curvas de calibração para frações protéicas consideradas como adequadas para os fins propostos no experimento.

O método em apreço já se encontrava validado no laboratório, mediante a realização de ensaios repetidos com amostras de leite integral fortificadas com os padrões das frações protéicas (FERNANDES, 2007).

Exemplos de curvas de calibração das frações protéicas encontram-se na Figura 9

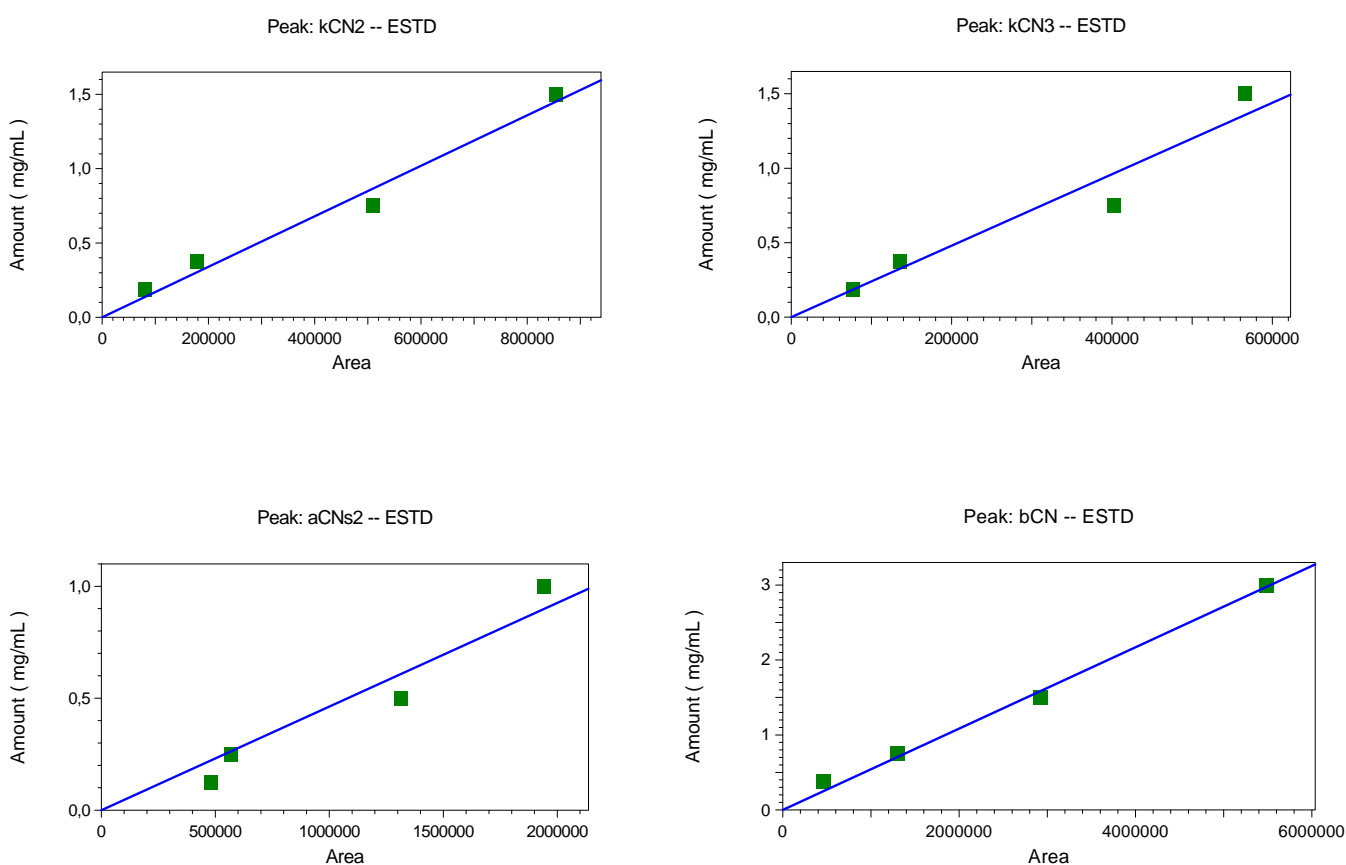
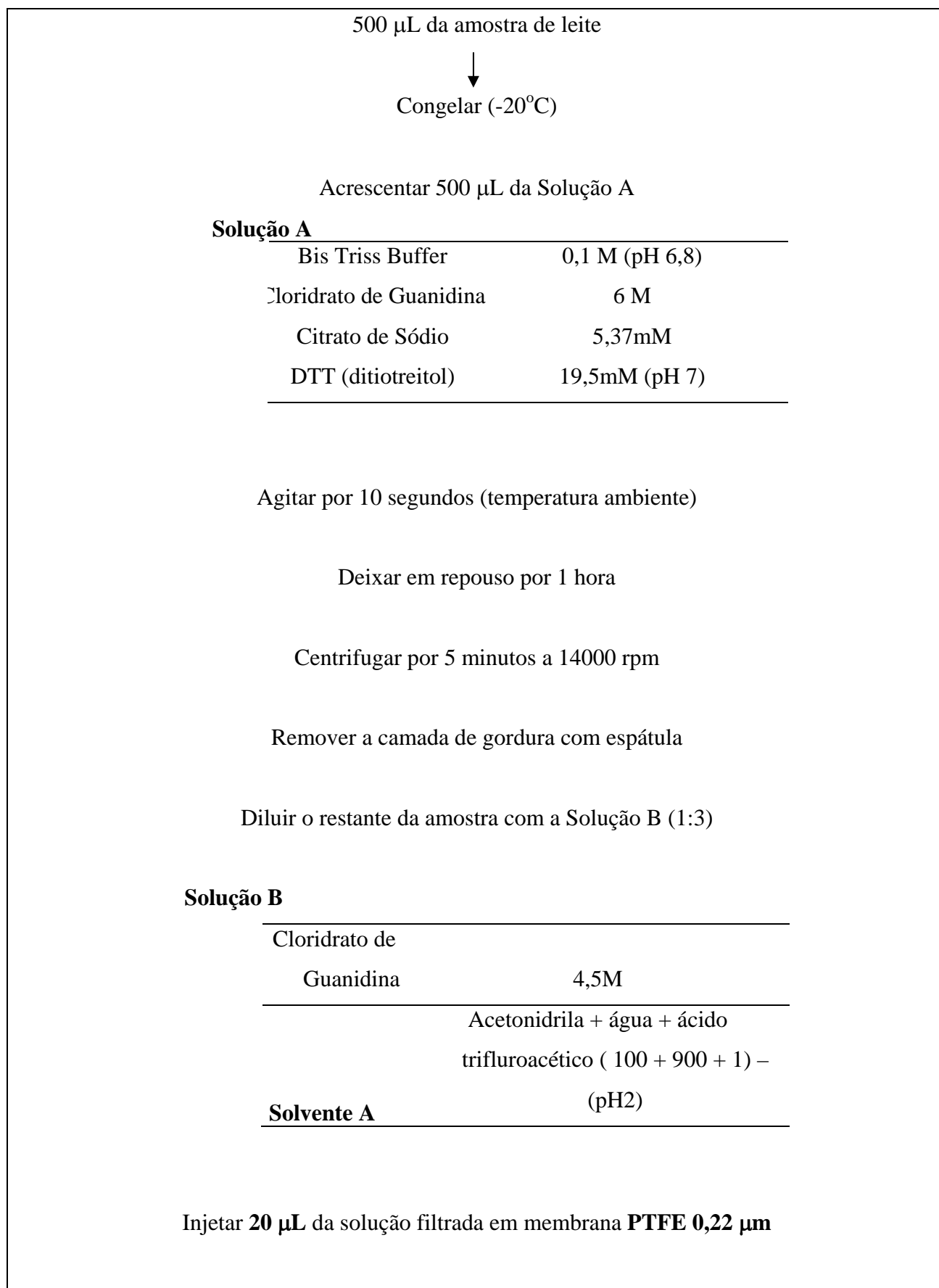


