

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR OESTE – UDESC OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO**

**SHAEEN INAÊ DA LUZ KUNZ**

**EFEITOS DO CÁLCIO IÔNICO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE E  
UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA PARA  
SUA DETERMINAÇÃO**

**CHAPECÓ**

**2023**

**SHAEEN INAÊ DA LUZ KUNZ**

**EFEITOS DO CÁLCIO IÔNICO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE E  
UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA PARA  
SUA DETERMINAÇÃO**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Zootecnia.  
Orientador: Profa. Dra. Ana Luiza Bachmann Schogor  
Coorientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira

**CHAPECÓ  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Universitária Udesc,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Kunz, Shaeen Inaê da Luz

Efeitos do cálcio iônico na estabilidade térmica do leite e utilização da espectroscopia de bioimpedância elétrica para sua determinação / Shaeen Inaê da Luz Kunz. -- 2023.  
66 p.

Orientadora: Ana Luiza Bachmann Schogor

Coorientador: Rogério Ferreira

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2023.

1. Acurácia. 2. Especificidade. 3. Estabilidade. 4. Leite estável não ácido. 5. Sensibilidade. I. Schogor, Ana Luiza Bachmann . II. Ferreira, Rogério . III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**SHAEEN INAÊ DA LUZ KUNZ**

**EFEITOS DO CÁLCIO IÔNICO NA ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE E  
UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA PARA  
SUA DETERMINAÇÃO**

Dissertação de mestrado, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Zootecnia.

**BANCA EXAMINADORA**

Ana Luiza Bachmann Schogor, Dra.

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Oeste

Membros:

Elisandra Rigo, Dra.

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Oeste

Denize da Rosa Fraga, Dra.

Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUÍ

Chapecó, 27 de julho de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a minha família, Adélio, Rosane, Sheron e Helivelton por me apoiarem e sempre estarem ao meu lado ao longo deste percurso. Em meio a dificuldades, distância mas com muito carinho de vocês finalizo mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço aos meus amigos de Tiradentes, Chapecó e Palmas pela oportunidade de dividir um pouco da minha história com vocês. De certa forma contribuíram para a minha formação, sozinhos não somos ninguém.

Agradeço imensamente a minha orientadora Profa Dra. Ana Luiza Bachmann Schogor que não mediu esforços para me auxiliar e mesmo em momentos difíceis foi profissional e muito humana. Agradeço ao coorientador Prof Dr. Rogério Ferreira pela dedicação com os dados e auxílios prestados.

Por fim agradeço ao nosso grupo de pesquisa em qualidade do leite e a todos que auxiliaram no decorrer do projeto. A Bionexus tecnologia Ltda. e a Indústria e Comércio de Laticínios Oliveira pela abertura e confiança depositada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. À FAPESC pelo auxílio financeiro (Edital N. 30/22, TR 2030), e à UDESC pela bolsa PROMOP.

Meu muito obrigada!

## RESUMO

O cálcio iônico ( $Ca_i$ ) é uma das principais variáveis que influenciam a estabilidade térmica do leite. Ele desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura das micelas de caseína, estabilizando-as e evitando sua agregação durante o processamento térmico. O teste do álcool tem sido amplamente utilizado para avaliar a estabilidade térmica do leite, mas possui limitações em termos de precisão, acurácia e falta de informações detalhadas sobre os mecanismos subjacentes à estabilidade. Os objetivos do presente estudo foram analisar a variação do  $Ca_i$  em amostras de tanques de refrigeração de leite bovino, e, por meio da sensibilidade, especificidade e acurácia, verificar a aplicabilidade da espectroscopia de impedância elétrica (EIE) para determinação da estabilidade térmica do leite em comparação ao teste padrão do álcool. Foram analisadas 379 amostras de leite para entender a relação entre o teor de  $Ca_i$ , estabilidade ao álcool, acidez titulável, pH e densidade. Os resultados mostraram que a estabilidade ao álcool e o teor de  $Ca_i$  do leite variam de acordo com os meses e estão associados a um período de transição entre estações do ano. Leites mais instáveis apresentaram maior teor de  $Ca_i$  ( $P < 0,01$ ,  $R^2: 0,02$ ), especialmente leites ácidos. Não foram encontradas diferenças significativas no teor de  $Ca_i$  entre leites classificados como leite instável não ácido (LINA) e leites normais (estáveis). Foi observada uma faixa de variação nos teores de cálcio iônico dentro de cada classificação e dentro das graduações alcoólicas. Quanto a EIE, 1657 amostras foram analisadas em espectrômetro comercial, com sonda híbrida, configurado para explorar 29 frequências, além das análises complementares de estabilidade ao álcool, acidez titulável, pH e densidade. Para geração de modelos preditivos, as amostras foram alocadas, de forma equilibrada de acordo com a estabilidade ao álcool, em três bancos de dados denominados banco de treino, validação e teste. Após construção de algoritmos baseados em árvore de decisão, as amostras do banco teste, que não foram utilizadas para a construção do modelo, foram submetidas à predição pelos modelos gerados. Os modelos preditivos utilizaram somente as variáveis de impedância elétrica e o pH como variáveis preditoras. Para este trabalho, foi definida a sensibilidade como a capacidade de detectar as amostras positivas, ou seja, estáveis a uma determinada graduação alcoólica; e a especificidade a capacidade de detectar amostras não estáveis. Os resultados obtidos com a EIE demonstraram uma acurácia a partir de 84% para graduação de 74% (v/v), chegando a 98% para

graduação de 82%. O LINA foi identificado pela EIE e apresentou boa especificidade. Os resultados positivos encontrados nas nossas condições experimentais indicam que esta metodologia tem potencial para classificar amostras como LINA, um atual problema para a indústria leiteira e produtor rural. Assim, este método rápido, não destrutivo e com potencial de se tornar uma tecnologia embarcada, pode trazer avanços significativos na avaliação da estabilidade térmica do leite, beneficiando a indústria e os produtores.

Palavras-Chave: Acurácia; Especificidade; Estabilidade; Leite estável não ácido; Sensibilidade.

## ABSTRACT

The present study aimed to investigate the variation of ionic calcium ( $Ca_i$ ) content in samples of bovine milk stored in refrigeration bulk tanks and assess the applicability of electrical impedance spectroscopy (EIS) as a method to determine the thermal stability of milk compared to the standard alcohol test. A total of 379 milk samples were analyzed for  $Ca_i$  content, alcohol stability, titratable acidity, pH, and density. The results revealed that the alcohol stability and  $Ca_i$  content of milk varied depending on the months and were associated with a transition period between seasons. It was observed that more unstable milks presented a higher  $Ca_i$  content, particularly those with higher acidity levels ( $P < 0.01$ ,  $R^2: 0.02$ ). However, no significant differences in  $Ca_i$  content were found between non-acid unstable milk (UNAM) and normal (stable) milks. It was also noted that there was a range of variation in the  $Ca_i$  content within each classification and within different alcoholic graduations. In parallel, EIS was conducted on 1657 milk samples using a commercial spectrometer with a hybrid probe. The spectrometer was configured to explore 29 frequencies, and additional analyses of alcohol stability, titratable acidity, pH, and density were performed. The samples were divided into three databases called the training, validation, and test databases to generate predictive models based on decision tree algorithms. The predictive models utilized electrical impedance and pH as predictor variables. The results obtained from EIS showed an accuracy of 84% for a graduation of 74% (v/v) alcohol stability, increasing to 98% for a graduation of 82% (v/v). EIS demonstrated good specificity in identifying non-acid unstable milk (UNAM). These positive results indicate that EIS has the potential to classify samples as UNAM, which is a significant challenge in the dairy industry and for rural producers. In conclusion, the study suggests that electrical impedance spectroscopy (EIS) can be a fast and non-destructive method for evaluating the thermal stability of milk. It has the potential to provide detailed information about milk stability and classify samples as non-acid unstable milk (UNAM). If further developed, EIS could become an embedded technology with significant benefits for the dairy industry and producers.

Keywords: Accuracy; non-acid unstable milk ,Sensitivity; Specificity; Stability

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema com as características das micelas de caseína.....	16
Figura 2 - Esquema de organização micelar estável (A) e instável (B) das micelas e submicelas de leite bovino. ....	19
Figura 3 - Efeitos da adição de cálcio no pH e cálcio iônico.....	21
Figura 4 - Análise da estabilidade ao álcool, em amostra de leite bovino coletadas de tanque de resfriamento A) Leite estável; B) Leite instável.....	24
Figura 5 - Respostas analíticas ao teste de álcool/alizarol em leite bovino com diferentes valores de pH. ....	25
Figura 6 - Frequência de aspectos físico-químicos de 379 amostras de leite de tanque analisadas entre os meses de agosto a novembro.....	34
Figura 7 - Distribuição mensal e geral do resultado das análises de estabilidade ao álcool dos leites de tanque. As barras demonstram as graduações até as quais os leites foram estáveis no teste do álcool.....	35
Figura 8 - A) Frequência de amostras estáveis $\geq 76\%$ (v/v) de acordo com os meses avaliados. B) Teor de Cai de acordo com os meses avaliados. ....	36
Figura 9 - Probabilidade de estabilidade ao álcool em diferentes graduações alcoólicas (72 a 82) determinada por modelo preditivo de árvore de decisão impulsionada utilizando as variáveis de bioimpedância elétrica e o pH como variáveis preditoras.	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização das caseínas.....	17
Tabela 2 - Precisão diagnóstica de amostras de leite de tanque submetidas ao EIE e teste padrão do álcool .....	48
Tabela 3 - Precisão diagnóstica de amostras de leite de tanque submetidas ao EIE e teste padrão do álcool, por classificação.....	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 ESTRUTURA E ESTABILIDADE DAS MICELAS DE CASEÍNA.....	15
2.2 CÁLCIO (IONIZADO E NÃO-IONIZADO) E A ESTABILIDADE .....	18
2.3 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DO CÁLCIO IÔNICO .....	20
2.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE .....	22
2.5 METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE .....	23
2.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA (EIE) .....	26
<b>3. ARTIGO 1: Variação natural do cálcio iônico e efeitos na estabilidade do leite bovino ao teste do álcool</b> .....	28
3.1 INTRODUÇÃO .....	28
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
<b>3.2.1 Amostras de leite</b> .....	29
<b>3.2.2 Análise da estabilidade ao álcool</b> .....	30
<b>3.2.3 Análise de acidez titulável, pH e densidade</b> .....	30
<b>3.2.4 Análise de Cálcio Iônico (Ca<sub>i</sub>)</b> .....	31
<b>3.2.5 Classificação do leite</b> .....	31
<b>3.2.6 Análise de dados</b> .....	31
3.3 RESULTADOS .....	32
3.4 DISCUSSÃO .....	37
3.5 CONCLUSÃO .....	42
<b>4. ARTIGO 2: Espectroscopia de impedância elétrica como método alternativo ao teste do alizarol para avaliação de estabilidade térmica do leite</b> .....	43
4.1 INTRODUÇÃO .....	43
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
<b>4.2.1 Análise estatística</b> .....	46
4.3 RESULTADOS .....	47
4.4 DISCUSSÃO .....	51
4.5 CONCLUSÃO .....	54
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>ANEXO A – RESUMO GRÁFICO DO ARTIGO 1</b> .....	64

<b>ANEXO B – RESUMO GRÁFICO ARTIGO 2 .....</b>	<b>65</b>
--	-----------

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um grande avanço na pecuária leiteira brasileira, amparada pelas instruções normativas (IN 76 e 77 de 2018). Todavia, não é incomum observar descumprimento das exigências mínimas de composição e higiene. Esse descumprimento gera prejuízos ao produtor e indústria, haja vista que a maior parte das situações observadas lavam a penalizações, recusa e descarte do leite. A fim de evitar estas situações é que a indústria realiza análises à campo e laboratoriais. Estas análises são dadas em químicas, físicas e biológicas e dizem respeito a segurança da matéria prima.

Dentre as análises físicas está a estabilidade térmica do leite, que consiste na identificação do leite impróprio para a indústria, a partir da observação de alterações nas ligações entre micelas de caseína, principais proteínas do leite, que conferem rendimento para a produção de subprodutos e leite *in natura*, realizada por meio do teste do álcool/alizarol. Ainda, embora respaldado pela legislação vigente, o teste do álcool/alizarol realizado em nível de propriedade leiteira, antes da coleta do leite, pode resultar em perdas ao produtor, devido a falhas implícitas ao método de análise que é subjetivo, variável de acordo com os critérios da indústria, e não acurado.

Uma das falhas diz respeito a dificuldade de diferenciar a estabilidade causada por acidificação, devido a elevada contagem bacteriana, da instabilidade ocasionada por um desequilíbrio no sistema de produção, o denominado Leite Instável não Acido (LINA). Os dados estimados por MAGRI (2015) mostraram que 30% das perdas apontadas como leite ácido foram erroneamente classificadas, uma vez que o teste padrão (álcool/alizarol) não distinguiu o leite verdadeiramente ácido do LINA (falso positivo).

Não obstante, a legislação preconiza que a graduação alcoólica mínima seja de 72% (v/v). Todavia, não é incomum que laticínios utilizem graduações mais elevadas para teoricamente, selecionar leite de melhor qualidade e estabilidade térmica. No entanto, com o aumento da graduação alcoólica há maior prevalência de LINA (SILVA *et al.*, 2012) e não há correlação entre o aumento da graduação alcoólica e o aumento da resistência térmica (MOLINA *et al.*, 2001).

Além disso, estudos anteriores demonstraram que o LINA é estável ao tratamento térmico, o que significa que não precisa ser rejeitado pela indústria (Molina *et al.* (2001) estabilidade alcoólica não depende exclusivamente do pH, e os fatores

que causam a instabilidade das caseínas nem sempre são os mesmos que causam a acidificação.

Um fator importante a ser considerado na estabilidade térmica do leite é o teor de cálcio iônico. O cálcio desempenha um papel crucial na formação e na estabilização das micelas de caseína, influenciando sua capacidade de resistir a alterações durante o processamento térmico. Variações no teor de cálcio iônico podem afetar a estabilidade do leite, levando a problemas como a formação de grumos ou a separação de fases.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi Investigar os efeitos da variação natural do cálcio iônico na estabilidade térmica do leite e presença do leite instável não ácido (LINA). E, avaliar a aplicabilidade da espectroscopia de impedância elétrica como um método alternativo para determinar a estabilidade térmica do leite.

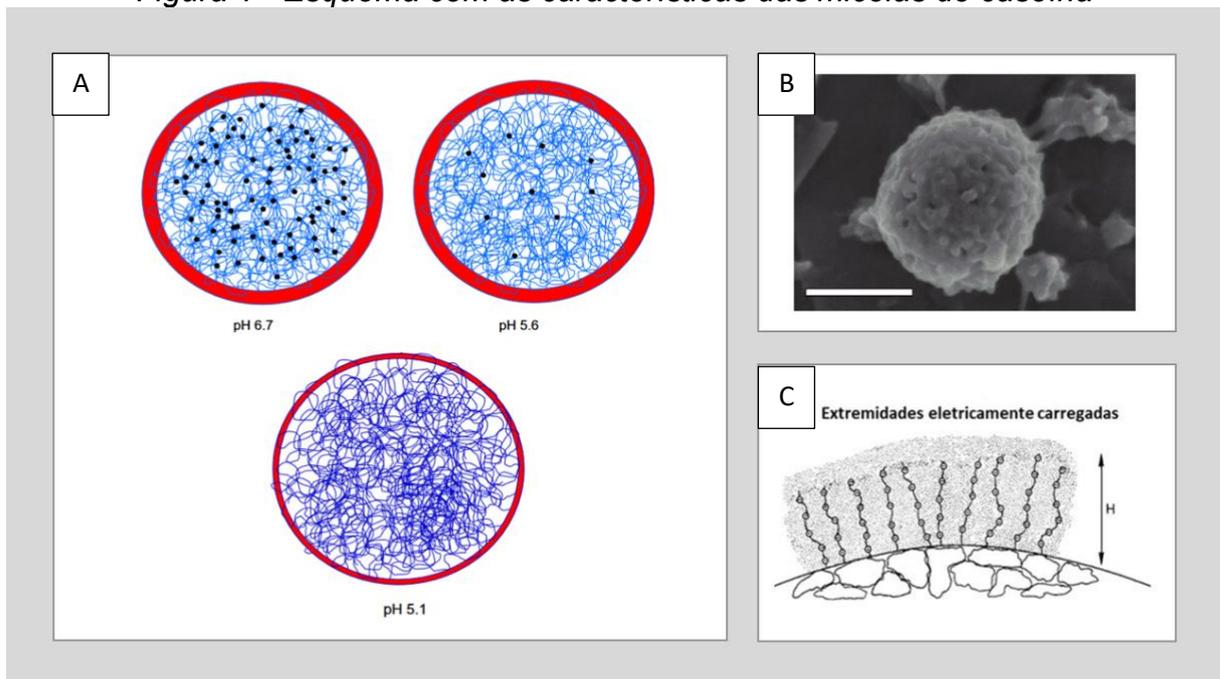
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESTRUTURA E ESTABILIDADE DAS MICELAS DE CASEÍNA

As caseínas são fosfoproteínas que representam 75-80% das proteínas do leite (MCMAHON e OOMMEN, 2013), e se diferem das proteínas do soro por conta da alta concentração do aminoácido prolina, alta carga elétrica, por ser hidrofóbicas (MCMAHON e OOMMEN, 2013; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2005) e se agrupam por meio de ligações de íons fosfato de cálcio, formando micelas (CHANDAN *et al.*, 2015).