Figura 9. Exemplos de curvas de calibração obtidas na análise cromatográfica das frações de caseína do leite.



Quadro 1: Fluxograma para a quantificação das frações de caseína do leite em sistema CLAE.



4.7 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os procedimentos do *General Linear Model* do SAS[®] (SAS Institute, 1992), para a verificação de diferenças estatisticamente significativas entre as médias das variáveis estudadas nas amostras de LINA e de leite estável analisadas durante o estudo. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste t-Student, adotando-se, como nível de rejeição, $\alpha = 0,05$ (GACULA e SINGH, 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Estabilidade do Leite à Prova do Álcool

Os resultados obtidos na realização da prova do álcool, nas concentrações utilizadas no presente estudo, nos diferentes meses de amostragem podem ser observados através da Figura 10.

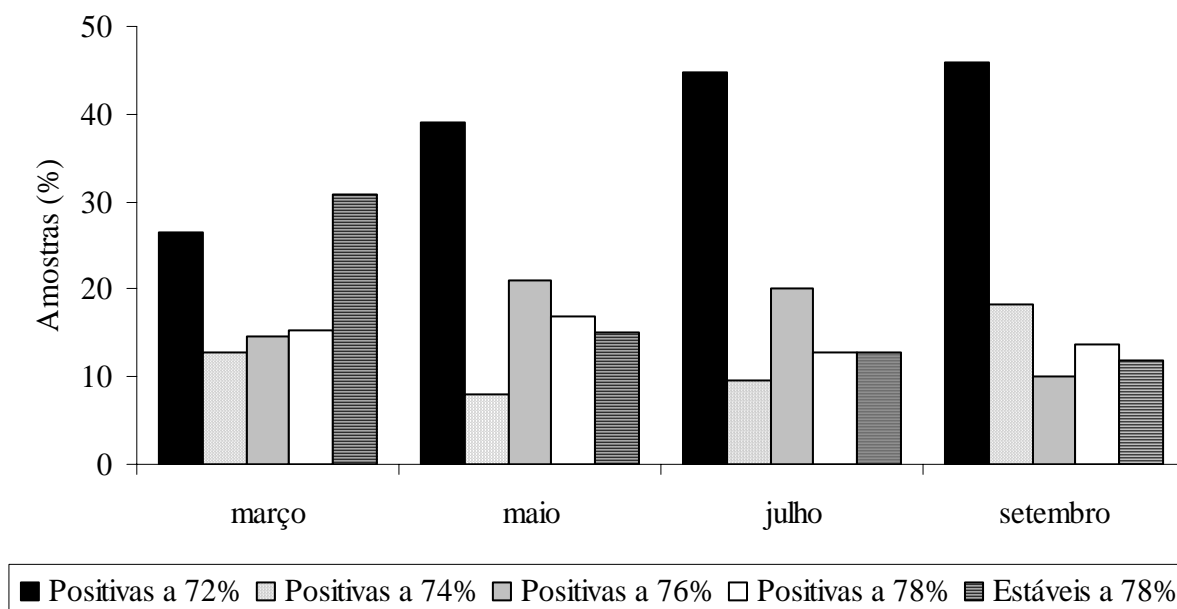


Figura 10. Resultados da prova do álcool em diferentes percentuais (v/v) e meses de realização da análise. n = 451.

As porcentagens de amostras positivas em relação à prova do álcool a 72%, 74%, 76% e 78% (v/v) foram, respectivamente para o mês de: março (26,50 %, 12,82%, 14,53% e 15,38%), maio (39,00%, 8,00%, 21,00% e 17,00%), julho (44,80%, 9,60%, 20,00% e 12,80%) e setembro (45,87%, 18,35%, 10,09% e 13,76%).

Ressalta-se, que segundo as normas do Ministério da Agricultura, a prova do álcool deve ser realizada em concentrações entre 68-72% (v/v) (MAPA, 1981), porém, sabe-se que diversas indústrias receptoras de leite realizam tal teste em concentrações superiores a esta (MOLINA et al., 2001).

Como pode-se observar, os valores de amostras que apresentaram positividade diante da prova do álcool a 72% são altos. Tais dados podem estar associados a uma alta concentração de microrganismos mesófilos, no caso de ter ocorrido falha no sistema de refrigeração do leite nas propriedades. Segundo Santos e Fonseca (2007), esses microrganismos também predominam em situações em que há falta de condições básicas de higiene. Em ambientes propícios, os microrganismos mesófilos atuam pela fermentação da lactose, produzindo ácido láctico e gerando, assim, acidez do leite.

Já os valores de amostras estáveis à prova do álcool a 78% (v/v), ou seja, que não apresentaram coagulação, foram, respectivamente para os meses de março, maio, julho e setembro de 30,77%, 15,00%, 12,80% e 11,93%.

5.2 Caracterização do Leite Instável Não Ácido (LINA) e do Leite Estável

Segundo Molina et al. (2001) a prova do álcool é o principal teste utilizado nas plataformas de recepção dos laticínios, a fim de detectar a termoestabilidade do leite cru. Caso haja floculação do leite, pode-se suspeitar de leite ácido ou com instabilidade de proteína, sendo esta amostra considerada não apta para a industrialização.

A incidência de LINA entre as amostras que apresentaram positividade diante da prova do álcool a 72% (v/v) pode ser verificada na Figura 11.

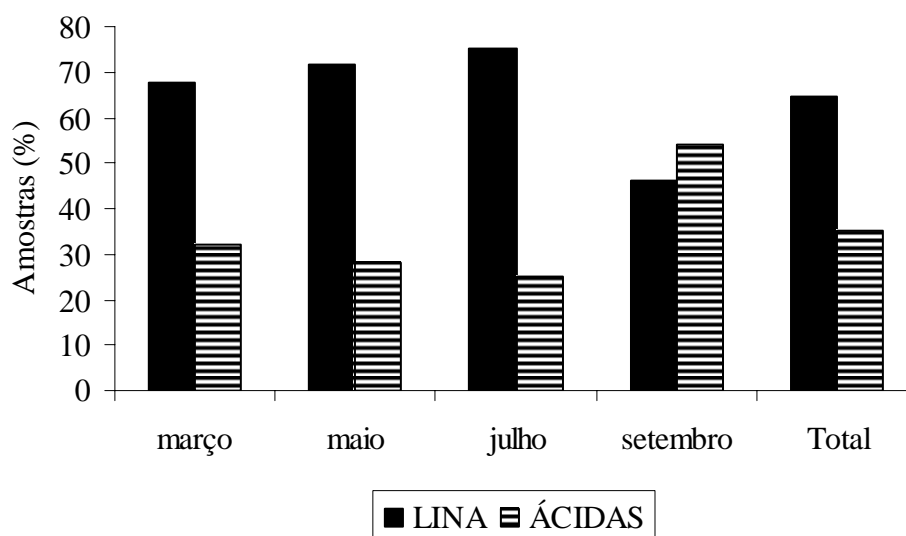


Figura 11. Ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) e de amostras ácidas em relação às amostras positivas ao teste do álcool a 72% (v/v) em diferentes meses.

Neste experimento, do total de amostras positivas a 72% (v/v), 64,77% foram classificadas como LINA e 35,23% como oriundas de leite com presença de acidificação (acidez Dornic superior 18^oD).

Tal resultado comprova a ocorrência do LINA na região de Casa Branca, Estado de São Paulo, concordando com os resultados obtidos por Roma Junior et al. (2007), que também relataram a incidência deste problema neste Estado.

Diante disso, mostra-se que grande parte do leite acaba por ser erroneamente interpretado como ácido. 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). Os produtores ficam desorientados, pois desconhecem as razões para tal resultado falso-positivo na prova do álcool.

Geralmente, estas amostras não são aceitas pelos laticínios, que alegam a possível ocorrência de precipitação da caseína do leite, principalmente para a fabricação de leite UHT, que requer tratamento térmico severo.

Tais resultados, descritos neste experimento, demonstrando a grande incidência de LINA, são semelhantes aos obtidos por Yoshida,(1980), Pecorari et al. (1984), Sobhani et al., (1998), Barros et al., (1999), Alderson (2000) , Ponce (2000) e Negri et al. (2001) em diferentes partes do mundo e no Brasil por Conceição et al., (2001); Donatele et al., (2003), Marques (2004), Zanela (2004), Oliveira e Timm (2006) e Roma Junior (2007). Todos estes pesquisadores relataram a ocorrência do LINA, destacando sua importância para que novas pesquisas fossem realizadas.

Em março, 67,74% das amostras positivas em relação à prova do álcool a 72% (v/v), foram classificadas como LINA, ou seja, apresentavam acidez titulável entre 14 e 18^oD e 32,26% foram classificadas como ácidas, apresentando acidez titulável superior a 18^oD. Para os meses de maio, julho e setembro, as porcentagens de amostras encontradas de LINA e de amostras de leite ácido foram: 71,79% e 28,21%, 75% e 25%, 46% e 54%, respectivamente.

Tais dados demonstram que há uma crescente incidência de LINA nos meses de março, maio e julho sendo que em março ocorreu o final do verão e o início do outono. Já a maior incidência de amostras ácidas ocorreu no mês de setembro, onde iniciou-se a primavera. Em setembro também, pode-se observar uma queda na incidência de LINA. Estes dados indicam que as estações do ano interferem na ocorrência de LINA.

De maio a julho, com o fim do outono seguindo-se do inverno, ocorreu o período de seca, o que segundo Marques (2003), leva a uma produção de pastagens de baixa qualidade nutricional para o rebanho leiteiro. Tal estacionalidade na produção de pastagens, que corresponde ao principal alimento do gado, pode estar relacionada com o aumento na incidência de LINA neste período.

No Brasil, é muito comum o fornecimento de cana-de-açúcar, como opção de volumoso na época da seca, tal fato pode ter contribuído para a maior incidência de LINA neste período. Ponce e Hernández (2001), também verificaram que este fenômeno ocorre mais freqüentemente nos últimos meses do período seco e início da primavera, quando existe baixa disponibilidade de pastos e forragens, além do incremento relativo no fornecimento e consumo de cana.

No período de seca, ainda pode ocorrer uma carência alimentar, ou seja, muitas vezes, os animais não possuem 100% das suas exigências nutricionais atendidas, devido à escassez das pastagens de boa qualidade. Tal fato pode contribuir para a ocorrência de LINA. Tais associações entre restrição alimentar e incidência de LINA foram relatadas por Ponce e Hernández (2001) e Zanela et al (2006).

Em março, final do período de chuvas, a qualidade das pastagens ainda encontrava-se superior, neste período há uma menor incidência de LINA quando comparado com os meses de maio e julho. Já no início de setembro, com a primavera, ocorre uma melhor qualidade das pastagens, sendo então o período com a menor incidência de LINA.