As caseínas são divididas em quatro principais moléculas, com diferentes aminoácidos na composição. A alfa-s1 ( $\alpha$ s1-CN), ( $\alpha$ s2-CN) e beta ( $\beta$ -CN), compõem o centro da micela e são sensíveis ao cálcio (Cai), contudo o tamanho e estabilidade da micela é determinada pela kappa ( $\kappa$ -CN), glicoproteína estável na presença de íons de cálcio e encontrada na superfície da micela (MCMAHON e OOMMEN, 2013). Além disso, as ligações entre as caseínas e os íons de cálcio são altamente fortes, principalmente em pH mais alto (Figura 1A) (WALSTRA *et al.*, 2005). Nas Figuras 1B e 1C, podem ser observadas uma microscopia eletrônica de varredura de micelas de caseína e a representação das extremidades eletricamente carregadas de  $\kappa$ -CN, respectivamente.

Figura 1 - Esquema com as características das micelas de caseína



A) Demonstração de uma estrutura de micela de caseína em vários valores de pH, conforme indicado. As cadeias as linhas azuis indicam moléculas de proteína, onde elas se cruzam são as junções de interação hidrofóbica. Os pequenos círculos pretos são os fosfatos de cálcio que são solubilizados em pH baixo. O círculo externo é indicativo da faixa de repulsão eletrostática gerada pelas micelas, impedindo a interação das cadeias proteicas da superfície (HORNE, 2020) B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de micelas de caseína em pH 7,0. A barra de escala corresponde a 200 nm. (DALGLEISH *et al.*, 2004). C) Representação das extremidades eletricamente carregadas de  $\kappa$ -caseínas ("salted brush"), com comprimento representado pela letra (H) (KRUIF e HOLT, 2003)

Essa afinidade à cátions bivalentes como o cálcio, mas também o magnésio é explicado pela fosforilação das  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseínas, que ocorre principalmente nos resíduos seril e treonil (HORNE, 2009; SILVA *et al.*, 2019). Como regra geral, quanto mais fosforilada for uma molécula de caseína, maior será sua capacidade de se ligar ao cálcio (DALGLEISH, 2011). Uma das vantagens das  $\kappa$ -caseínas é que a sua solubilidade não depende da presença de cálcio, devido ao fato de sofrerem glicolisação e não fosforilação (Tabela 1) (SWAISGOOD, 2003). Esse processo torna a moléculas de  $\kappa$ -caseína mais estáveis e com menor precipitação.

As micelas formadas pelas moléculas de caseína apresentam conformação esférica, de diâmetro que varia entre 20 e 300 nm, constituídas por 20 a 150 mil moléculas de caseína e organizadas em pequenos agregados, denominados de submicelas (Figura 1B). As submicelas possuem diâmetro de 10-20 nm, contendo de 10-100 moléculas de caseína e massa de 0,25 - 2,0 x 10<sup>6</sup> D (WALSTRA *et al.*, 2005). Dessa forma, quanto maior o diâmetro da micela, menor é a resistência ao

aquecimento, devido ao menor conteúdo de  $\kappa$ -caseína, o que as torna mais susceptíveis ao  $Ca_i$  (O'CONNELL e FOX, 2000).

*Tabela 1 - Caracterização de caseínas com base na massa molecular, números de aminoácidos, resíduos prolina e cisteína, grupos  $PO_4$  e presença de glicoproteínas.*

<b>Características</b>	<b><math>\alpha_{S1}</math>-CN</b>	<b><math>\alpha_{S2}</math>-CN</b>	<b><math>\beta</math>-CN</b>	<b>K-CN</b>
<b>Massa molecular</b>	23,164	25,388	23,983	19,038
<b>Aminoácidos</b>	199	207	209	169
<b>Resíduo Prolina</b>	17	10	35	20
<b>Resíduo Cisteína</b>	0	2	0	2
<b><math>PO_4</math> Grupos</b>	8	10-13	5	1
<b>Concentração (g/l)</b>	10	2,6	9,3	10,3
<b>Glicoproteínas</b>	Não	Não	Não	Sim

Fonte: Adaptado de Krishna *et al.* (2021)

No geral, as caseínas possuem conformação aberta e flexível e são apresentadas como proteínas reomórficas, ou seja, dependendo do ambiente em que são submetidas, adotam conformação específicas, principalmente em exposição a temperaturas (HOLT e SAWYER, 1993).

A estabilidade da caseína está associada à uma camada externa difusa, composta pela extremidade N-terminal das  $\kappa$ -caseínas, denominada extremidades eletricamente carregadas (“salted brush”) (Figura 1C), com carga negativa (HOLT e DALGLEISH, 1986). As *salted brush* apresentam valores de aproximadamente -20 mV na fase contínua do leite (DALGLEISH, 2011; DARLING e DICKSON, 1979) no entanto não suficientes para prevenir a agregação entre micelas (WALSTRA, 2002).

A adição de álcool ao leite promove a desestabilização das micelas de caseína por meio de dois principais mecanismos: desnaturação das proteínas e redução da força eletrostática de repulsão. A desnaturação das proteínas ocorre devido à interação do álcool com as moléculas de caseína, que resulta na desestruturação das micelas. O álcool tem a capacidade de interagir com as regiões hidrofóbicas das proteínas, causando a exposição de resíduos hidrofílicos e promovendo a agregação das micelas. Além disso, o álcool interfere na força eletrostática de repulsão entre as micelas de caseína. As micelas são mantidas afastadas umas das outras pela repulsão eletrostática entre as cargas negativas das proteínas. A adição de álcool reduz a polaridade do meio, diminuindo a repulsão entre as micelas e permitindo sua agregação (HORNE, 2016).

Esses mecanismos de desestabilização causados pela adição de álcool são observados no teste do álcool e teste do alizarol como uma forma rápida e simples de avaliar a estabilidade do leite. No entanto, é importante ressaltar que esse teste tem suas limitações e não fornece uma avaliação completa da estabilidade térmica do leite, especialmente em relação a outras fontes de desestabilização naturais. Além disso, outros componentes como o pH interferem na estabilidade. A variação do pH afeta as cargas elétricas das proteínas, interferindo na força eletrostática de repulsão entre as micelas e, conseqüentemente, na estabilidade do sistema. Em condições de pH ácido, as cargas negativas das caseínas são neutralizadas, reduzindo a repulsão eletrostática entre as micelas. Isso facilita a agregação das micelas e a formação de coágulos, levando à instabilidade do leite. Por outro lado, em pH alcalino, as cargas negativas são intensificadas, aumentando a repulsão eletrostática e mantendo as micelas afastadas, o que contribui para a estabilidade do leite (HORNE e MUIR, 1990; HORNE, 2016).

A variação do pH também pode afetar a estrutura e a solubilidade das proteínas de caseína. Em pH ácido, ocorre a desnaturação das proteínas, levando à exposição de resíduos hidrofílicos e à formação de agregados proteicos. Essa desnaturação pode ser reversível ou irreversível, dependendo da intensidade e duração da exposição ao pH ácido (HUPPERTZ, 2016). É importante ressaltar que o pH do leite é influenciado por diversos fatores, como a produção de ácido láctico por bactérias lácticas, a fermentação natural do leite, a presença de contaminantes microbianos, entre outros (TRONCO, 2010). Portanto, o controle do pH durante a produção e o armazenamento do leite é essencial para garantir sua estabilidade (SINAGA *et al.*, 2017).

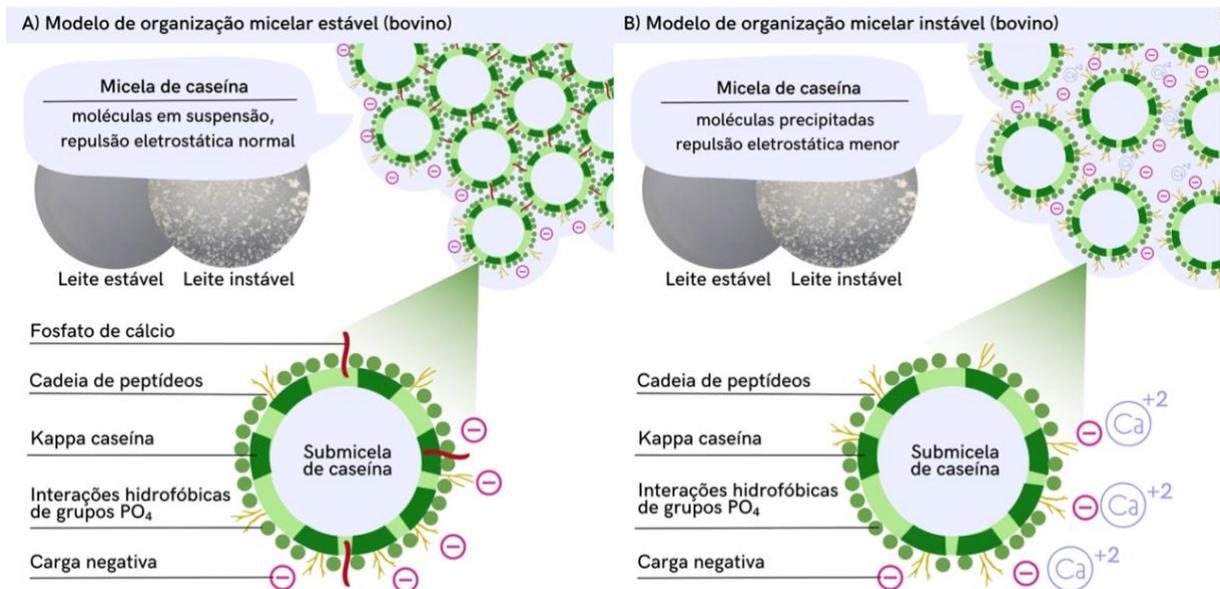
## 2.2 CALCIO (IONIZADO E NÃO-IONIZADO) E A ESTABILIDADE

O cálcio é um mineral essencial para diversas funções biológicas do organismo e desempenha um papel importante na estabilidade da micela de caseína. No leite sua distribuição ocorre em três fases. Na fase coloidal (70%), associado ao fósforo formando o fosfato de cálcio nas micelas de caseínas; na fase solúvel (20%) com formação de sais de cálcio, e; por último a fase iônica  $Ca_i$  (10%), composta por íons

de cálcio livre (LIN; LEWIS; GRANDISON, 2006). As três frações, associadas a outros minerais se mantêm em um equilíbrio dinâmico, entre si em solução, entre solução e fosfato coloidal, e entre solução e proteínas, principalmente a caseína (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2005). Mudanças das condições externas do leite ocasionam alterações neste equilíbrio, devido ao cálcio iônico desempenhar papel importante na estabilização, capacidade de coagulação, estabilidade ao calor, propriedades de superfície e reológicas das proteínas do leite (DE LA FUENTE *et al.*, 2004)

No estudo de AKKERMAN *et al.* (2019), a fase iônica do cálcio foi correlacionada positivamente com o cálcio sérico (0,64) e negativamente com a estabilidade do leite (-0,69). Neste mesmo estudo foi observado que os animais alimentados com pastagem tiveram maior nível de cálcio iônico, resultados de acordo com SUNDEKILDE *et al.* (2011) em que um maior nível de cálcio iônico presente no leite, reduziu a carga negativa das micelas de caseína, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre elas, causando sua precipitação.

**Figura 2 - Esquema de organização micelar estável (A) e instável (B) das micelas e submicelas de leite bovino.**



- A) Modelo de organização micelar estável. Micela de caseína em suspensão coloidal e repulsão eletrostática normal. Submicela de caseína contendo as pontes de fosfato de cálcio. Leite sem formação de precipitados de caseína. B) Modelo de organização micelar instável. Micela de caseína precipitada e repulsão eletrostática menor. Submicela de caseína com ausência das pontes de fosfato de cálcio. Cálcio iônico (Ca<sup>+2</sup>), como fonte fator desestabilizante. Leite com formação de precipitados de caseína. Fonte: Elaborado pela autora.

O cálcio iônico também é afetado pelo pH do leite (Figura 3), seja ele por acidificação ou adição de algum composto como cloreto de cálcio. A forte ligação entre ambos, possibilita que uma diminuição no pH do leite gere um aumento expressivo no cálcio iônico e diminuição na estabilidade, gerando sedimentos, pós-tratamento térmico (LEWIS, 2011). Alguns fatores relacionados a dieta durante a lactação foram identificados como causadores da queda do pH, como a adição de sais aniônicos em dietas de vacas pré-parto (MARQUES *et al.*, 2011), ou animais em acidose metabólica induzida por acidose ruminal (HERNANDEZ; PONCE, 2005).

Quando há uma quantidade insuficiente de cálcio iônico, as micelas de caseína não conseguem formar complexos estáveis e as forças de repulsão entre elas prevalecem. Isso resulta em uma maior tendência de agregação das micelas e formação de coágulos no leite, levando à instabilidade (RADFORD *et al.*, 2004). Essa situação pode ocorrer em casos de deficiência de cálcio na alimentação das vacas leiteiras ou em situações em que o cálcio é sequestrado por outros compostos presentes no leite, como ácido cítrico ou ácido fosfórico.

Por outro lado, em níveis excessivos de cálcio iônico, ocorre a dissolução do fosfato de cálcio coloidal e a caseína perde sua carga eletrostática, e em consequência aglomera (WU *et al.*, 2018). Essa situação pode ocorrer em leites com alto teor de cálcio iônico, como no caso de leite proveniente de tanques de resfriamento que não passaram pelo processo de padronização.

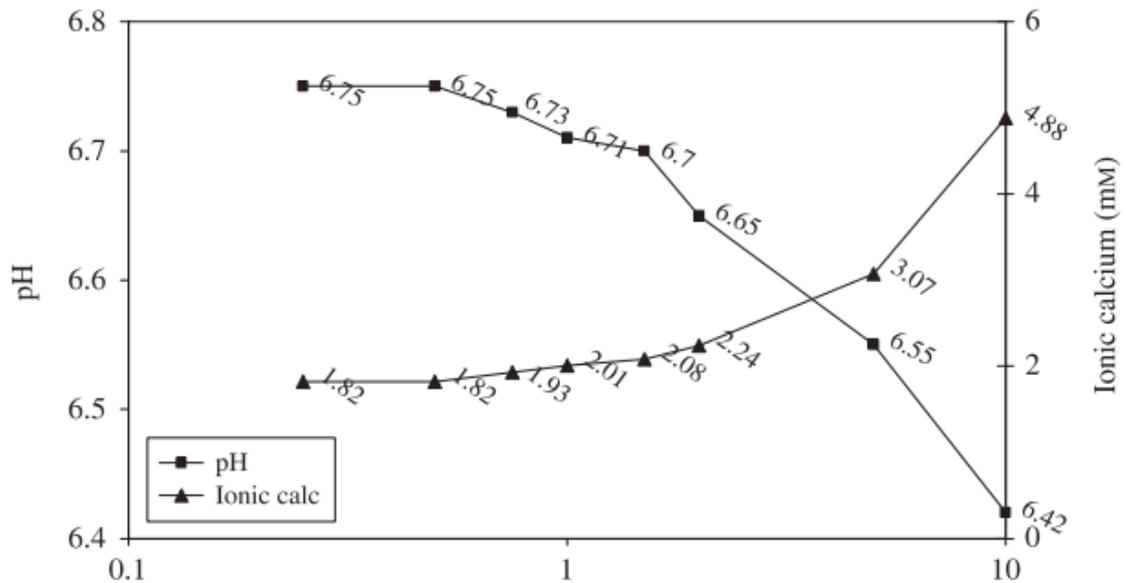
### 2.3 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DO CÁLCIO IÔNICO

A determinação do cálcio iônico se torna uma medida essencial para compreender os mecanismos de instabilidade do leite. No entanto, para que seja determinado de forma correta, alguns fatores relacionados a coleta, armazenamento e análise devem ser considerados, pois, quaisquer alterações no leite podem levar a um desequilíbrio entre o fosfato de cálcio insolúvel e o  $Ca_i$  (LEWIS, 2011).