Estes resultados permitem a afirmação de que a baixa disponibilidade de pastos e forragens limita consideravelmente o consumo total de matéria seca e sua digestibilidade, causando transtornos em nível ruminal que se expressam finalmente em problemas metabólicos e alterações variadas na qualidade do leite.

Os resultados do presente trabalho são similares aos obtidos por Roma et al. (2007), que verificaram que os períodos de maior incidência de LINA compreendem os meses de março e agosto de 2006. Os autores atribuíram tal resultado ao fato de haver uma relação direta entre a incidência de LINA e a nutrição animal, onde ocorreu sua maior incidência no início do outono (março) e a queda da incidência a partir do início da primavera (setembro), fato este explicado pela estacionalidade de produção e qualidade das forragens entre os períodos citados.

5.3 Composição e Físico-Química do Leite

Os resultados de composição e físico-química das amostras de leite estáveis e de LINA, nos diferentes meses de amostragem, podem ser observados na Tabela 4.

Nos meses de maio e setembro, não houve diferenças estatísticas entre as amostras de leite estáveis e as amostras de LINA. Ou seja, ambos os tipos de leite, apresentaram resultados semelhantes de pH, acidez Dornic, proteína total, gordura, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e contagem de células somáticas.

Diante de tais resultados, é possível afirmar, que, em meses do ano, fora do período de seca, tanto as amostras estáveis quanto as de LINA apresentam composição e características físico-químicas semelhantes, o que não justificaria a rejeição do LINA pelas indústrias ou a penalização dos produtores que fornecessem este tipo de amostra.

Relativamente aos resultados obtidos em julho, que foi caracterizado pelo período de seca, o pH das amostras de LINA foi estatisticamente inferior ao obtido pelas amostras estáveis, 6,70 e 6,76, respectivamente. Com isso observa-se que ambos os leites apresentaram valores de pH considerados normais. Scarlatelli (1999), considera normal o pH do leite entre 6,4 e 6,8. Diante disso, pode-se afirmar que o LINA não apresenta valores de pH fora da normalidade. A acidez Dornic não apresentou diferenças significativas entre os dois tipos de leite, sendo que a média obtida foi de 17°D. Este valor está dentro do padrão estabelecido pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2002), que considera como normal os valores de acidez entre 14-18°D.

Tabela 4. Composição e características físico-químicas dos leites estáveis e LINA.

	pH	Acidez (°D)	Proteína Total (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Sólidos Totais (%)	ESD (%)	CCS (x1.000cél/mL)
Maio								
LINA (n=30)	6,64±0,017	17,12±0,012	3,18±0,045	3,72±0,120	4,35±0,036	12,11±0,123	8,39±0,074	335,60±65,011
Estável (n=15)	6,70±0,012	16,93±0,102	3,21±0,064	3,45±0,170	4,35±0,051	11,84±0,174	8,43±0,105	286,54±91,939
Média	6,66	17,05	3,20	3,63	4,35	12,02	8,41	319,25
Julho								
LINA (n=23)	6,70 ^b ±0,015	16,99±0,035	2,98 ^b ±0,033	3,61 ^a ±0,098	4,38 ^a ±0,039	11,75±0,121	8,14 ^b ±0,072	491,18 ^a ±57,817
Estável (n=16)	6,76 ^a ±0,018	17,01±0,041	3,11 ^a ±0,039	3,28 ^b ±0,118	4,54 ^b ±0,047	11,81±0,145	8,54 ^a ±0,086	299,06 ^b ±69,321
Média	6,72	17,00	3,04	3,47	4,42	11,78	8,31	412,36
Setembro								
LINA (n=24)	6,64±0,017	16,54±0,021	3,03±0,032	3,87±0,179	4,34±0,044	12,32±0,184	8,26±0,081	567,52±73,038
Estável (n=10)	6,70±0,026	16,58±0,40	2,99±0,049	3,66±0,272	4,35±0,067	11,87±0,279	8,20±0,123	306,40±110,769
Média	6,66	16,56	3,03	3,74	4,35	12,190	8,25	488,39

LINA: Leite Instável Não Ácido.

ESD: Extrato seco desengordurado

CCS: Contagem de células somáticas

As médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferenças significativas no Teste t-Student ($p > 0,05$).

Analisando-se, tanto os valores de pH quanto os de acidez do LINA, observa-se que tais amostras que apresentaram formação de grumos diante do teste do álcool a 72% (v/v), não se apresentaram realmente ácidas, com isso, nota-se que o uso somente do teste do álcool para a identificação de acidez no leite, leva à obtenção de resultados falso-positivos. Resultados semelhantes foram obtidos por Barros et al. (2001), Donatele et al. (2003), Zanela et al. (2006), Oliveira e Timm (2006) e Marques (2004).

A concentração média de gordura no LINA foi significativamente superior à do leite estável, 3,61% e 3,28%, respectivamente. Tais resultados corroboram com os obtidos por Barros et al. (2001), Ponce e Hernández (2001), Zanela et al. (2006), Oliveira e Timm (2006), Marques (2004). Já Sobhani et al. (1998) verificaram não haver diferenças nos teores de gordura entre LINA e leite estável.

Tais resultados podem estar associados pela maior ingestão de volumosos ou por um desbalanço na concentração de concentrado:volumoso. O aumento de volumosos leva a um aumento na concentração de ácido acético que é o principal precursor da gordura no leite.

Em relação à porcentagem de proteína bruta, o LINA apresentou valores médios significativamente inferiores (2,98%) aos obtidos pelo leite estável (3,11%). Tais dados concordam com os obtidos por Ponce e Hernández (2001), Oliveira e Timm (2006) e Marques (2004) que também verificaram uma menor concentração de proteína no LINA quando comparado com leites estáveis. Porém Barros et al. (2001), obtiveram o oposto, sendo que amostras de LINA possuíam maiores concentrações de proteína.

O decréscimo da concentração de proteína bruta do LINA quando comparado com o leite estável pode ser justificado também pelo aumento na ingestão de volumosos ou desbalanço na concentração de concentrado:volumoso, com isso ocorre um aumento na produção de ácido acético (precursor da gordura no leite) e decréscimo na de ácido propiônico (precursor da proteína do leite).