Estudos de WALSTRA *et al.* (2005) demonstraram haver um aumento do cálcio iônico após a ordenha, isso porque o leite cru é rapidamente resfriado, e presumidamente, e este processo tende a aumentar o  $Ca_i$  devido a alterações na

solubilidade e associação de sais, principalmente pela diminuição da quantidade de fosfato de cálcio micelar.

Figura 3 - Efeitos da adição de cálcio no pH e cálcio iônico



Fonte: Lewis (2011)

No transporte e armazenamento, pH tende a diminuir, principalmente devido à atividade microbiana, processo este que leva um aumento no teor de  $Ca_i$  (LEWIS, 2011). Nos estudos de Barbosa *et al.* (2009), amostras de leite foram armazenadas de três formas: frasco plástico com tampa de rosca sem vácuo, com leite suficiente para todos os horários de dosagem (SVU); a segunda forma foi em nove frascos plásticos com tampa de rosca sem vácuo, com leite suficiente para apenas uma dosagem (SVI) e, por último; em nove tubos vacuolizado (CV). Todas as formas de armazenamento foram correlacionadas com nove momentos de análise após a ordenha (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 horas). As análises indicaram que houve efeitos nas amostras de acordo com o método de armazenamento e horário de análise. Em ambos os métodos que expuseram a amostra ao ar, tiveram aumento no teor de cálcio iônico, pela alteração das cargas das moléculas, nos diferentes horários de análise pós ordenha. No entanto a utilização do método de amostra única, pode ser considerado uma ferramenta, quando o leite for imediatamente analisado. Quando não há possibilidade de análise imediata, a utilização de tubos de vácuo se torna a ferramenta de melhor eficiência (BARBOSA *et al.*, 2009).

As metodologias de análise também surtem efeito no teor de cálcio iônico do leite. Inicialmente as análises eram realizadas por meio do método “Resinas de troca iônica” de (CHRISTIANNON; JENNESS; COULTER, 1954). O princípio era baseado no equilíbrio do leite com uma resina de troca iônica, mensurando a quantidade de cálcio ligado. Nesta metodologia era possível encontrar teores de  $Ca_i$  entre 2,0 e 2,3 mM (aproximadamente 80 a 90 mg/L) para o leite de bovinos.

A segunda metodologia utilizada foi a de “Reagente complexante murexídeo”. Esta metodologia é baseada na utilização de um sal de ácido purpúrico, complexante, no permeado de leite. Em bovinos, utilizando este método foram encontrados teores de  $Ca_i$  entre 2,5 e 3,4 mM (aproximadamente 100 a 136mg/L) (ROSE; TESSIER, 1959). No entanto, este método superestima consideravelmente o  $Ca_i$  no leite (LEWIS, 2011).

O terceiro método, atualmente o mais utilizado é por meio de Eletrodos seletivos de íons, que medem a atividade da função termodinâmica. De acordo com a equação de Nernst, existe uma relação linear entre a saída elétrica (mV) do eletrodo e o registro da atividade. Nesta análise os resultados são obtidos e representados como atividade ou concentração. Para soluções diluídas, concentração e atividade são as mesmas, mas em soluções concentradas os valores podem divergir (LEWIS, 2011). Nesta análise, Martins (2022) encontrou valor médio de 111,81mg/L de  $Ca_i$  em amostra de leite do estado do Paraná; Barbosa *et al.* (2009) 102,23mg/L no Rio Grande do Sul, Nian *et al.* 62,24mg/L no Reino Unido e Chavez *et al.* (2003) 81,2 a 92,2mg/L na Argentina.

## 2.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE

A estabilidade térmica do leite pode ser definida como a capacidade da caseína de permanecer em suspensão coloidal e da lactalbumina permanecer em solução quando o leite é submetido ao calor ou outras fontes modificadoras. Isso ocorre, pois, a dispersão de proteína permanece estável em virtude da hidratação e carga elétrica negativa, ou seja, o potencial eletrocinético ( $\zeta$ , zeta), das micelas. Uma alteração, seja na hidratação ou carga elétrica, faz com que as micelas se agreguem e, eventualmente, apareçam como proteína coagulada (WHITE e DAVIES, 1958).

Naturalmente, as micelas de caseína são moléculas altamente estáveis, (MCMAHON e OOMMEN, 2013). No entanto, algumas alterações ocasionam dois tipos de instabilidade mais observado a campo. A primeira diz respeito à instabilidade devida à alta contagem bacteriana, que induz a formação de ácidos orgânicos diminuindo o pH do leite (OLIVEIRA; TIMM, 2007); e a segunda, a um efeito multifatorial que leva a instabilidade, sem que haja alteração na acidez, denominado Leite Instável Não Ácido (LINA) (MARQUES *et al.*, 2007).

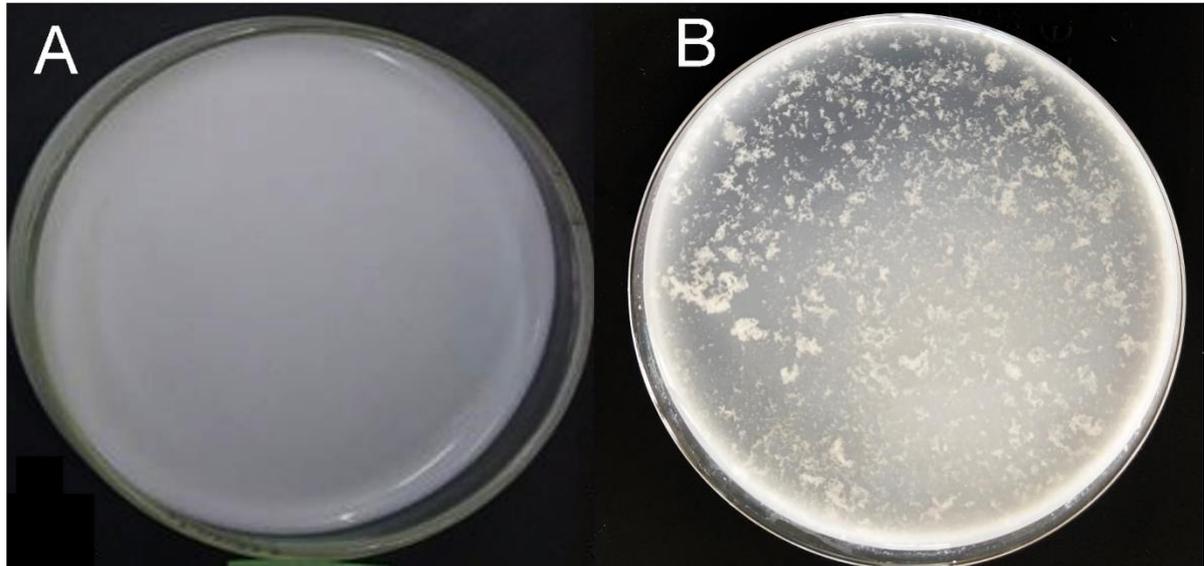
O LINA foi identificado como uma alteração na qualidade do leite, resultante de um desequilíbrio no sistema de produção, ocasionada pela instabilidade da molécula de caseína ao teste de álcool, sem acidez elevada (ZANELA *et al.*, 2009). Este desequilíbrio é um fenômeno complexo que ocorre por fatores como o genético (espécie, raça, genética), fator intrínseco do animal (idade ou número de lactações, estágio de lactação), fatores nutricionais (alimentação, forma de conservação, ajuste da dieta às exigências do animal), fatores ambientais (estresse, estação do ano, manejo), e por fatores extrínsecos ao animal (sanidade animal, contaminação bacteriana) (FISCHER *et al.*, 2012).

## 2.5 METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE

A identificação da instabilidade é realizada pela avaliação da temoestabilidade do leite cru, por meio da prova do etanol. Este teste é baseado na desidratação da molécula de caseína, simulando o aquecimento (MOLINA *et al.*, 2001) e está descrito a mais de 65 anos por WHITE e DAVIES (1958).

O método pode ser empregado utilizando, 2ml de leite e 2 ml de etanol nas concentrações alcoólicas variando de 68 a 82% (v/v) em placa de Petri. Pela legislação vigente, a saber as Instruções Normativas 76 e 77 de 2018 (Brasil 2018<sup>a</sup>; Brasil, 2018b) , caso haja precipitação no volume de 72% v/v e acidez titulável menor que 18°D, o leite é caracterizado como LINA (ZANELA e RIBEIRO 2018), pois este não se encontra ácido. Por outro lado, leites com acidez titulável acima de 18°D são considerados ácidos, não aptos para a indústria e conseqüentemente impróprio para o consumo.

*Figura 4 - Análise da estabilidade ao álcool, em amostra de leite bovino coletadas de tanque de resfriamento A) Leite estável; B) Leite instável*



Fonte: Elaborado pela autora

No entanto, este método descrito acima não é empregado a campo, pois exigem material e soluções específicas, que inviabilizam o transporte junto aos responsáveis pela coleta do leite. Dessa forma, um método denominado “Teste do Álcool/Alizarol” é aplicado obrigatoriamente antes da captação do leite pelo caminhão e plataforma da indústria (Brasil, 2018A). Esse método baseia-se na mistura de volumes iguais de solução de álcool etílico (com graduação alcoólica a partir de 72 v/v, associado ao um indicador de pH, denominado alizarina) e leite cru de tanques de expansão.

Quando submetido a esta análise o leite deve se manter em solução e com coloração vermelho tijolo; no entanto é comum observar alterações na coloração e consistência, como formação de aglomerados sugestivos de alteração na composição e estabilidade térmica do leite (Figura 5).

*Figura 5 - Respostas analíticas ao teste de álcool/alizarol em leite bovino com diferentes valores de pH.*



Fonte: Santos *et al.* (2013)

A presença do LINA foi detectada em diversas regiões do Brasil. No Rio Grande do Sul, pesquisas revelaram a presença de LINA em 44,1% das amostras analisadas (MARQUES *et al.*, 2007) e em 55,2% (ZANELA *et al.*, 2009). Em São Paulo, o índice foi de 64,8% (OLIVEIRA *et al.*, 2011); no Paraná, 42,8% (FAGNANI *et al.*, 2016); 20,0% (NEVES, 2021); 34,64% (MARTINS, 2022); no Rio Grande do Norte, 15,91% (FARIA *et al.*, 2017); em Santa Catarina, 24,4% (MANSKE *et al.*, 2020); e em Minas Gerais, 12,93% (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Nas pesquisas citadas acima, o teste do álcool foi utilizado como referência para avaliar a estabilidade do leite. Verificou-se que a presença de LINA foi mais frequente no outono e início do inverno e, o que pode estar associado à redução no desenvolvimento das forrageiras nativas e ao estágio inicial de crescimento das forrageiras de inverno (MARQUES *et al.*, 2007). Por outro lado, ZANELA *et al.*, (2009). constatou uma maior prevalência de LINA no final do verão e início do outono. Além disso, os autores observaram que a ocorrência de UNAM diminuiu à medida que a produção de leite das fazendas aumentou.

Esses resultados sugerem uma possível relação entre fatores sazonais, como o estágio de crescimento das forrageiras, e a ocorrência de LINA, além do impacto da produção leiteira e tecnificação na redução desse fenômeno. O LINA está relacionado

a alterações na estrutura ou função das moléculas de caseína, afetando assim a estabilidade do leite. No entanto, é importante notar que a relação exata entre LINA e moléculas de caseína ainda está sendo estudada e a identificação do LINA pelos testes tradicionais (álcool/alizarol) que são baseados na acidificação, pode ser dificultada.

## 2.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELÉTRICA (EIE)

A EIE avalia materiais biológicos pelas suas características elétricas (GRIMNES e MARTINSEN, 2014). A aplicação de corrente elétrica em uma massa biológica em diversas frequências permite identificar o material extracelular e intracelular (MACDONALD e JOHNSON, 2018). A aplicação da tensão elétrica em um corpo sofre resistência a sua passagem entre o eletrodo emissor e o receptor. A essa resistência ao fluxo da corrente elétrica é dada em impedância, sendo a forma de medir a maneira como a eletricidade percorre cada elemento químico. Quando aplicado correntes elétricas em tecidos biológicos é chamado de bioimpedância, tratando da condutividade, permissividade, resistência, capacitância e indutância (PLIQUETT, 2010).

A bioimpedância pode ser definida como o grau de impedimento à passagem da corrente elétrica através de um meio biológico, onde a composição química do meio extracelular representa um elemento resistivo. As membranas celulares e o meio intracelular representam um elemento capacitivo dentro da bioimpedância (GELLER *et al.*, 2020). A aplicação da variação de frequência em Hertz (Hz) da corrente elétrica, nos elementos capacitivos e resistivos respondem de formas diferentes. Quanto maior a frequência, menor será a reatância do capacitor e maior do indutor. No meio biológico, frequências menores que 100 kHz fazem com que a corrente percorra o meio extracelular; e para maiores frequências, a corrente atravessa a parede celular percorrendo o espaço intracelular (GRIMNES e MARTINSEN, 2014). Assim, o espaço extracelular pode ser representado por um resistor e a membrana celular e meio intracelular por um capacitor (WANG, 2005; TAKA, 2008).

Trabalhos apontam que é possível mensurar gordura, contagem de células somáticas (CCS), lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos (MARTINS *et al.*,

2017), (SCHUMACHER *et al.*, 2019), (VEIGA e BERTEMES-FILHO, 2012). De acordo com DURANTE *et al.*, (2016), MARTINS *et al.* (2017) e MINETTO *et al.* (2022), é possível a identificação de adulterantes no leite, tornando o leite mais seguro e evitando perdas maiores em possíveis misturas de tanques. De acordo com o trabalho de BREITENBACK (2021), a espectroscopia de impedância tem potencial de mensurar lactose e sólidos totais entre as frequências de 0,8 a 1000 kHz. E em trabalho de Zuffo (2021), a contagem de células somáticas também foi investigada pelo método de EIE, se mostrando um método promissor para sua determinação. Scandurra *et al.* (2022) utilizaram a EIE para discriminar leites UHT integrais, semidesnatados e desnatados, além do efeito do método de refrigeração sobre a manutenção das propriedades do leite bovino. Os autores afirmaram que por meio da EIE é possível identificar a degradação do leite anterior a detecção visual pelo consumidor, principalmente em diferentes condições de armazenamento, e identificar leites vencidos.

Em suma, frente às características intrínsecas das micelas de caseína do leite, às bases de funcionamento e limitações do teste do álcool/alizarol, e ao potencial do uso da EIE para determinação da composição e qualidade do leite, a utilização da EIE para análise da estabilidade térmica do leite deve ser investigada.

### 3. ARTIGO 1: Variação natural do cálcio iônico e efeitos na estabilidade do leite bovino ao teste do álcool

Shaeen Kunz

Ana Luiza Bachmann Schogor

#### Resumo

Os efeitos da variação natural do cálcio iônico ( $Ca_i$ ) na estabilidade ao álcool e presença do leite instável não ácido (LINA) em leite bovino (amostras de tanque de resfriamento) foram investigadas. Variações nos teores de  $Ca_i$  foram observadas, em que o  $Ca_i$  foi menor em leites estáveis à maiores graduações alcoólicas. Ainda, leites alcalinos ou LINA não apresentaram diferença no teor de  $Ca_i$ , quando comparado a leites normais ou ácidos, porém o  $Ca_i$  diferiu entre leites ácidos e normais. A variação observada do  $Ca_i$  do leite coletado em tanques de resfriamento pode auxiliar os laticínios em seus processos industriais (ANEXO A).

**Palavras-chave:** estabilidade ao etanol; LINA; cálcio iônico; composição do leite.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O leite bovino é uma importante fonte de cálcio. Este é essencial para nutrição humana e para processos industriais, pois exerce funções relacionadas ao tempo de coagulação e gelificação das micelas de caseína nos queijos (Sandra *et al.* 2012; AKKERMAN *et al.* 2019) e à estabilidade térmica e sedimentação no leite ultrapasteurizado (UHT) (NIAN *et al.* 2012; KARLSSON *et al.* 2019).

O cálcio do leite é organizado em três principais frações. A fração coloidal (70%), representada pelo cálcio associado ao fósforo, formam as pontes de fosfato de cálcio das micelas de caseína; na fase solúvel (20%) o cálcio se encontra na forma de sais, e; por último a fase iônica  $Ca_i$  (10%), composta por íons de cálcio livre (LIN *et al.* 2006). Gaucheron (2005) descreve a distribuição das frações, principalmente  $Ca_i$ , como complexa e dinâmica. Os teores de  $Ca_i$  podem ser diferentes entre vacas, com

a mesma composição de cálcio total (LIN *et al.* 2006). Isso pode ser explicado pela correlação forte positiva (0,64) entre  $Ca_i$  e sérico (AKKERMAN *et al.* 2019). No geral, o teor deste íon fica entre 1,0 e 4,4mM (POULSEN *et al.* 2017) e varia de acordo com o estágio da lactação (MARQUES *et al.* 2007) estações do ano (CHEN *et al.* 2014; Li *et al.* 2019) manejo alimentar (GRIMLEY *et al.* 2009), entre outros fatores ainda não totalmente esclarecido Historicamente, White e Davies (1958) atribuíram cerca de 60% das variações na estabilidade do leite ao teor de cálcio iônico. Esta estabilidade é caracterizada como a capacidade das micelas de caseína manterem-se em suspensão coloidal quando o leite é submetido a tratamento térmico. A correlação forte e negativa entre estabilidade e  $Ca_i$  encontrada na época (-0,64), se assemelha as atuais (-0,69) (AKKERMAN *et al.* 2019; LI *et al.* 2019). No entanto, não é totalmente claro o efeito da variação natural do  $Ca_i$  sobre as propriedades funcionais do leite, como a estabilidade térmica e sua relação com o leite instável sem acidez adquirida em rebanhos leiteiros, denominado leite instável não ácido (LINA). Neste estudo, propriedades físico-químicas de leite cru de tanques de resfriamento de fazendas leiteiras foram investigadas quanto a relação com a estabilidade térmica, as classificações e os constituintes do leite, em particular, o conteúdo de  $Ca_i$ .

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostras de leite

Entre os meses de agosto a novembro de 2022, 379 amostras de leite cru, oriundas de tanques de expansão foram coletadas em fazendas leiteiras no oeste de Santa Catarina, Brasil. As coletas de amostras foram realizadas pelos profissionais responsáveis pela coleta de leite a granel para o laticínio, no momento da realização do teste do alizarol (teste do álcool) e imediatamente anterior ao carregamento do leite (BRASIL, 2018B). Estas amostras eram acondicionadas em frascos plásticos de 250ml vedados com tampa rosca com septo, armazenados no refrigerador acoplado aos caminhões e transportadas até o laticínio à uma temperatura de 4°C, sem conservantes. Uma vez que os caminhões de coleta de leite a granel retornavam ao laticínio, as amostras eram reunidas em uma única caixa isotérmica e transportada

até o laboratório, para realização das análises de teste do álcool, acidez titulável, pH, densidade e  $Ca_i$ .

### **3.2.2 Análise da estabilidade ao álcool**

A estabilidade térmica do leite foi definida pela graduação mínima de precipitação da caseína, nas concentrações alcoólicas de 68 a 82% (v/v), com incremento de 2%, pelo teste do álcool (TRONCO, 2010). O preparo e monitoramento das soluções alcoólicas era realizado com um alcoômetro (Alcoômetro Gay Lussac 0/100:1%, 329mm calibrado a 20°C, Incoterm 5683) e posteriormente eram armazenadas. A cada bateria de análise as soluções alcoólicas eram verificadas e corrigidas, se necessário.

Para análise, eram pipetados 2 ml de leite e em seguida 2 ml de álcool, em placa de Petri, em duplicata. Quando havia a presença dos precipitados de caseína a amostra era classificada como leite instável. Dessa forma, o leite era classificado sempre pela menor graduação alcoólica em que houve aglomerados de caseínas visíveis (ZANELA *et al.* 2009).

### **3.2.3 Análise de acidez titulável, pH e densidade**

A determinação do nível de acidez do leite foi baseada na análise de acidez titulável, em graus Dornic (°D). Nesta análise, realizada em duplicata, 10ml de leite eram transferidos a um erlenmeyer e adicionados 4 gotas do indicador ácido-básico fenolftaleína 1%. Após homogeneizados, era realizada a titulação com a solução de Dornic até que atingisse uma coloração ligeiramente rósea (ADOLFO LUTZ, 2008). Os resultados foram expressos em graus Dornic (°D).

O pH do leite foi analisado em triplicata, pelo método (Adolfo Lutz 2008) com uso de potenciômetro de eletrodo esférico (Alfakit AT355, Florianópolis, BR), submerso em 50ml de leite, acondicionados em recipientes plásticos. As calibrações eram feitas diariamente, com soluções tampão pH 4, pH 7 e pH 10, respeitando as especificações do fabricante.

A determinação da densidade do leite foi realizada de acordo com a, utilizando-se um termo-lacto-densímetro (15/40x1g/ml 285+5mm calibrado a 20°C, Incoterm 5784.L), com leituras imediatas. Foram considerados valores normais para leite entre 1,027 e 1,033, correspondentes a 20°C (KAILASAPATHY, 2015).

### **3.2.4 Análise de Cálcio Iônico (Ca<sub>i</sub>)**

A determinação da concentração de Ca<sub>i</sub> do leite seguiu a metodologia descrita por (LEWIS, 2011) que utiliza de um potenciômetro associado a um eletrodo combinado de íon seletivo (ISE) para cálcio (HI 4104, Calcium Combination Electrode, HANNA Instruments), com leitura direta, em ppm (mg/L).

Em cada bateria de análise o eletrodo era montado, preenchido com a solução de KCL 3,5% e calibrado a cada três dias, com quatro soluções de cloreto de cálcio (1, 10, 100, e 1000 ppm) e 1ml da solução denominada *Ionic Strength adjustor* (ISA) (KCl, 4M). Com eletrodo montado, sensibilizado e calibrado, 50ml de leite e 1ml de ISA eram adicionados em copos plásticos descartáveis. Ambos eram homogeneizados por meio de agitador magnético em velocidade constante.

### **3.2.5 Classificação do leite**

O leite foi organizado em quatro classificações, baseadas na proposta de Zanela e Ribeiro (2018), a saber: leite normal = acidez entre 0,14 e 0,18 g/100 ml, considerado com pH entre 6,6 e 6,8; leite ácido = com acidez maior que 0,18 g/100ml, com pH abaixo de 6,6 e; leite alcalino = com acidez menor que 0,14g/100ml e pH acima de 6,8 e LINA = acidez entre 0,14 e 0,18 g/100 ml, considerado com pH entre 6,6 e 6,8 e instável à graduação alcoólica ≤72% (v/v).

### **3.2.6 Análise de dados**

O efeito da classificação do leite e do mês sobre as variáveis dependentes contínuas foi determinado por análise de variância, obedecendo os pressupostos do teste, seguido de Tukey-HSD. A normalidade e homoscedasticidade foram

determinadas pelos testes de Shapiro–Wilk e Levene, respectivamente. O efeito da estabilidade ao álcool sobre a concentração de  $Ca_i$  foi determinado por regressão linear simples. O efeito do mês sobre a porcentagem de amostras estáveis à  $\geq 76^\circ$  foi determinado por regressão logística, seguida de contrastes para a multicomparação entre os grupos. Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico JMP Pro (JMP Statistical Discovery LLC.) e foi adotado como nível de significância  $P < 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS

Quanto a composição físico-química das amostras analisadas (Figura 6), os valores médios de pH e densidade ficaram dentro do estabelecido pela legislação (BRASIL, 2018A) de  $6,64 \pm 0,11$  e de  $1,031 \pm < 0,01$  (média seguida do desvio padrão), embora tenham sido encontrados valores fora do especificado, conforme a amplitude observada de 6,22 a 6,96, e de 1,027 a 1,035.

Com relação à acidez titulável, o valor médio foi de  $16,8 \pm 1,8$  °D, sendo que 73,42% das amostras permaneceram dentro dos padrões estabelecidos pela (BRASIL, 2018B), que é de 14 a 18 °D; 24,18% ficaram acima de 18 °D e apenas 4,57% permaneceram abaixo de 14 °D, sendo a amplitude observada entre 12 e 22 °D. Para o  $Ca_i$ , o valor médio foi de  $83.71 \pm 23.50$  mg/L, com amplitude entre 30.33 e 171 mg/L, o que resulta em uma variação de 140,67mg/L entre as amostras analisadas.

O valor médio da concentração do álcool, em que as amostras foram estáveis, foi de  $75.46 \pm 4.71\%$  (v/v), o qual atende o que é determinado pelo teste do álcool pela legislação vigente que é de no mínimo 72% (v/v) (BRASIL, 2018B). Todavia, a amplitude mostra que houve detecção de leites instáveis em todas as graduações testadas, ou seja, de 68 a 82% (v/v). A concentração de 84% (v/v) indicado na Figura 6D, é composta pelas amostras de leites que suportaram a graduação alcoólica 82 % (v/v).

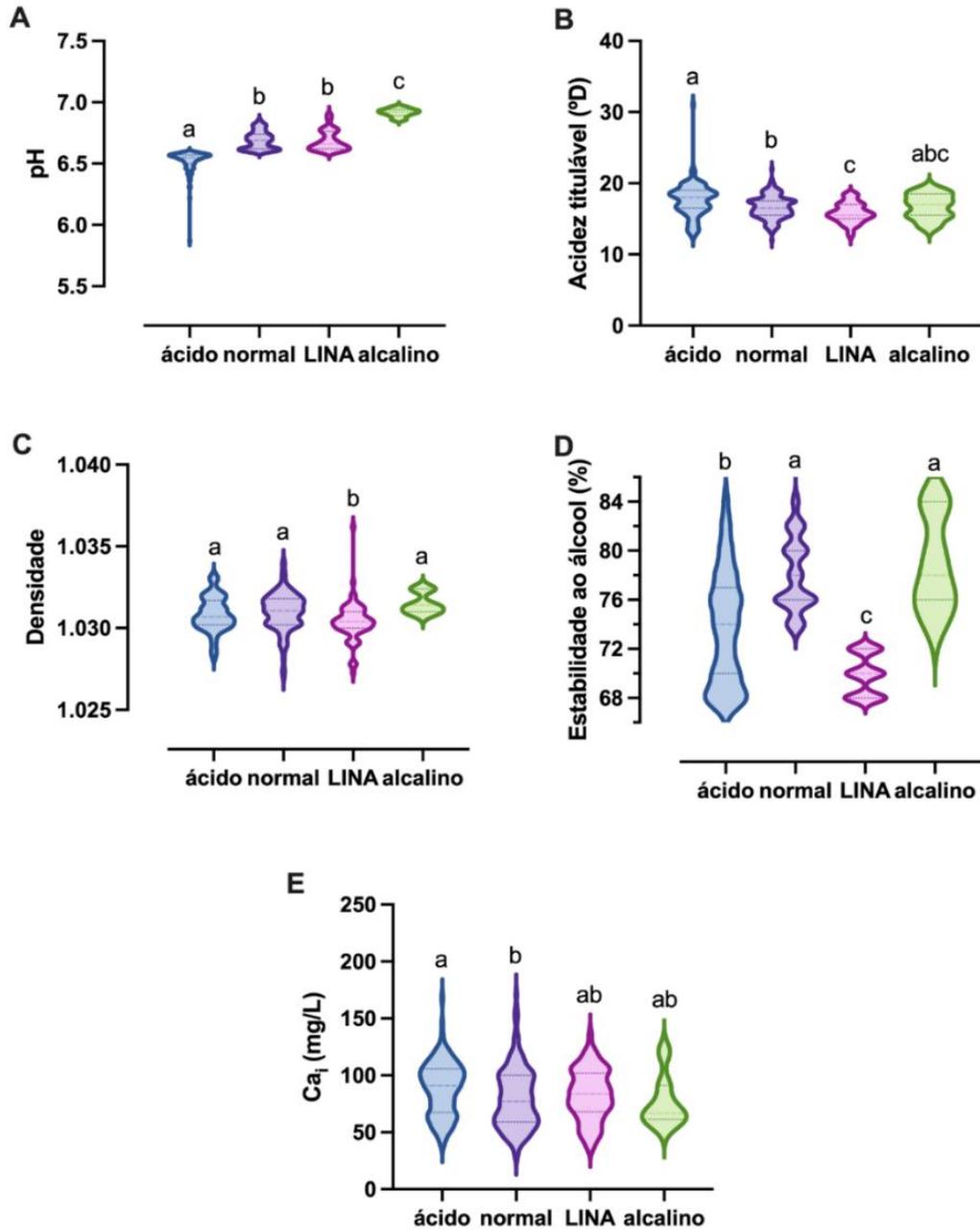
Com relação à frequência de aparecimento dos diferentes tipos de leites, 43,8% foram amostras de leite normal, 34,8% ácido, 19,5% LINA e 1,8% alcalino. Esta classificação foi baseada em parâmetros estabelecidos por Zanela e Ribeiro (2018) em leites com pH < 6,6 são considerados ácidos, entre 6,6 e 6,8 normais e acima de

6,8, leites alcalinos. Para ser classificado como LINA, o leite coagulou frente à análise de estabilidade ao etanol ( $\leq 72\%$  v/v) e apresentou pH normal.

Encontramos diferenças nas concentrações dos constituintes dos leites estudados entre as classificações (Figura 6). Conforme metodologia adotada para classificação dos leites, foi detectada diferença entre leite ácido, normal, LINA e alcalino, para pH (Figura 6A). De forma complementar, a análise de acidez titulável apresentou diferença entre as classificações como ácido, normal e LINA. Todavia, o leite alcalino não se diferiu das demais classificações (Figura 6B). O LINA teve a menor densidade quando comparado às demais classificações, sendo que os leites ácido, normal e alcalino não diferiram (Figura 6C). Observamos que os leites ácidos tiveram maior teor de  $Ca_i$ , comparado os leites normais, no entanto não diferiram do alcalino e LINA (Figura 6E).

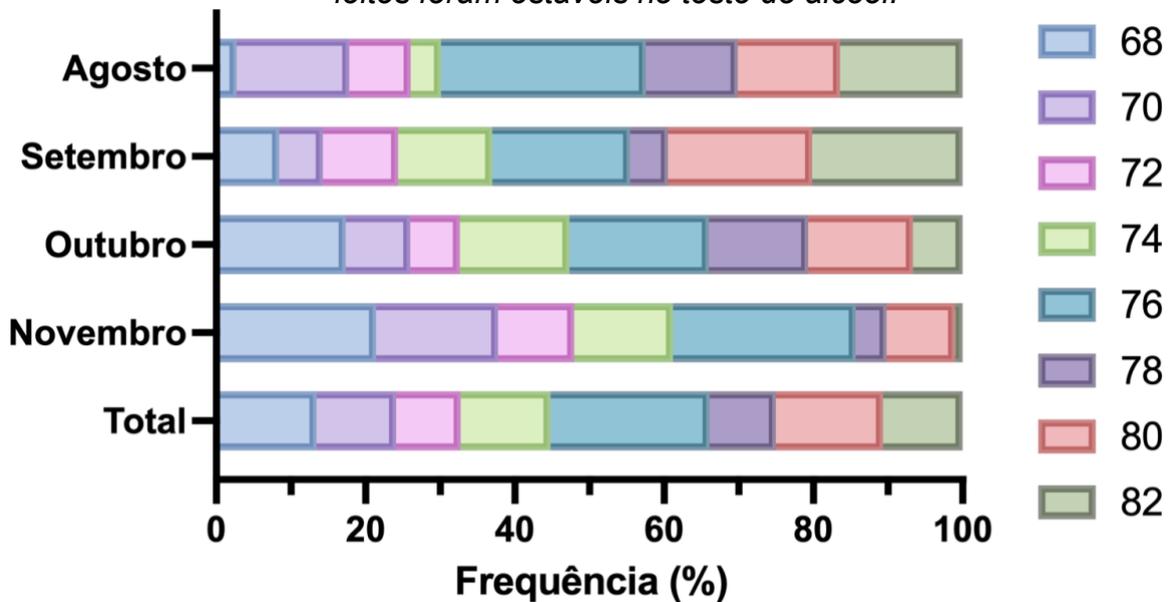
Quando analisada a estabilidade ao álcool, dentro de cada classificação (Figura 6D) é possível observar que os leites ácidos coagularam em baixas e até altas graduações alcoólicas. Os leites alcalinos e normais foram mais estáveis que ácido e LINA, pois coagularam em graduações alcoólicas mais altas. Houve presença de leite alcalino coagulando em baixas e altas graduações e o LINA, classificado pela graduação alcoólica  $\leq 72\%$ (v/v), concentrou-se abaixo desta faixa.

Figura 6 - Frequência de aspectos físico-químicos de 379 amostras de leite de tanque analisadas entre os meses de agosto a novembro.