A concentração média de lactose foi significativamente superior no leite estável (4,54%) quando comparada com a obtida pelo LINA (4,38%). Sobhani et al. (1998), Barros et al. (2001), Ponce e Hernández (2001), Marques (2004), Zanela et al. (2006) e Oliveira e Timm (2006) obtiveram resultados semelhantes.

A porcentagem de sólidos totais não apresentou diferenças significativas, já em relação ao extrato seco desengordurado, o leite estável apresentou valor médio significativamente superior (8,54%) ao obtido pelo LINA (8,14%).

Quanto à contagem de células somáticas, a média foi significativamente superior no LINA (491.000 cél/mL), quando comparada com o valor médio obtido pelo leite estável

(299.000 cél/mL). Considerando a relação direta entre a ocorrência de mastite e a perda das características do leite, há uma crescente importância da CCS como parâmetro para avaliar a qualidade do leite não processado. Nas últimas décadas, vários países têm estabelecido limites de referência, cujos valores compreendem: 750.000 cél/mL nos Estados Unidos, 400.000 cél/mL na União Européia (PHILPOT, 2002) e na Nova Zelândia, e 500.000 cél/mL no Canadá; (LARANJA e AMARO, 1998).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu através da Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002, o limite máximo de 1.000.000 cél/mL para o leite cru refrigerado (MAPA, 2002). Com isso, percebe-se que mesmo que os resultados para a CCS tenham sido considerados significativos, observa-se que ambos os valores médios estão abaixo do limite estipulado pelo Ministério da Agricultura. Entretanto, é de fundamental importância a realização de novos estudos que avaliem as possíveis causas da relação entre a CCS e a ocorrência do LINA, conforme obtido no presente trabalho.

5.4 Frações de Caseína do Leite

Na análise das frações de caseína por CLAE, os tempos de retenção para α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína foram 10,24 min, 8,34 min, 10,96 min e 7,60 min, respectivamente. Na Figura 12, pode-se observar um exemplo de cromatograma obtido para o padrão de proteínas, contendo 4,0 mg/mL de α_S -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína.

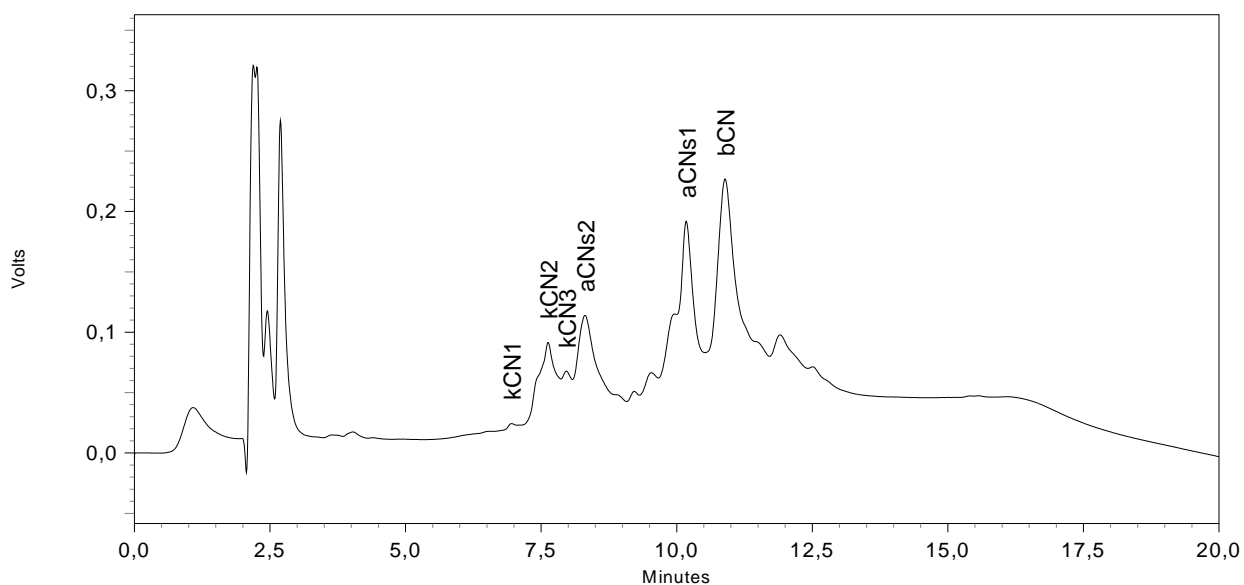


Figura 12. Cromatograma obtido na análise das frações de caseína. Padrão contendo 4,0 mg/mL de α_S -caseína, 3,0 mg/mL de β -caseína e 1,5 mg/mL de κ -caseína.

kCN: κ -caseína; aCNs1: α_{S1} -caseína; aCNs2: α_{S2} -caseína; bCN: β -caseína.

O cromatograma apresentado por uma amostra de leite classificada como estável, pode ser observado na Figura 13.

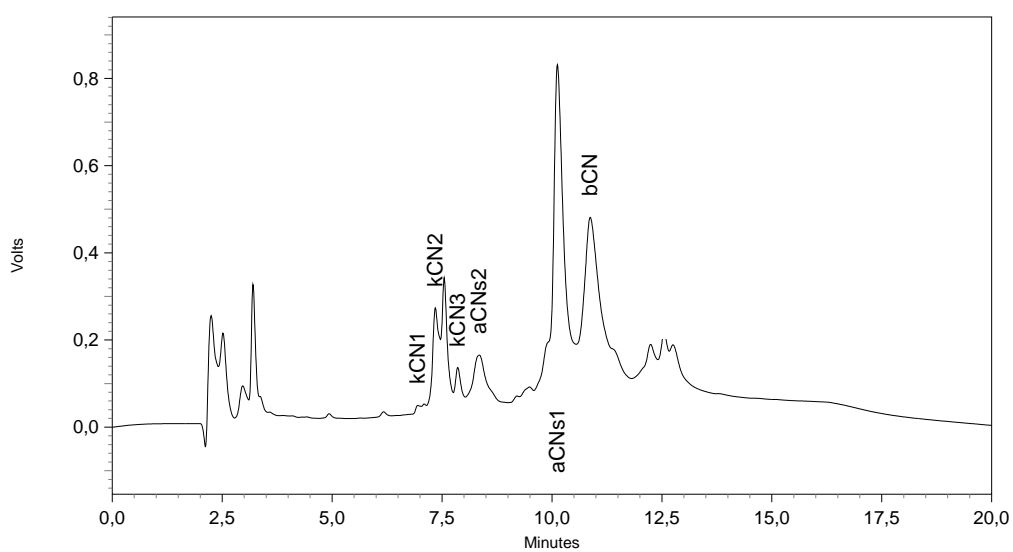


Figura 13. Cromatograma das frações de caseína de uma amostra de leite estável.

kCN: κ -caseína; aCNs1: α_{S1} -caseína; aCNs2: α_{S2} -caseína; bCN: β -caseína.