(A) pH, (B) acidez titulável, (C) Densidade, (D) estabilidade ao álcool %v/v (E) Cálcio iônico (mg/L), distribuídos de acordo com a classificação do leite. As médias dos meses diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Tukey-HSD. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7 - Distribuição mensal e geral do resultado das análises de estabilidade ao álcool dos leites de tanque. As barras demonstram as graduações até as quais os leites foram estáveis no teste do álcool.

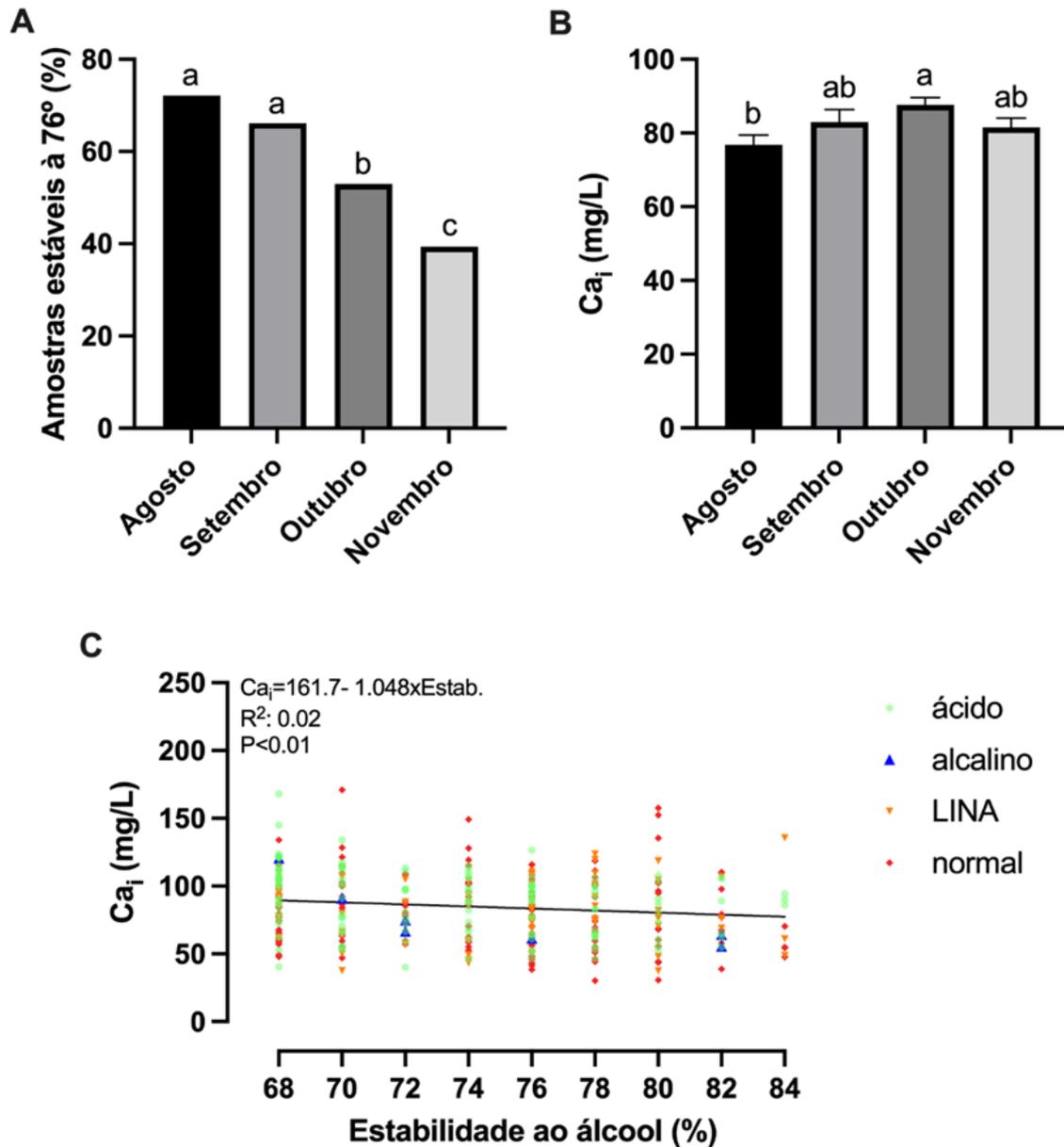


Fonte: Elaborado pela autora

A distribuição mensal e geral dos resultados das análises de estabilidade ao álcool, em amostras dos tanques de expansão são apresentadas na Figura 7. A porcentagem indicada representa até qual concentração alcoólica em que as amostras de leite foram estáveis ao teste do álcool. Em todos os meses avaliados foram encontradas amostras instáveis desde a menor graduação testada, ou seja, 68% (v/v), até leites estáveis à graduação de 82% (v/v), sendo que no total, apenas 3,2% das amostras foram estáveis em todas as graduações alcoólicas estudadas.

Foi verificado que houve uma variação na frequência da detecção de leites estáveis a 76% (v/v) ao longo dos meses (Figura 7A). Em agosto e setembro mais amostras de leites de tanque foram estáveis; em outubro, foram observados valores intermediários e em novembro, menos amostras estáveis às graduações  $\geq 76\%$  (v/v) ( $P < 0,05$ ). De forma oposta, pode-se admitir que ao longo dos meses avaliados, ou seja, na transição entre as estações do inverno e primavera, houve uma queda na estabilidade térmica do leite avaliada pelo teste do álcool. Em contrapartida, no mês de agosto foi observado menor concentração de  $C_{ai}$  em comparação ao mês de outubro, todavia não se diferiu dos meses de setembro e novembro. Comportamento também observado para o mês de outubro que apresentou maior concentração de  $C_{ai}$ , porém também não diferiu dos meses de setembro e novembro.

Figura 8 - A) Frequência de amostras estáveis  $\geq 76\%$  (v/v) de acordo com os meses avaliados. B) Teor de  $Ca_i$  de acordo com os meses avaliados.



As médias dos meses diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Tukey-HSD. C) Relação  $Ca_i$  e estabilidade, de acordo com cada graduação alcoólica e classificação do leite. Relação encontrada por meio da regressão logística ( $P < 0,01$ ). Fonte: Elaborado pela autora.

A concentração de  $Ca_i$  foi menor à medida que as amostras eram mais estáveis ao teste do álcool ( $P < 0,01$ ), conforme apresentado na Figura 8C. Esta estimativa foi obtida considerando-se todas as amostras avaliadas, pois como pode ser observado, no gráfico são indicadas por pontos coloridos as classificações das amostras, ou seja, leites considerados ácidos, alcalinos, LINA ou normais. Em suma, independentemente

de sua classificação, leites com maior teor de  $Ca_i$  são menos estáveis a graduações alcoólicas mais altas e coagulam. Também observamos essa mesma relação entre  $Ca_i$  e estabilidade (Figuras 8A e B), pois ao longo dos meses, a medida que o teor de  $Ca_i$  aumentou, diminuiu-se a estabilidade ao álcool dos leites avaliados. As duas formas de análise dos dados mostram que leites mais estáveis apresentaram menor teor de  $Ca_i$ , com exceção do mês de novembro, onde este comportamento foi diferente.

Ainda, de forma complementar, quando considerada a classificação do leite como ácido, normal, alcalino ou LINA, encontramos uma ampla faixa de variação natural do teor de  $Ca_i$  dentro de cada classificação (conforme já mostrado na Figura 7E) e o mesmo comportamento ocorreu para as graduações alcoólicas testadas (Figura 8C) ou seja,  $Ca_i$  variou dentro de cada graduação, desde o álcool 68% (v/v) até o 82% (v/v).

### 3.4 DISCUSSÃO

Buscamos com esse estudo explorar a relação entre propriedades físicas, como a estabilidade ao álcool, com componentes naturais do leite, principalmente o teor de  $Ca_i$  na ocorrência de LINA. As graduações alcoólicas crescentes, pH e acidez titulável auxiliaram na classificação e visão dos efeitos estudados.

O LINA foi identificado como uma alteração na qualidade do leite, resultante de um desequilíbrio no sistema de produção, ocasionada pela instabilidade da molécula de caseína, ao teste de álcool, sem acidez elevada Zanela *et al.* (2009). Vários estudos, tem sido realizado para compreender a sua ocorrência e mecanismos de ação. No nosso caso, buscamos compreender a estreita relação entre o teor natural de  $Ca_i$  e outros componentes do leite com as classificações, principalmente no leite LINA, no entanto não encontramos leites caracterizados como LINA com diferença no teor de  $Ca_i$ , apenas alterações nas densidades (Figura 7C e E).

As variações na dieta já foram descritas como fontes aparecimento do LINA por Soutelino *et al.* (2022) e alterações no ambiente ocorridas ao longo das estações do ano, comprometem o equilíbrio entre exigências nutricionais de manutenção e produção de leite. Machado *et al.* (2017) encontraram diminuição da estabilidade no período

transição entre estações, explicada pela alteração das temperaturas e diminuição de qualidade dos materiais forrageiros. Por mais que avaliamos apenas quatro meses, podemos observar uma queda na estabilidade dos leites nos meses mais quentes. Associamos essa informação a características produtivas da região, que na maioria são sistemas à pasto com suplementação e também o aumento da temperatura que tende a colocar a vaca em um estado de estresse térmico.

Embora os meses avaliados no presente trabalho tenham sido somente de agosto a novembro, ressalta-se que este período coincide com a transição entre as estações de inverno e primavera. Na região geográfica da pesquisa, é conhecida a variação da temperatura no período, com aumentos gradativos os quais já podem colocar os animais em condição de estresse térmico. Além de poder ser uma época de vazios forrageiros, e como citado por Oliveira (2009), desbalanços nutricionais podem predispor ao aparecimento de LINA.

A frequência de coagulação dos álcoois avaliados é de interesse ser discutida, haja vista que não é a primeira vez que pesquisas nesta área encontram a graduação alcoólica 76 % (v/v) com maior prevalência (MANSKE *et al.* 2020). Isso nos leva a pensar que classificar leites com graduações mínimas de 72% (v/v), assim como é realizado no Brasil e países emergentes, não deveria mais ser utilizado pela indústria. O álcool 76% (v/v), passaria a ser o balizador para leites de qualidade e como esta análise ainda é importante na classificação de leites, tendenciaríamos a uma melhora na qualidade do leite nacional, pois para atingir esta graduação, padrões mínimos dentro das propriedades leiteiras teriam que ser estabelecidos.

Em complemento, durante o processo de tratamento UHT, Lin (2003) considerou que a estabilidade do leite atinge o limiar quando exposto a uma concentração de etanol de 75%. O estudo realizado por Molina *et al.* (2001) investigou a correlação entre os parâmetros do teste do álcool e a estabilidade térmica do leite, por meio da utilização de diferentes concentrações de etanol, 70% a 85% (v/v) (com incremento de 5%). Os resultados indicaram que na concentração de 75% de etanol, foram obtidos valores de estabilidade térmica entre 60 e 70 segundos a 135 °C, diante disso a justificativa de utilizar leites que suportam graduações alcoólicas acima de 75% não possui fundamento científico e industrial.

A estabilidade do leite é relacionada com seus teores de cálcio, pois este deve permanecer em um equilíbrio dinâmico, entre a fase coloidal, solúvel e iônica (LIN *et al.* 2006) e em constante interação com as micelas de caseínas. Espera-se com esse equilíbrio que o leite seja estável ao aquecimento térmico, devido a uma camada externa difusa, composta pela extremidade N-terminal das  $\kappa$ -caseínas, solúvel em alta concentração de  $Ca_i$ , que contém cargas eletricamente negativas, em constante repulsão eletrostática (FOX *et al.* 2003). Essa relação é denominada de potencial zeta e foi correlacionado positivamente com a estabilidade térmica do leite (PINHEIRO *et al.* 2022).

Embora as cargas negativas mantem as micelas em suspensão coloidal, outros fatores exercem efeito sobre este, não sendo suficientes para prevenir a agregação micelar (WALSTRA, 2002). Dentre estes fatores podemos destacar hidrólise enzimática da K-caseína (pelas bactérias), o diâmetro das micelas, temperatura, pH, e  $Ca_i$  (O'CONNELL *et al.* 2006). Horne (2020) descreve o pH ácido como uma das variáveis responsáveis por este efeito. No entanto, os mecanismos que levam leites com pH normais (LINA) a precipitarem ainda não são totalmente esclarecidos, pois estes variam de acordo com a fonte modificadora. Como exemplo da precipitação por acidificação, em pH baixo, ocorre a solubilização das ligações que mantem as micelas unidas a neutralização das cargas negativas reduzindo a repulsão eletrostática entre as micelas (O'CONNELL *et al.* 2006).

No nosso estudo o  $Ca_i$  foi relacionado significativamente com a instabilidade das moléculas de caseína e principalmente com as graduações alcoólicas mais altas e com a acidez do leite. O leite quando submetido ao teste do álcool passa pela desidratação da molécula de caseína, simulando o aquecimento (MOLINA *et al.* 2001). Esse processo quando realizado em leite ácido ou LINA faz com que ocorra desintegração das moléculas e o precipitado seja constituído pelas moléculas que antes estavam dispersas de forma coloidal.

A perda de estabilidade ocasionada pela acidificação do leite ocorre devido à redução do pH, resultando na degradação do caseinato de fosfato de cálcio, o que leva a um aumento na concentração de  $Ca_i$ . Esse aumento de  $Ca_i$ , por sua vez, diminui as forças de repulsão eletrostáticas entre as moléculas de caseína, promovendo a agregação e coagulação (LEWIS, 2011; HORNE, 2016).

Os leites que suportaram graduações alcoólicas menores, tiveram maior teor de  $Ca_i$ . Este resultado está de acordo com os achados de (AKKERMAN *et al.* 2019; LI *et al.* 2019) e outros estudos históricos com o mesmo propósito como no caso de Tsioulpas *et al.* (2007) e White e Davies (1958). Basicamente, a instabilidade devido a níveis elevados de  $Ca_i$  ocorre pois o fosfato de cálcio coloidal é dissolvido; a caseína perde sua carga eletrostática e em consequência, aglomera (WU *et al.* 2018).

Alterações nutricionais foram associadas as mudanças de composição de  $Ca_i$ . As fontes de carboidrato e relação proteína degradável no rúmen e não degradável no rúmen proporcionaram aumento no teor de  $Ca_i$  e queda da estabilidade das moléculas de caseína (FONSECA, 2018). Nos estudos de Marques *et al.* (2011) a acidose metabólica foi responsável pelo aumento do  $Ca_i$  devido à ação da paratireoide e hormônios 1,25-dihidroxicolecalciferol. A dieta com diferença cátion-iônica (DCAD) utilizada para simular a acidose metabólica, foi investigada quanto a alteração do  $Ca_i$  por Martins *et al.* (2015) e os resultados indicam que esta, pode ser uma fonte importante para o aumento do  $Ca_i$  e diminuição da estabilidade ao álcool e estabilidade térmica a 140°C.

As estações do ano também são responsáveis por alterações nos teores de  $Ca_i$  (MARTINS, 2022) em sua dissertação, observou que o leite de vacas no verão tivera maior teor de  $Ca_i$ , quando comparado ao inverno. E da mesma forma, a estabilidade ao álcool no verão foi pior. Ou seja, a estação do ano pode ser uma importante fonte de alteração do nível de  $Ca_i$  e consequentemente a estabilidade ao álcool. Na Nova Zelândia, Li *et al.* (2019) evidenciaram efeitos da sazonalidade, quanto ao nível de  $Ca_i$  e estabilidade. O outono, foi responsável por diminuição no teor do  $Ca_i$ , devido aos estágios avançados de maturação das forragens e declínio na taxa de crescimento das plantas e a estabilidade ao álcool foi diminuída no inverno pelo retardo do crescimento das plantas forrageiras, devido a menos horas de luz solar.

Pela primeira vez a variação natural do cálcio, dentro de cada graduação alcoólica e classificação do leite de tanque foi demonstrada. Observamos que, o  $Ca_i$  do leite pode variar em torno de 120mg/l dentro da mesma classificação e mesma graduação alcoólica. Essa variação natural do  $Ca_i$  dos tanques de resfriamento, dentro de cada graduação alcoólica (Figura 8C) traz implicações, pois ao analisar o  $Ca_i$  e a

relação com a estabilidade das micelas Chavez *et al.* (2003) evidenciou que a estabilidade térmica e a estabilidade ao álcool, são sensíveis a níveis variados de  $Ca_i$ .

Para o produtor, a instabilidade do leite ao teste do álcool (realizado por meio do teste do alizarol) implica em recusas do leite pela indústria. Obviamente, esse tipo de recusa ocorre em países onde o teste do álcool ainda não foi abolido como ferramenta de seleção de leites. No entanto, dada a qualidade do leite brasileiro, que ainda apresenta desconformidade aos padrões, torna-se necessário a classificação prévia ao carregamento, a fim de evitar prejuízos com leites ácidos e impróprios para o consumo, sendo necessários mais critérios para diferenciar leite ácido de leite LINA.