Nota-se que o cromatograma de uma amostra de leite estável, é similar ao obtido pela amostra padrão.

Observando-se a Figura 14, verifica-se 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 (Figura 13) ou pela amostra padrão (Figura 12). Tal fato indica que não há diferenças no perfil das frações de caseína encontradas no leite estável e LINA.

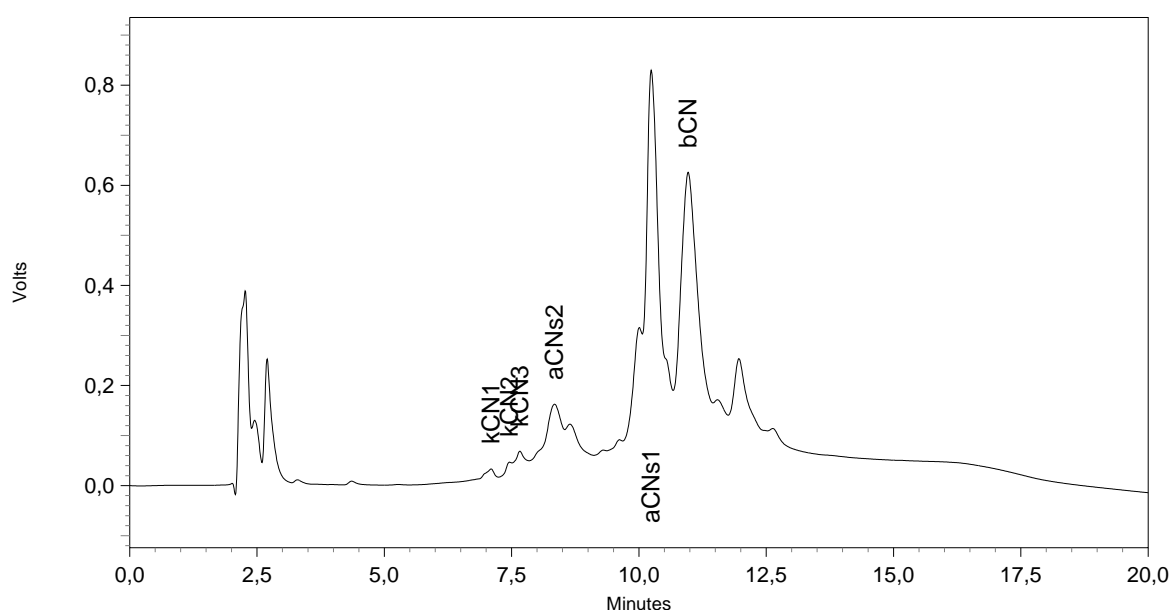


Figura 14. Cromatograma das frações de caseína de uma amostra de LINA.

κCN: κ-caseína; αCNs1: α_{S1}-caseína; αCNs2: α_{S2}-caseína; βCN: β-caseína.

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 podem ser observados na Tabela 5. As concentrações médias de α_{S1} caseína, α_{S2} caseína, β caseína, κ caseína e caseína total, bem como suas médias (mg/mL) não apresentaram efeito significativo. Porém, nota-se que a concentração média de κ 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 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, tal fato pode ter sido influenciado pela menor concentração de κ caseína nessas

amostras de leite. Tal associação é amplamente aceita na literatura (FOX et al. (1996), CREAMER et al. (1998), TUINIER e KRUIF (2002) e O' CONNELL et al. (2006)).

Tabela 5. Concentrações das frações de caseína nos leites estáveis e LINA nos diferentes meses de colheita.

	α_{S1} caseína (mg/mL)	α_{S2} caseína (mg/mL)	α caseína (mg/mL)	β caseína (mg/mL)	κ caseína (mg/mL)	Caseína Total (mg/mL)
Maio						
LINA (n=30)	21,60±1,401	1,71±0,076	23,31±1,434	9,96±0,285	5,64±0,232	38,35±1,661
Estável (n=15)	24,66±1,981	1,74±0,108	26,40±2,029	10,53±0,404	5,39±0,323	41,96±2,349
Média	22,62	1,72	24,34	10,15	5,56	40,05
Julho						
LINA (n=23)	20,26±0,760	1,64±0,154	21,68±0,712	9,38±0,317	4,45±0,549	35,51±0,905
Estável (n=16)	20,13±0,910	2,03±0,185	22,15±0,854	9,65±0,380	4,81±0,658	36,61±1,086
Média	20,20	1,80	22,00	9,49	4,60	36,09
Setembro						
LINA (n=24)	22,66±0,740	1,32±0,137	23,85±0,786	7,84±0,655	5,33±0,346	39,16±1,126
Estável (n=10)	23,41±1,146	1,37±0,213	24,78±1,217	9,84±1,015	4,89±0,536	37,05±1,745
Média	22,88	1,34	24,22	9,25	5,07	38,54

LINA: Leite Instável Não Ácido.

Os valores não apresentaram diferenças significativas no Teste de t-Student ($p > 0,05$).

¹ Valores expressos em média ± desvio padrão.

Tabela 6. Percentuais de cada fração em relação ao total de caseína ($\alpha_{S1} + \alpha_{S2} + \beta + \kappa$) nos leites estáveis e LINA nos diferentes meses de colheita.