Outro fato está associado ao processamento dos leites instáveis, seja ele ácido ou LINA. Caso estes leites cheguem à indústria, algumas complicações nos equipamentos durante a fase de fabricação podem ser observadas, principalmente pela coagulação que ocorre durante a pasteurização ou no processo UHT, que resulta em obstruções e bloqueios, além de contribuir para a redução da vida útil dos produtos em prateleira (RADFORD *et al.* 2004). No entanto é possível à confecção de queijo minas frescal com leite LINA sem perdas significativas de rendimento (GOULART *et al.* 2019).

Além disso, para a indústria de derivados, o cálcio (coloidal e livre) desempenha um papel crucial na coagulação do leite pasteurizado e na formação da estrutura e textura do queijo. De acordo com Guinee e O'Kennedy (2009) o leite que possui baixos níveis de cálcio, tende a ter coagulação comprometida, formando coágulo fraco e queijos com textura inadequada. Por outro lado, quando o leite apresenta altos níveis de cálcio, a coagulação pode ocorrer rapidamente e de forma excessiva, resultando em queijos mais duros e secos, assim como observado por Ong *et al.* (2013). Portanto, as alterações nos níveis de cálcio, incluindo  $Ca_i$  geram uma despadronização da matéria prima e aditivos como o cloreto de cálcio devem ser adicionados em diferentes quantidades a fim de garantir uma coagulação adequada e a obtenção da textura desejada (FOX *et al.* 2017).

### 3.5 CONCLUSÃO

A estabilidade ao álcool e teor de  $Ca_i$  de leites de tanque de resfriamento variaram de acordo com os meses e estão associados a um período de transição, entre estações do ano. O álcool 76% (v/v) pode ser utilizado como um balizador na classificação de leites de qualidade. Os leites mais instáveis, possuem maior teor de  $Ca_i$ , com destaque aos leites ácidos. Os leites classificados como LINA, não possuem diferenças no teor de  $Ca_i$ , quando comparado a leites normais (estáveis). Uma faixa de variação nos teores de  $Ca_i$  foi observada dentro de cada classificação (ácido, normal, LINA e alcalino) e dentro das graduações alcoólicas. Esses achados podem explicar a variação na quantidade de leite captado pela indústria, o que significa que produtores não tenham seu leite coletado em épocas mais propensas à menores estabilidades.

A variação observada do  $Ca_i$  do leite coletado em tanques de resfriamento pode auxiliar os laticínios em seus processos industriais.

#### **4. ARTIGO 2: Espectroscopia de impedância elétrica como método alternativo ao teste do alizarol para avaliação de estabilidade térmica do leite**

Shaeen Kunz

Ana Luiza Bachmann Schogor

##### **Resumo**

A estabilidade térmica é um aspecto crucial na indústria de laticínios, afetando a qualidade e processabilidade do leite. A tradicional análise da estabilidade usando o teste do álcool/alizarol apresenta limitações. A sensibilidade, especificidade e acurácia foram utilizadas para analisar a espectroscopia de Impedância elétrica (EIE) em comparação ao teste padrão. Os resultados com acurácia acima de 80% indicam potencial de utilização. Além disso, a EIE é rápida, não destrutiva e possui potencial para automatização. A aplicação dessa tecnologia pode trazer avanços significativos na avaliação da estabilidade térmica do leite, beneficiando a indústria e os produtores.

**Palavras-Chave:** Sensibilidade; Especificidade; Acurácia; Leite; LINA; estabilidade.

##### **4.1 INTRODUÇÃO**

A estabilidade térmica do leite tem papel fundamental na produção e processamento de produtos lácteos de alta qualidade. A capacidade do leite em manter suas propriedades físicas e químicas durante o aquecimento é um indicador importante para destinação do leite para a fabricação de produtos lácteos como UHT e derivado. Com amparo legal o teste do álcool/alizarol tem sido utilizado como o método para avaliar a estabilidade térmica do leite (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011; BRASIL, 2018A/B).

No entanto, esse teste apresenta limitações significativas que podem comprometer sua eficácia e precisão, uma vez que se baseia na observação da coagulação do leite quando misturado com álcool adicionado de alizarina a uma determinada concentração. A coagulação é considerada um indicativo da estabilidade térmica do leite, uma vez que está relacionado às interações entre as proteínas do

leite, principalmente as caseínas (HORNE, 2016) enquanto a coloração relaciona-se com o pH da amostra (BRASIL, 2018B).

No entanto, essa abordagem tem suas limitações, pois a coagulação do leite pode ser influenciada por fatores não relacionados à estabilidade térmica, como o pH, composição do leite, Leite Instável não Ácido (LINA) e a presença de outros componentes (ZANELA *et al.*, 2009; ZANELA e RIBEIRO 2018). Os dados estimados por (MAGRI, 2015) mostraram que 30% das perdas apontadas como leite ácido foram erroneamente classificadas, uma vez que o teste padrão (álcool/alizarol) não distinguiu o leite verdadeiramente ácido do LINA (falso positivo).

Além disso, o teste do álcool/alizarol é um método qualitativo e subjetivo, dependendo da interpretação visual do observador e graduação alcoólica preconizada pela indústria, uma vez que a legislação permite o uso de graduação alcoólica mínima de 72% (v/v). Todavia, não é incomum que laticínios utilizem graduações mais elevadas para teoricamente, selecionar leite de melhor qualidade e estabilidade térmica. No entanto, com o aumento da graduação alcoólica há maior prevalência de LINA (SILVA *et al.*, 2012) e não há correlação entre o aumento da graduação alcoólica e o aumento da resistência térmica (MOLINA *et al.*, 2001).

A subjetividade do teste pode resultar em classificações imprecisas e uma avaliação inadequada da estabilidade térmica do leite. No entanto, há oportunidades para superar essas limitações por meio de avanços tecnológicos. Uma abordagem promissora é o uso de métodos alternativos, como a Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE), técnica de baixo custo, sem necessidade de recalibrações e de uso de reagentes, ainda não foi explorada para determinação da estabilidade térmica do leite e características correlatas. A EIE é uma técnica de caracterização elétrica que permite o estudo do comportamento geral de um sistema com grande número de processos intercorrelacionados que ocorre em diferentes velocidades (CARVALHO e ANDRADE, 2006), detectadas pela aplicação de diferentes frequências elétricas seguidas da mensuração da impedância elétrica em função da frequência (MINETTO *et al.*, 2022). Por meio da EIE, foi possível identificar adulteração de leite bovino com ureia (MINETTO *et al.*, 2022), e a diferenciação em leites UHT desnatados, semidesnatados e integrais, além da degradação dos produtos frente a

armazenamentos sob refrigeração ou à temperatura ambiente (SCANDURRA *et al.*, 2022).

No presente estudo, o objetivo foi explorar as relações entre o teste padrão do álcool/alizarol na avaliação da estabilidade térmica do leite com a EIE como um método alternativo, por meio da especificidade, sensibilidade e acuraria, utilizando de modelos preditivos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de agosto a novembro de 2022, 1657 amostras de leite cru bovino, oriundas de tanques de expansão foram coletadas em fazendas leiteiras no oeste de Santa Catarina, Brasil. As coletas de amostras foram realizadas pelos profissionais responsáveis pela coleta de leite a granel para um laticínio, no momento da realização do teste do álcool/alizarol e imediatamente anterior ao carregamento do leite, conforme a IN 77/2018 (BRASIL, 2018B). As amostras eram acondicionadas em frascos plásticos de 250ml vedados com tampa rosca com septo, armazenados no refrigerador acoplado aos caminhões e transportadas até o laticínio à uma temperatura de 4°C, sem conservantes. Uma vez que os caminhões de coleta de leite a granel retornavam ao laticínio, as amostras eram imediatamente reunidas em uma única caixa isotérmica e transportada até o Laboratório de Nutrição Animal (LANA), da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC Oeste), para realização do teste do álcool, acidez titulável, pH e EIE.

A estabilidade térmica do leite foi definida pela graduação mínima de precipitação da caseína, nas concentrações alcoólicas de 68 a 82% (v/v), com incremento de 2%, pelo teste do álcool (TRONCO, 2010). O preparo e monitoramento das soluções alcoólicas era realizado com um alcoômetro (Alcoômetro Gay Lussac 0/100:1%, 329mm calibrado a 20°C, Incoterm 5683), sendo que a cada bateria de análise as soluções alcoólicas eram verificadas e corrigidas, se necessário. Para análise, eram pipetados 2 ml de leite e em seguida 2 ml de álcool, em placa de Petri, em duplicata. Quando havia a presença dos precipitados de caseína a amostra era classificada como leite instável. Dessa forma, o leite era classificado sempre pela

menor graduação alcoólica em que houve aglomerados de caseínas visíveis (ZANELA *et al.*, 2009).

A determinação do nível de acidez do leite foi baseada na análise de acidez titulável, em graus Dornic (°D). Nesta análise, realizada em duplicata, 10ml de leite eram adicionadas 4 gotas do indicador ácido-básico fenolftaleína 1%. Após homogeneizados, era realizada a titulação com a solução de Dornic até que atingisse uma coloração ligeiramente rósea (ADOLFO LUTZ, 2008), e os resultados expressos em graus Dornic (°D). O pH do leite foi analisado em triplicata com uso de potenciômetro de eletrodo esférico (Alfakit AT355, Florianópolis, BR), submerso em 50ml de leite. Calibrações eram feitas diariamente com soluções pH 4, pH 7 e pH 10, conforme especificações do fabricante. A determinação da densidade do leite foi realizada com uso de termo-lacto-densímetro (15/40x1g/ml 285+5mm calibrado a 20°C, Incoterm 5784.L). Foram considerados valores normais para leite entre 1,027 e 1,033, correspondentes a 20 °C (KAILASAPATHY, 2015).

Quatro classificações do leite são sugeridas, baseadas na proposta de Zanela e Ribeiro (2018), a saber: leite normal = acidez entre 0,14 e 0,18 g/100 ml, considerado com pH entre 6,6 e 6,8; leite ácido = com acidez maior que 0,18 g/100ml, com pH abaixo de 6,6 e; leite alcalino = com acidez menor que 0,14g/100ml e pH acima de 6,8 e LINA = acidez entre 0,14 e 0,18 g/100 ml, considerado com pH entre 6,6 e 6,8 e instável a graduação alcoólica  $\leq 72\%$  (v/v).

A análise de EIE foi realizada em espectrômetro comercial, com sonda híbrida, configurado para explorar 29 frequências, a saber: 2 em baixa (0–50 kHz), 22 em média (50–100 kHz) e 5 em alta frequência (100 kHz á 1 MHz). Os valores obtidos foram dados em impedância real, imaginária, e atraso de fase. As análises foram realizadas em duplicatas, em amostras de 50 mL de leite entre 8 e 15 °C.

#### **4.2.1 Análise estatística**

As amostras foram alocadas, de forma equilibrada de acordo com à estabilidade ao álcool, em 3 bancos de dados denominados banco de treino, validação e teste, na proporção aproximada de 60 (n=1106), 20 (n=271) e 20% (n=280) das amostras, respectivamente. Para cada graduação alcoólica, as amostras do banco de

treino foram submetidas ao modelo preditivo de Árvore de Decisão Impulsionada (*Decision Boosted Tree*) utilizando as variáveis de impedância elétrica e o pH como variáveis preditoras. As amostras do banco de validação foram utilizadas para construir árvores de decisão sequenciais para melhorar o desempenho e a precisão do modelo com a utilização de técnica de aprendizado de máquina, com uma taxa de aprendizado de 0,073.

Cada nó da árvore de decisão foi construído sequencialmente com base na variável preditora com o maior indicador *LogWorth*. O indicador *LogWorth* foi calculado como o logaritmo negativo (base 10) do p-valor obtido da análise de eficácia discriminante entre amostras estáveis e não estáveis usando o par ideal (variável candidata e ponto de corte).

Depois de construir os algoritmos baseados em árvore de decisão, as amostras do banco teste, que não foram utilizadas para a construção do modelo, foram submetidas à predição pelos modelos gerados. Para este trabalho, foi definido sensibilidade como a capacidade de detectar as amostras positivas, ou seja, estáveis a uma determinada graduação alcoólica; e a especificidade a capacidade de detectar amostras não estáveis. Sensibilidade, especificidade e acurácia foram calculados utilizando as equações  $VP/(VP+FN)$ ,  $VN/(VN+FP)$  e  $(VP+VN)/(VP+VN+FP+FN)$ , respectivamente; onde VP, VN, FP e FN correspondem as amostras verdadeiramente positivas, verdadeiramente negativas, falso-positivas e falso negativas, respectivamente. O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi representado pela probabilidade de um leite estável ser realmente estável e o Valor Preditivo Negativo (VPN), probabilidade de um leite instável ser realmente instável. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software JMP Pro (JMP Statistical Discovery LLC).

### 4.3 RESULTADOS

Buscamos com esse estudo explorar a espectroscopia de impedância elétrica como ferramenta de monitoramento da estabilidade térmica de leites de tanque de refrigeração de rebanhos bovinos. As análises de pH e acidez titulável auxiliaram na classificação dos leites e na validação do método. Além disso, utilizamos o padrão de

referência para identificação da estabilidade a campo, teste do álcool/alizarol, e de forma adicional apresentamos estabilidades ou instabilidades dentro de cada classificação proposta, ou seja, em leites normais, ácidos, alcalinos e para o LINA.

*Tabela 2- Precisão diagnóstica de amostras de leite de tanque submetidas ao EIE e teste padrão do álcool*

<b>GA (%)</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Acurácia</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>72</b>	92%	73%	85%	86%	84%
<b>74</b>	87%	81%	84%	83%	85%
<b>76</b>	66%	94%	86%	81%	88%
<b>78</b>	43%	98%	89%	84%	89%
<b>80</b>	50%	99%	94%	81%	95%
<b>82</b>	0%	100%	98%	0%	98%

GA (%): Graduações Alcoólicas; VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo. Fonte: Elaborado pela autora.

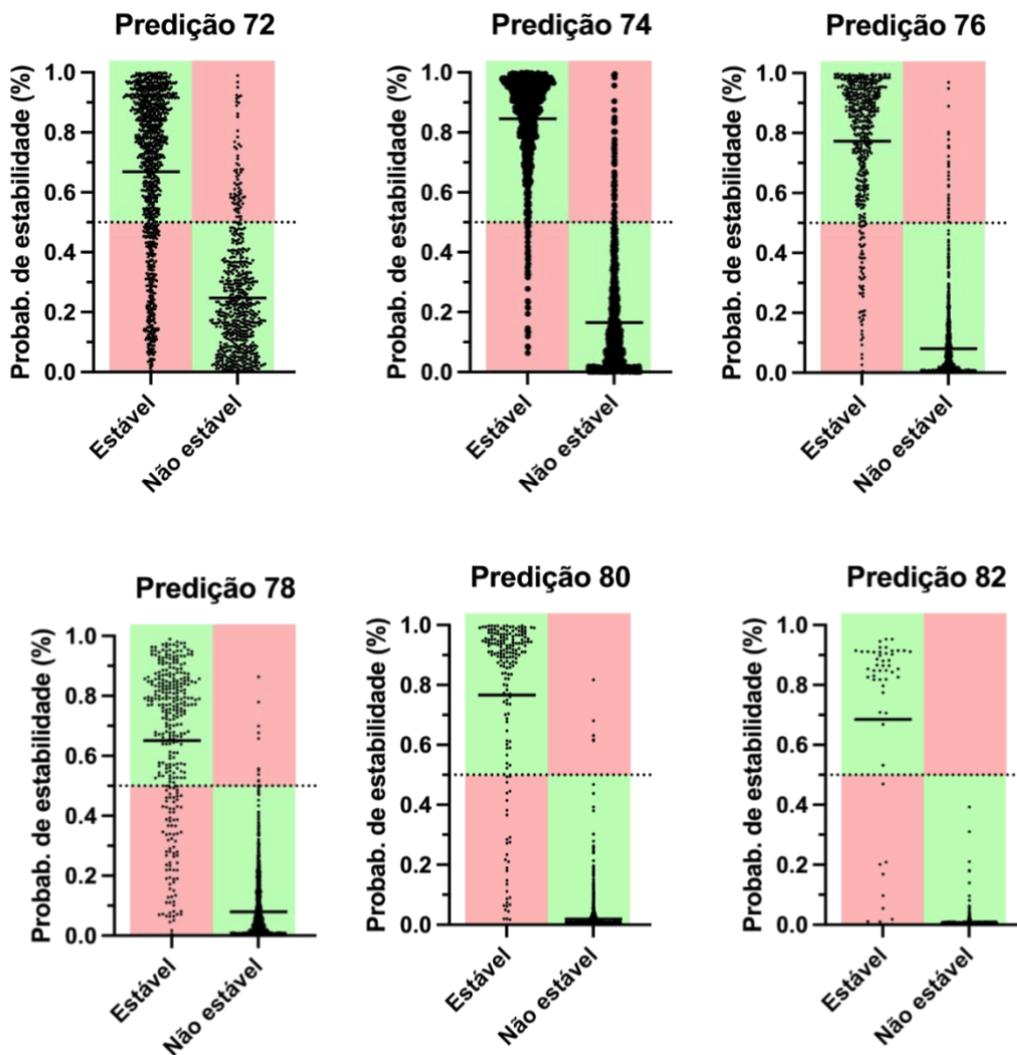
O desempenho do método de avaliação da estabilidade térmica do leite por meio da EIE está descrito na Tabela 2 e diz respeito à parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia, considerando o banco de dados teste (n=280). De forma complementar, na Figura 9, são apresentadas as probabilidades de amostras serem estáveis, de acordo com as previsões dos modelos gerados para cada graduação alcoólica; todavia considerando todo o banco de dados (n=1657).