	α_{S1} caseína (%)	α_{S2} caseína (%)	α caseína (%)	β caseína (%)	κ caseína (%)	Caseína Total (%)
Maio						
LINA (n=30)	55,28 \pm 1,463	4,57 \pm 0,207	59,85 \pm 1,372	25,81 \pm 0,847	13,35 \pm 1,010	100
Estável (n=15)	57,74 \pm 2,069	4,23 \pm 0,293	61,97 \pm 1,941	25,83 \pm 1,198	12,21 \pm 1,428	100
Média	56,10	4,46	60,56	26,48	12,96	100
Julho						
LINA (n=23)	56,87 \pm 1,473	4,69 \pm 0,450	60,62 \pm 1,304	26,53 \pm 0,922	12,49 \pm 1,304	100
Estável (n=16)	55,01 \pm 1,766	5,61 \pm 0,540	60,98 \pm 1,564	26,65 \pm 1,106	12,73 \pm 1,564	100
Média	55,76	5,07	60,83	26,58	12,59	100
Setembro						
LINA (n=24)	58,11 \pm 1,644	3,44 \pm 0,410	61,56 \pm 1,877	20,93 \pm 1,555	13,50 \pm 0,731	100
Estável (n=10)	63,67 \pm 2,548	3,87 \pm 0,635	67,55 \pm 2,908	24,42 \pm 2,410	12,02 \pm 1,133	100
Média	59,75	3,57	63,32	23,62	13,06	100

LINA: Leite Instável Não Ácido.

Os valores não apresentaram diferenças significativas no Teste de t-Student ($p > 0,05$).

¹ Valores expressos em média \pm desvio padrão.

Resultados semelhantes foram obtidos por Farah e Atkins (1992), que associaram a menor estabilidade do leite de camela perante o de vaca, com a menor concentração de κ caseína existente no leite do primeiro animal.

A estabilidade da micela de caseína depende da presença de κ -caseína na sua superfície, a qual se constitui na fração hidrofílica da caseína, que reage com a água e impede a agregação das micelas (CREAMER et al., 1998). Segundo Tuinier e Kruif (2002), a estabilidade estérica gerada pela relativamente esparsa camada externa de κ -caseína em forma de escova é o fator estabilizante mais importante.

Embora, no presente trabalho, os resultados para α e β -caseínas não tenham sido significativos, pode-se observar que as concentrações destas frações e seus respectivos percentuais (Tabelas 5 e 6) foram inferiores nos leites caracterizados como LINA, quando comparados com os leites estáveis nos meses de maio, julho e setembro.

Tal fato pode indicar uma influência da composição das frações de caseína na ocorrência de LINA, fato que está de acordo com as afirmações feitas por Schmidt e Koops (1977) e Guo et al. (1998) que afirmaram que a estabilidade do leite frente às soluções de etanol depende da composição dos sais e também da composição das caseínas. Porém mais estudos devem ser conduzidos para verificar a possível associação entre κ -caseína e LINA.

6. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos no presente estudo, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir que:

1. A incidência de LINA é maior em julho (inverno) e menor em setembro (primavera), indicando uma possível influência sazonal sobre a ocorrência deste problema.
2. Os valores de acidez Dornic, sólidos totais e extrato seco desengordurado tanto do LINA como do leite estável, não apresentam diferenças significantes.
3. Apesar dos valores referentes ao pH do LINA e do leite estável apresentarem diferenças significativas em julho, ambos estão dentro dos níveis considerados normais.
4. A concentração de gordura e a CCS no LINA, em julho, são superiores à do leite estável.
5. Os teores de proteína bruta e lactose nas amostras colhidas em julho são menores no LINA, em relação ao leite estável.
6. Apesar do nível de κ -caseína ser menor no LINA no mês de julho, não há diferenças significativas entre as concentrações das frações de caseínas α -s₁, α -s₂, β e κ entre os leites estáveis e o LINA.
7. A ocorrência de LINA é freqüente em rebanhos leiteiros da região de Casa Branca, Estado de São Paulo, o que pode acarretar perdas significantes à indústria de laticínios e aos produtores devido ao descarte do leite..

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERSON, E. Small scale milk collection and processing an developing countries. E-mail conference. FAO 2000. Disponível em <http://www.fao.org/ag/aga/agap/lps/dairy/ecs/proc>. Acesso em: 12 fev. 2004.

[AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16 ed. Arlington, VA:AOAC, 1995.

BALBINOTTI, M.; MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF, W.; RECKZIEGEL, F. J.; CARBONARI, C.; VARELA, M. Incidência do leite instável não ácido (LINA) na região sul do Rio Grande do Sul. **Anais do XII Congresso de Iniciação Científica da UFPel**. Pelotas: Editora UFPel, 2003.

BARROS, L.; DENIS, N.; NÚÑEZ, A.; GONZÁLEZ, O. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, Montevideo, v. 9, p. 315 - 318, 1999.

_____; _____; _____; _____; GALAIN, C. Variaciones de la leche y prueba del alcohol. **XXI World Buiatrics Congress**, Punta del Leste, p. 577, 2001.

BOBE, G.; BEITZ, D.C.; FREEMAN, A.E.; LINDBERG, G.L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v. 46, p. 458-463, 1998.

CARVALHO, I. C. Modificações na composição do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 32, n. 192, p. 15-26, 1977.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIET, D **Proteínas Alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. 346p.

CONCEIÇÃO, R. C. S.; MARQUES, L. T.; GANDRA, E. A. Correlação entre as provas do álcool e da acidez titulável para amostras de leite com Síndrome do Leite Anormal (SILA). **Anais do XX Congresso de Iniciação Científica da UFPel**. Pelotas: Editora UFPel, 2001.

CREAMER, L. K.; PLOWMAN, J. E.; LIDDELL, M. J.; SMITH, M. H.; HILL, J. P. Micelle stability: κ -casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 3004-3012, 1998.

DAVIES, D.T.; WHITE, J.C. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: II-Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.25, p.256-267, 1958.

DONATELE, D.; VIEIRA, L.; FOLLY, M. 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, 2003.

FAIRBAIN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.53, p.139-177, 1986.

FARAH, Z.; ATKINS, D. Heat coagulation of camel milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.59, p.229 – 231, 1992.

FERNANDES, A. M. **Efeitos dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto.** (2007). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

FOX, P. F.; O’CONNOR, T. P.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, 1996.

_____; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry – Proteins part A**, 3.ed. Cork, Ireland: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003. 603p.

GACULA, J.R.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research.** Orlando: Academic Press, 1984.

GUO, M., WANG, Z., LI, J., KINDSTEDT, P. Ethanol stability of goat’s milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 57 – 60, 1998.

HARRIS Jr., B.; BACHAMAN, K. C. **Nutritional and management factors affecting solid-non-fat, acidity and freezing point of milk.** Gainesville, Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida Cooperative Extension Service, 1988.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, San Diego, v.35, p. 133 – 135, 1991.