Ao avaliar a capacidade da EIE em estimar a estabilidade do leite por meio dos modelos preditivos propostos, foi possível observar uma variação entre as graduações alcoólicas (Tabela 2). A variação da sensibilidade demonstra que à medida que os leites foram submetidos a maiores graduações a EIE teve sua capacidade de precisão reduzida, até nula. Por outro lado, a capacidade de acertar as amostras instáveis, representada pela especificidade, variou menos (73% a 100%). No geral, a capacidade de acertar ambas as amostras, ou seja estáveis e instáveis demonstrada pela acurácia, foi alta e variou de 84% a 98%.

Optamos por apresentar os gráficos de dispersão das probabilidades dentro de cada graduação alcoólica considerando todo o banco de dados para permitir a visualização da distribuição total deste banco e suas medianas. Estas medianas indicam que quanto mais afastadas da linha de corte, maior a contribuição para a assertividade do modelo, uma vez que quanto mais próximo das extremidades maior

a sensibilidade (capacidade de acertar as estáveis, quadros verdes superiores à esquerda) ou maior a especificidade (capacidade de acertar as instáveis, quadros verdes inferiores à direita).

*Figura 9 - Probabilidade de estabilidade ao álcool em diferentes graduações alcoólicas (72 a 82) determinada por modelo preditivo de árvore de decisão impulsionada utilizando as variáveis de bioimpedância elétrica e o pH como variáveis predictoras.*



Cada ponto representa uma unidade experimental e a linha contínua horizontal representa a mediana. A linha pontilhada horizontal indica o ponto de corte para estimar uma amostra como estável ( $\geq 0,5$ ) ou não ( $< 0,5$ ). Unidades experimentais localizadas na área verde indicam predição correta pelo modelo enquanto na área vermelha indicam um falso diagnóstico. Fonte: Elaborado pela autora.

*Tabela 3 - Precisão diagnóstica de amostras de leite de tanque submetidas ao EIE e teste padrão do álcool, por classificação*

<b>Classificação</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Acurácia</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
Graduação alcoólica 72%					
<b>Acido</b>	93%	79%	86%	82%	92%
<b>Alcalino</b>	100%	-	100%	100%	-
<b>Lina</b>	-	71%	71%	0%	100%
<b>Normal</b>	91%	-	91%	100%	0%
Graduação alcoólica 74%					
<b>Acido</b>	96%	88%	92%	86%	97%
<b>Alcalino</b>	100%	-	100%	100%	-
<b>Lina</b>	-	83%	83%	0%	100%
<b>Normal</b>	83%	69%	80%	91%	53%
Graduação alcoólica 76%					
<b>Acido</b>	88%	100%	97%	100%	96%
<b>Alcalino</b>	63%	100%	79%	100%	67%
<b>Lina</b>	-	93%	93%	0%	100%
<b>Normal</b>	60%	91%	79%	83%	77%
Graduação alcoólica 78%					
<b>Acido</b>	53%	98%	86%	89%	86%
<b>Alcalino</b>	50%	100%	86%	100%	83%
<b>Lina</b>	-	100%	100%	-	100%
<b>Normal</b>	37%	97%	84%	79%	84%
Graduação alcoólica 80%					
<b>Acido</b>	67%	96%	90%	80%	92%
<b>Alcalino</b>	100%	91%	93%	75%	100%
<b>Lina</b>	-	100%	100%	-	100%
<b>Normal</b>	18%	100%	93%	100%	93%
Graduação alcoólica 82%					
<b>Acido</b>	0%	100%	93%	-	93%
<b>Alcalino</b>	0%	100%	93%	-	93%
<b>Lina</b>	-	100%	100%	-	100%
<b>Normal</b>	0%	100%	99%	-	99%

VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo. Fonte: Elaborado pela autora.

Quando classificado os leites em normal, ácido, LINA e alcalino é possível observar diferentes assertividades dentro de cada graduação alcoólica (Tabela 3). Na classificação de leites ácidos foram observadas amostras instáveis, mas também estáveis nas seis graduações alcoólicas estudadas. A sensibilidade de predição pelos modelos para leites ácidos variou de 0% a 96%, e foi maior para graduações alcoólicas

menores. A especificidade nas amostras ácidas variou de 79% a 100% e a acurácia 86% a 97%.

O leite normal apresentou variação de sensibilidade entre 0 e 91%, especificidade de 69 a 100% e acurácia de 79 a 99%. Por sua vez os leites alcalinos, apresentaram variação de 0 a 100% para sensibilidade e 92% a 100% especificidade e acurácia uma variação de 86% a 100%. A EIE e os modelos propostos foram capazes de discriminar e de acertar de 71% a 100% dos leites classificados como LINA, sendo que nas graduações alcoólicas de 78, 80 e 82% o acerto foi de 100%.

As análises realizadas apresentaram resultados variados VPP e VPN em relação às diferentes graduações alcoólicas do leite. Os VPP variaram de 0% a 86%, enquanto os VPN variaram de 84% a 98%. Ao analisar as graduações específicas dentro das classificações, verificou-se que para o leite ácido os VPP variaram de 80% a 100%, enquanto para o leite alcalino os valores situaram-se entre 75% e 100%. No caso do leite classificado como normal, os VPP variaram de 79% a 100%. Por outro lado, para a classificação de LINA (Leite Instável Não Ácido), não foi possível obter um VPP, uma vez que o LINA é instável.

Em relação aos VPN, para o leite ácido, os valores variaram de 86% a 97%. Para o leite alcalino, os VPN situaram-se entre 67% e 100%. Já para o leite classificado como normal, os valores de VPN variaram de 55% a 99%. Notavelmente, para a classificação de LINA, o valor de VPN foi de 100%.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Com o intuito de captar leite de qualidade, alguns países emergentes utilizam a estabilidade do leite ao álcool, pelo teste do álcool/alizarol, como ferramenta de seleção de leite cru. Por se tratar de um teste simples, barato e rápido é possível detectar acidez do leite e aprovar ou não o carregamento de um tanque de resfriamento. No entanto, estes testes, possuem fragilidades que devem ser consideradas. A primeira diz respeito a subjetividade, pois depende da percepção visual do observador (formação dos precipitados de caseína e tons de cor da alizarina), que pode levar a diferentes interpretações. E a segunda refere-se a base de detecção, que no teste do alizarol, baseia-se no pH, no entanto outros fatores

podem contribuir para a instabilidade do leite. Sendo assim, nem sempre amostras que coagulam ao teste do álcool, estão exclusivamente ligadas a leites ácidos.

Alguns dos fatores que contribuem para a instabilidade do leite estão ligados a desequilíbrios no sistema de produção, ou seja, estresse térmico, estresse alimentar, mudanças na alimentação ou outras fontes (ZANELA *et al.*, 2009). Essas situações levam a vaca a produzir leite instável sem que haja acidificação, denominado Leites Instável não Ácido (LINA) que pode ser confundido pelos testes padrões e levar a falso-positivo e posterior recusa da carga de leite pela indústria

No relatório publicado pelo MAPA (2018) com finalidade de abertura de discussão da Instrução Normativa que estabelece os critérios de seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial no Brasil, foi proposto pela Câmara Setorial da Cadeia Produtiva do Leite e Derivados que outros testes venham substituir o teste padrão, a fim de resguardar o produtor de possíveis descartes de leite de forma desnecessária, respaldada principalmente por Fagnani *et al.* (2016) pois este não encontrou relação entre pH, acidez titulável em amostras LINA, tornando o teste do álcool, um indicador não confiável para analisar a qualidade do leite.

A melhoria contínua da qualidade do leite, uso de tecnologias mais assertivas e que não geram dúvidas auxiliam na tomada de decisão e diminuem descartes indevidos de cargas de leite próprias para o consumo, que de acordo com Magri, (2015) podem chegar a 30% de perdas apontadas como leite ácido (erroneamente classificados). Dessa forma a EIE, mostrou-se eficiente para identificar leites estáveis, principalmente na graduação mínima de 72% (v/v), preconizada por muitos países, principalmente o Brasil. O contrário também é válido, pois caso uma indústria aumente o teor alcoólico, para teoricamente selecionar leites de melhor qualidade, a EIE seria capaz de estimar a instabilidade nestas graduações (>76% v/v) com boa assertividade.

A média/alta sensibilidade encontrada nos álcoois 72 e 74% (v/v) demonstra que o método é capaz de detectar corretamente a grande maioria dos casos de leites estáveis. Isso significa que há uma baixa probabilidade de falsos negativo, ou seja, de classificar erroneamente o leite estável como instável. Isso é positivo, pois garante uma detecção confiável da instabilidade. Da mesma forma, a alta especificidade

encontrada nas graduações alcoólicas 76 a 82%, indica baixa probabilidade de falsos positivos.

A taxa geral de acertos do teste, acurácia considera os verdadeiros positivos e os verdadeiros negativos em relação ao teste padrão. Essa taxa representa a proporção de casos corretamente classificados em relação ao total de casos analisados. No geral, a acurácia se concentrou em valores acima de 80%. No âmbito das análises de interesse parece ser adequado.

Por mais que sejam necessários mais ajustes no método, é possível que EIE seja eficiente na identificação do LINA, levando em consideração a acurácia de 100% em várias graduações alcoólicas e o VPP de 100% em todas as graduações estudadas. Os resultados obtidos com a EIE na identificação do LINA são encorajadores. O fato de o equipamento ter alcançado um VPN de 100% dentro de um intervalo específico de graduações alcoólicas (72% até 82% com acréscimo de 2%) indica que essa tecnologia possui capacidade de identificar corretamente o LINA nessas amostras.

Entender como o leite se comporta diante de várias classificações, auxilia na compreensão da homogeneidade da matéria prima. O leite normal é levemente ácido e mudanças sutis, levam a maior acidificação e instabilidade. no entanto encontramos leites ácidos estáveis, bem como leites alcalinos instáveis. Esses achados não eram esperados, mas nos fazem refletir ainda mais sobre os efeitos do ambiente na composição e qualidade do leite. O Lina, quando identificado e analisado pela EIE apresentou boa especificidade. Os resultados positivos encontrados nas nossas condições experimentais indicam que esta metodologia tem potencial para classificar leites LINA, que hoje são um problema para a indústria leiteira e produtor rural.

Durante a condução do nosso estudo, nos deparamos com algumas limitações e dificuldades que podem influenciar a interpretação dos resultados. É importante mencionar essas limitações para fornecer um contexto completo e uma compreensão mais precisa das informações obtidas. Uma das limitações enfrentadas está relacionada ao modelo utilizado para analisar os leites. O modelo foi desenvolvido para trabalhar com leites em condições laboratoriais controladas, o que pode diferir das condições reais de coleta do leite. Isso pode resultar em uma discrepância entre os resultados obtidos em nosso estudo e a situação prática.

Outra limitação a ser considerada é que as coletas de leite não foram acompanhadas por membros da equipe de pesquisa. Embora tenhamos buscado uma padronização rigorosa dos procedimentos de coleta, a ausência de um acompanhamento direto pode introduzir erros amostrais e afetar a representatividade dos dados. É importante reconhecer essa limitação e estar ciente de que os resultados podem ser influenciados por essa variabilidade.

Além disso, é relevante ressaltar que análises realizadas em laboratório podem não refletir completamente a realidade das condições de campo e transporte do leite. O monitoramento em nível de campo, incluindo a análise das amostras coletadas diretamente de caminhões de transporte, pode proporcionar uma maior assertividade e uma visão mais precisa das condições reais do leite. Futuros estudos devem considerar essas limitações e buscar formas de superá-las para um melhor entendimento da estabilidade do leite e a aplicação de métodos de análise mais precisos e adequados.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Os métodos de prever a estabilidade utilizando a EIE, apresentam resultados promissores. Uma vez que no geral os modelos apresentaram uma acurácia acima de 80% para as graduações alcoólicas. Além disso, os modelos foram capazes de discriminar e acertar entre 71% e 100% dos LINA, com uma taxa de acerto de 100% nas graduações alcoólicas acima de 78%. Isso mostra que essa tecnologia pode ser uma ferramenta eficaz na análise e predição da estabilidade do leite e principalmente uma ferramenta para diferenciar leite instável por acidificação de LINA e substituir o tradicional teste do álcool.

Os resultados indicam potencial de utilização. Além disso, a EIE é rápida, não destrutiva e possui potencial para automatização. A aplicação dessa tecnologia pode trazer avanços significativos na avaliação da estabilidade térmica do leite, beneficiando a indústria e os produtores.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, podemos chegar a algumas conclusões importantes sobre a estabilidade do leite, as graduações alcoólicas,  $Ca_i$  e a utilização da EIE para prever a estabilidade. No que diz respeito às graduações alcoólicas, observamos que a estabilidade do leite pode variar ao longo dos meses, o que indica a importância de considerar a sazonalidade na avaliação da qualidade. Além disso, constatamos que a graduação alcoólica de 76% (v/v) pode ser utilizada como um critério confiável para selecionar leites de qualidade.

Verificamos que leites mais instáveis tendem a apresentar um maior teor de  $Ca_i$ . Isso sugere uma relação entre o  $Ca_i$  e a estabilidade do leite, indicando que esse parâmetro pode ser utilizado como um indicativo da qualidade e estabilidade do produto. Por outro lado, constatamos que o LINA não apresenta diferença significativa nos teores de  $Ca_i$  em comparação com o leite normal. Isso sugere que outros fatores, além do  $Ca_i$ , estão envolvidos na instabilidade do LINA.

Quanto aos métodos de prever a estabilidade utilizando a EIE, observamos resultados promissores. Uma vez que no geral os modelos apresentaram uma acurácia acima de 80% para as graduações alcoólicas. Além disso, os modelos foram capazes de discriminar e acertar entre 71% e 100% dos LINA, com uma taxa de acerto de 100% nas graduações alcoólicas acima de 78%. Isso mostra que essa tecnologia pode ser uma ferramenta eficaz na análise e predição da estabilidade do leite e principalmente uma ferramenta para diferenciar leite instável por acidificação de LINA e substituir o tradicional teste do álcool.

Esses resultados destacam a importância do  $Ca_i$  como um indicador da estabilidade do leite e fornecem evidências encorajadoras sobre o potencial da EIE como uma alternativa aos métodos tradicionais. Com o avanço dessas pesquisas, espera-se que essas descobertas contribuam para melhorar a seleção, qualidade do leite e fornecem uma base sólida para futuras pesquisas e avanços na área da estabilidade do leite, visando garantir a qualidade e segurança do produto para a indústria láctea.

## REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz 4ed, São Paulo, BR, 2008.

AKKERMAN, M.; LARSEN, L. B.; SØRENSEN, J.; POULSEN, N. A. Natural variations of citrate and calcium in milk and their effects on milk processing properties. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6830–6841, 2019.

BARBOSA, R. S.; VON HAUSEN, L. J. O.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; BARBOSA SILVEIRA, I. D.; BONO, G.; BARROS, L. Método de armazenamento de leite para determinação de cálcio iônico. **Archivos de Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 621–624, 2009.

BRASIL. **IN 51 Instrução Normativa 51** - Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C [...] Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. MAPA, BR 2002.

BRASIL. **IN 62 Instrução Normativa 62** - Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, MAPA, BR 2011.

BRASIL. **IN 76 Instrução Normativa 76**. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. MAPA, BR, 2018A

BRASIL. **IN 77 Instrução Normativa 77**. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. MAPA, BR, 2018B.