_____; An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk, **European Biophysical Journal**, Heidelberg , v.33, p. 421–434, 2004.

HORNE, D.; PARKER, T. The pH sensitivity of ethanol stability of individual cow milks. **Netherlands Milk Dairy Journal**, Wageningen, v.34, p. 126 – 130, 1980.

_____; _____. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.48, p.273-284, 1981.

[IAL] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 1. 3. São Paulo: IAL, 1985.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. **European Journal Biochemistry**, v.237, p.106 – 112, 1996.

LANGONI, H. Tendências de modernização de setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista educação continuada do CRMV**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 57 – 64, 2000.

[LANARA] LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes, II – Métodos físicos e químicos**. Brasília, 1981.

LARANJA, L. F.; AMARO, F. Contagem de células somáticas: conceitos e estratégias de controle. **Revista Balde Branco**, São Paulo, v. 408, p. 28-34, 1998.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal (SP): Edição Funep, 2000.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, MA, 1980.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos**. Brasília, MA, 1981.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/index.htm> Acesso em: 24 out. 2005.

MARQUES, D. C. Criação de Bovinos. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003, 450p.

MARQUES, L. T. **Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. Pelotas**. 2004. Tese (Mestrado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, 2004.

MITAMURA, K. Studies on the alcohol coagulation of fresh cow milk. **Journal of Japanese Applied Biology Science**, Hokkaido, v.41, p. 102-114, 1937.

MOLINA, L. H.; GONZÁLEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PINTO, M. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia. v. 33, n. 2, p. 233 - 240, 2001.

NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; TAVERNA, M.; ROBERTS, L.; SPERANZA, J. Factores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol en leche cruda de calidad higiénica adecuada. **Informe técnico final del proyecto**. INTA EEA / Rafaela – INTI CITIL Rafaela, 2001.

O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; KELLY, A. L. Influence of ethanol on rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 73, p. 312-317, 2006.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 259-263, 2006.

PANICK, G.; MALESSA, R.; WINTER, R. Differences between the pressure and temperature-induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small angle X-ray scattering. **Biochemistry**, v.38, p. 6.512 – 6.519, 1999.

PECORARI, M.; FPSSA, E.; AVANZINI, G.; MARIAN, P. Milk with abnormal coagulation: acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. **Sci. Tec. Latt. Cas**. v.35, p.263-278, 1984.

PHILPOT, W. N. Milk quality and mastitis control. In: **Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**, Ribeirão Preto: IFC & Milkpoint, 2002.

PIERRE, A. Milk stability in ethanolic solutions. **Journal of Dairy Research**, Cambridge v. 56, p. 521 – 527, 1989.

PINNA, M. H.; LIZIEIRE, R. S. Leite de Qualidade. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 21, p. 47 – 51, 2000.

PONCE, P. **Síndrome do leite anormal e qualidade do leite**. In: 1º Curso on line sobre qualidade do leite do Instituto Fernando Costa. Disponível: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acesso: 21 nov. 2000.

_____; HERNANDEZ, R. **Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária**. In: GONZALEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (ed.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, p.61-72, 2001.

RIBAS, N. P. Programa de análise de rebanhos leiteiros. **Anais do 1º Simpósio Internacional sobre qualidade do leite**, Curitiba, p.58-67, 1998.

RIBEIRO, M. E. R.; KROLOW, A. C. R.; BARBOSA, R. S.; BORGES, C. D.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; HAUSEN, L. J. V. Ensaio preliminares sobre o efeito do leite instável não ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. Disponível: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p018.pdf>>. Acesso: 13 dez. 2007.

RODAS, A. C.; ISEPON, J. S.; ALVES, J. B.; ISEPON, O. J. Monitoramento na qualidade do leite “in natura” obtidos por diferentes tipos de manejo em Pereira Barreto (SP). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, p.19-29, 2000.

ROMA JÚNIOR, L. C.; ZAGO, C. A.; RODRIGUES, A. C. O.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. **Estudo da proteína do leite em termos de qualidade e quantidade**. Disponível: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p044.pdf>>. Acesso: 13 dez. 2007.

RUBEZ, J. **O leite nos últimos 10 anos**. Disponível: <http://www.leitebrasil.org.br/artigos/jrubez_93.htm>. Acesso: 15 nov. 2007.

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

SAS Institute. SAS[®] User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC., 1992.

SAWER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. **Biochem. Bioph. Acta**, v.1.482, p. 136 – 148, 2000.

SCARLATELLI, F. P. Leite ácido, Livro do produtor de leite. p. 97 – 98, 1999.

SCHMIDT, D.; KOOPS, J. Properties of artificial casein micelles. Stability toward ethanol, dialysis, pressure and heat in relation to casein composition. **Milk Dairy Journal**, v.31, p.342 – 357, 1977.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora – Livraria Varela, 1996.

_____. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.32, p. 105-126, 1998

_____. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, p. 43 – 56, 2005.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. (2003) Tese (Doutorado) em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras UFLA, 2003, 147 p.

SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, 1998.

SPREER, E. **Lactologia industrial**. 2^a ed. Zaragoza:Acribia, 1991. 617p.

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

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia 1995. 474p.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.9, p.189 – 192, 1999.

_____; JENNESS, R. Protein composition of milk. In: Dairy Chemistry and Physics; Walstra, P.; Jenness, R.: New York: Editora: Wiley, 1984.

_____; _____. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editora Acribia, 1987, 423p.

WONG, D. W. S.; CARMIRAND, W. M.; PAVLAT, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. **Crit. Ver. Food. Sci. Nutr.** v.36, p. 807 – 844, 1996.

YOSHIDA, S. Studies in the Uretch abnormality of milk in the Miyuki Dairy Farm. **Journal of Japanese Applied Biology Science**, Hokkaido, v.19, p.39-54, 1980.

ZADOW, J. Alcohol – mediated temperature induced reversible dissociation of the casein micelle in milk. **Australian Journal of Dairy Techonology**, Melbourne, v.48, p.78 – 81, 1993.

ZANELA, M. B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não ácido (LINA)**. 2004. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, 2004.

ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R. S.; MARQUES, L. T.; JUNIOR, W. S.; ZANELA, C. Leite instável não ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1 – 11, Brasília,2006.