CHANDAN, R. C.; PATEL, D. A.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Mammary Gland and Milk Biosynthesis: Nature's Virtual Bioprocessing Factory. Em: CHANDAN, R. C.; KILARA, A.; SHAH, N. P. **Dairy Processing and Quality Assurance**. Second Edition. 2. ed. [s.l: s.n.]p. 60–76, 2015

CHAVEZ, M. S.; NEGRI, L. M.; TAVERNA, M. A. E.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**. V. 71 pp. 201–6, 2003.

CHEN B, LEWIS M J E GRANDISON A S. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. **Food Chemistry**. V. 158, pp. 216–23, 2014.

CHRISTIANNONSON, G.; JENNESS, R.; COULTER, S. T. Determination of ionic calcium and magnesium in milk. **Analytical Chemistry**, v. 26, p. 1923–1927, 1954.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2265–2272, 2011.

DARLING, D. F.; DICKSON, J. The determination of the zeta potential of casein micelles. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n. 2, p. 329–332, 1979.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. Em: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. 3. ed. Boston, MA: Springer US. p. 233–276, 2003.

DE LA FUENTE, M. A.; BELLOQUE, J.; JUÁREZ, M. Mineral contents and distribution between the soluble and the micellar phases in calcium-enriched UHT milks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 13, p. 1708–1714, 2004.

DURANTE, G.; BECARI, W.; LIMA, F. A. S.; PERES, H. E. M. Electrical Impedance Sensor for Real-Time Detection of Bovine Milk Adulteration. **IEEE Sensors Journal**, v. 16, n. 4, p. 861–865, 2016.

FARIA, P. F.; RANGEL, A. H. N.; ANTAS, U. S. *et al.* Unstable milk occurrence in the semi-arid region and its relation with the physico-chemical characteristics of milk. **Livestock Research for Rural Development**. V. 29, p. 1-8, 2017.

FAGNANI, R.; BATTAGLINI, A. P. P.; BELOTI, V. *et al.* Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável? **Ciência Animal Brasileira**. V. 17, n. 3, p. 386-394, 2016.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: Um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 838–849, 2012.

FONSECA, D. C. M. Compostamento alimentar, metabolismo ruminal e estabilidade do leite de vacas alimentadas com milho floculado e diferentes níveis de degradabilidade. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, Pirassununga, BR, 2018.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. *et al.* Enzymatic Coagulation of Milk. **Fundamentals of Cheese Science**. Springer, Boston, MA 185–229, 2017.

FOX P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H. *et al.* Milk proteins. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Springer, Cham, Switzerland 145–239, 2003.

GAUCHERON, F. **The minerals of milk**. *Reproduction Nutrition Development*. V.45, pp. 473–83, 2005.

GELLER, A.; AYRES, L.; CARVALHO, C. *et al.* Escaneamento por bioimpedância elétrica em leite: explorando a técnica. Em: **Ciência, Tecnologia e Inovação: do campo à mesa, 2020**, [...]. Instituto internacional Despertando Vocações, 2020.

GOULART, J. Q; PICCININI, A.; PINTO, A. T. Caracterização do queijo fresco produzidos a com leite de diferentes graus de estabilidade ao etanol. **Revista Pubvet**, v. 13, p. 1–7, 2019.

GRIMLEY, H.; GRANDISON, A. E.; LEWIS, M. Changes in milk composition and processing properties during the spring flush period. **Dairy Science and Technology**. V. 89, p. 405–16, 2009.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, Ø. G. **Bioimpedance and Bioelectricity Basics**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Academic Press 2014, p. 22–29, 2014.

GUINEE, T. P. E.; O'KENNEDY, B. T. The effect of calcium content of Cheddar-style cheese on the biochemical and rheological properties of processed cheese. **Dairy Science and Technology**, v. 89, p. 317–33, 2009.

HERNANDEZ, R.; PONCE, P. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, v. 23, p. 295–310, 2005.

HOLT, C.; DALGLEISH, D. G. Electrophoretic and hydrodynamic properties of bovine casein micelles interpreted in terms of particles with an outer hairy layer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 114, n. 2, p. 513–524, 1986.

HOLT, C.; SAWYER, L. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the  $\alpha$  S1 -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.**, v. 89, n. 15, p. 2683–2692, 1993.

HORNE, D. S. Ethanol stability and milk composition. In: **Advanced Dairy Chemistry - Proteins: Applied aspects**. 4th edn, vol. 1B, pp 225-246. McSweeney P L H e O'Mahony J A, Springer New York, New York, NY, 2016.

HORNE, D. S. Casein micelle structure and stability. In: **Milk Proteins - From Expression to Food**, 1st edn, p. 213–50. Thompson A, Boland M, Singh H, Elsevier, Massey University, NZ, 2020.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3613–3626, 1990.

HUPPERTZ, T. Heat Stability of Milk. Em: **Advanced Dairy Chemistry**. New York, NY: Springer New York, 2016. p. 179–196.

KAILASAPATHY, K. Chemical Composition, Physical, and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients. In: **Dairy Processing and Quality Assurance**, 2th edn, pp. 77–105. Ramesh C, Chandan A K e Nagendra P S C, John Wiley & Sons, UK, 2015

KARLSSON, M. A.; LUNDH, Å.; INNINGS, F. *et al.* The Effect of Calcium, Citrate, and Urea on the Stability of Ultra-High Temperature Treated Milk: A Full Factorial Designed Study. **Foods**. V.8, p. 418, 2019.

KRISHNA, T.C.; NAJDA, A.; BAINS, A. et al. Influence of Ultra-Heat Treatment on Properties of Milk Proteins. **Polymers**. V. 13, p. 3164, 2021.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 64, n. 1, p. 1–13, 2011.

LI, S.; YE, A. E.; SINGH, H. Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. **Journal of Dairy Science**. V. 102, p. 7747–59, 2019.

LIN, M. J. **Measurement of ionic calcium and its role in milk stability**. Tese de doutorado. University of Reading. School of Food Biosciences, 2002.

LIN, M.J.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**. v. 59, n. 3, p. 192–199, 2006.

MACDONALD, J. R.; JOHNSON, W. B. Fundamentals of Impedance Spectroscopy. Em: **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications** BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R.. 2. ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 1–20, 2018.

MACHADO, S. C.; FISCHER, V.; STUMPF, M. T. *et al.* Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, p. 340–7, 2017.

MAGRI, L. P. **Quantificação de acidez titulável e ph utilizando técnica potenciométrica como indicador de qualidade do leite bovino**. *Dissertação de mestrado*. Ciência e tecnologia em leite e derivados, 2015.

MANSKE, G. A.; DANIELI, B.; ZUFFO, G. R. *et al.* Ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades comerciais da região Extremo Oeste de Santa Catarina. **Research, Society and Development**. v.9, p.1-18, 2020.

MAPA. **Consulta Pública da Instrução Normativa**, Portaria 39, de 19 de abril de 2018, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/leite-e-derivados/2018/12are/contribuicoes-portaria-39-final.pdf>. Acesso em: 28 de jun. 2023.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B. *et al.* Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 91–97, 2007.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, K. C. *et al.* Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**. V. 98, p. 2650–61, 2015.

MARTINS, F. A. **Caracterização de variáveis relacionadas com a estabilidade do leite bovino**. Dissertação de mestrado (Zootecnia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, BR, 2022.

MARTINS, C. M. M. R.; VEIGA, E. A.; FRIZON, R. *et al.* Evaluation of electrical bioimpedance spectroscopy in estimate the milk composition, SCC and Milk Ethanol Stability – Preliminary results. Em: **ADSA Annual Meeting, 2017**, Pittsburgh. [...]. Pittsburgh: American Dairy Science Association, p. 46–46, 2017.

MCMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions. Em: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. **Advanced Dairy Chemistry—Proteins Basic Aspects**. 4. ed. Boston, MA: Springer US, 2013. p. 185–209.

MINETTO, T. A.; FRANÇA, B. D.; DARIZ, G. S. *et al.* Identifying adulteration of raw bovine milk with urea through electrochemical impedance spectroscopy coupled with chemometric techniques. **Food Chemistry**, V. 386, 2022.

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

NEVES, T. F. F. **Estabilidade do leite: características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças holandesa e jersey**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Ponta Grossa: UEPG. 81p, 2021.

NIAN, Y.; CHEN, B. Y.; AIKMAN, P. *et al.* Naturally occurring variations in milk pH and ionic calcium and their effects on some properties and processing characteristics of milk. **International Journal of Dairy Technology**. V. 65, p. 490–7, 2012.

O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T. *et al.* Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**. V. 73, p. 312–7, 2006.

O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The Two-Stage Coagulation of Milk Proteins in the Minimum of the Heat Coagulation Time-pH Profile of Milk: Effect of Casein Micelle Size. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 378–386, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F.; LOPES, L. C.; FRANCO, R. C. *et al.* Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. V.12, p. 508-515, 2011.

OLIVEIRA, J. T. **Distribuição estacional de forragem, valor nutritivo e rendimento de grãos de cereais de inverno de duplo-propósito**. Dissertação de mestrado, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2009.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leites sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de ciências Veterinárias**, v. 102, p. 561–562, 2007.

OLIVEIRA, L. R.; MATHIAS, A. D.; PINTO, M. S. *et al.* Sazonalidade e rotas de coleta influenciam a ocorrência de leite instável não ácido, a densidade e a crioscopia do leite fornecido a um laticínio no Norte de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 72, p. 1522–1534, 2020.

ONG, L.; DAGASTINE, R. R.; KENTISH, S. E. *et al.* The effect of calcium chloride addition on the microstructure and composition of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**. 33 135–41, 2013.

PINHEIRO, J. S.; ROCHA, L. G.; DE ANDRADE, D. R. R. Unveiling unstable non-acid incidence in Holstein cows fed with corn silage or sugarcane. **Journal of Dairy Science**. V.105, p. 9226–39, 2022.

PLIQUETT, U. Bioimpedance: A Review for Food Processing. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 2, p. 74–94, 2010.

POULSEN, N. A.; GLANTZ, M.; ROSENGAARD, A. K. *et al.* Comparison of milk protein composition and rennet coagulation properties in native Swedish dairy cow breeds and high-yielding Swedish Red cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p. 8722–34, 2017.

RADFORD, S. J.; DICKINSON, E.; GOLDING, M. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and alcohol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 274, n. 2, p. 673–686, 2004.

ROSE, D.; TESSIER, H. Composition of ultrafiltrates from milk heated at 80 to 230 °C in relation to heat stability. **Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 969–980, 1959.

SANDRA, S.; HO, M.; ALEXANDER, M. *et al.* Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 75–82, 2012.

SANTOS, S. A.; SILVA, A. S.; SANTOS, M. A. J. *et al.* **Avaliação físico-química de leite bovino utilizando pó de repolho roxo (Brassica leracea var. Capitala)**. 53 Congresso Brasileiro de Química, v. Rio de Janeiro, 2013.

SCANDURRA, G.; CARDILLO, E.; CIOFI, C. *et al.* UHT Milk Characterization by Electrical Impedance Spectroscopy. **Applied Sciences**. V.12, p.7559, 2022.

SCHUMACHER, L. L.; VIÉGAS, J.; NAETZOLD, S. *et al.* Use of electrical bioimpedance analysis to evaluate the quality of bovine raw milk. **South African Journal of Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 727, 2019.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. *et al.* Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. 67 55-60, 2012.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. *et al.* Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

SINAGA, H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Effects of milk pH alteration on casein micelle size and gelation properties of milk. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 1, p. 179–197, 2017.

SOUTELINO, M. E. M.; VALLE, M. D.; SANTOS, H. K. M, *et al.* Occurrence of unstable non-acid milk in dairy farms in northern Tocantins state, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.16, p. 95–100, 2022.

SUNDEKILDE, U. K.; FREDERIKSEN, P. D.; CLAUSEN, M. R. *et al.* Relationship between the Metabolite Profile and Technological Properties of Bovine Milk from Two Dairy Breeds Elucidated by NMR-Based Metabolomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7360–7367, 2011.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. Em: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. 3. ed. Boston, MA: Springer US, p. 139–187, 2003.

TAKA, E. N. **Transvarredura por bioimpedância: uma ferramenta para detecção precoce de câncer de mama em mulheres jovens 2008**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 4. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 208 p., 2010.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J. E.; GRANDISON, A. S. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows Milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.167–73.

VEIGA, E. A.; BERTEMES-FILHO, P. Bioelectrical impedance analysis of bovine milk fat. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 407, p. 012009, 2012.

WALSTRA, P. Physical Chemistry of Foods. [s.l.] **CRC Press**, 2002.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, Second Edition. 2. ed. Flórida: Food Science and Technology, 63–84 p. 2005.

WANG, G. HOLDER DAVID, S. Electrical Impedance Tomography. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 4, n. 1, p. 27, 2005.

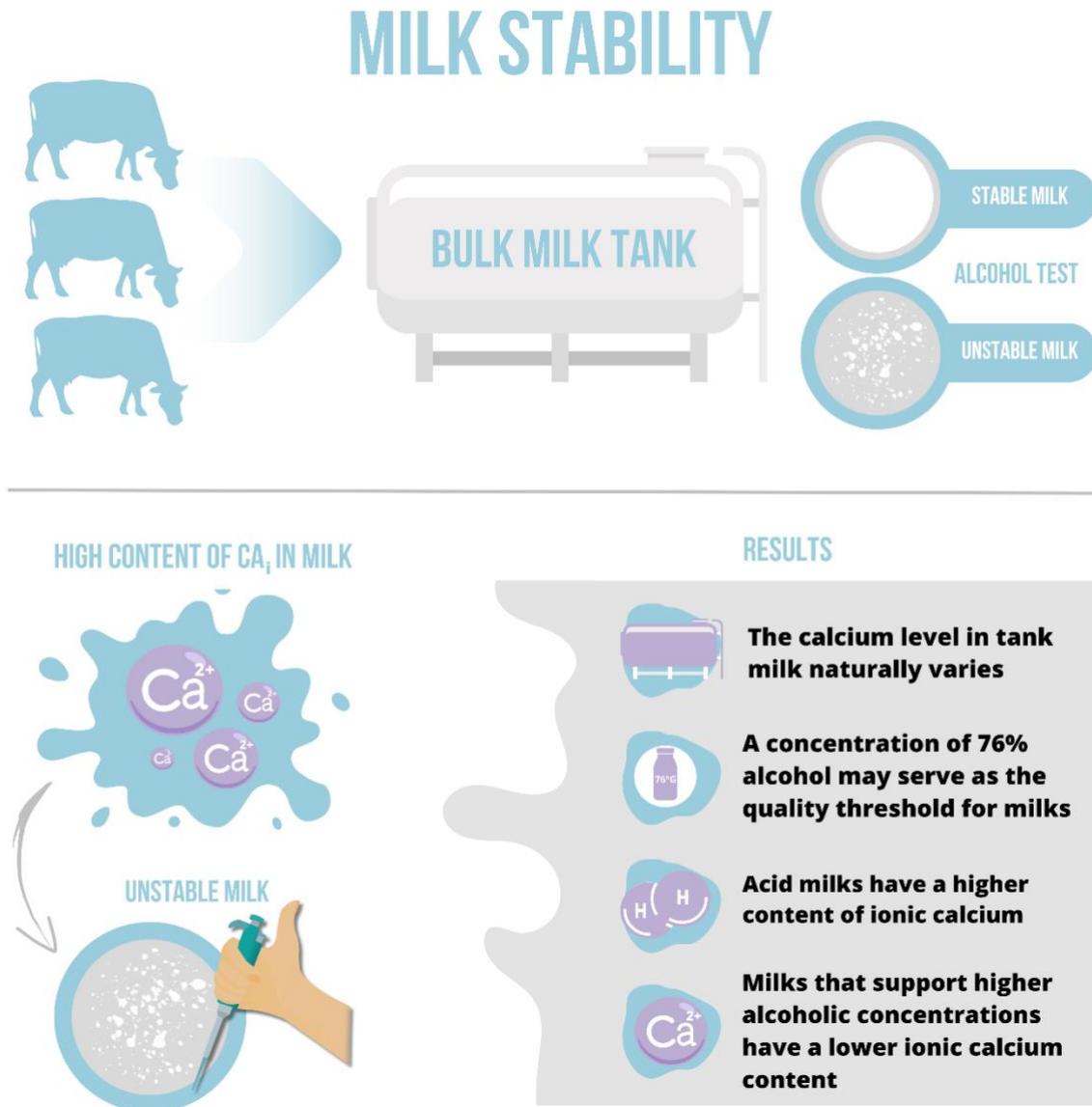
WHITE, J. C. D. e DAVIES, D. T. 712 The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: I. General introduction, description of samples, methods and chemical composition of samples. **Journal of Dairy Research**, v. 25, p. 236–55, 1958.

WU, Y.; FAN, D.; HANG, F.; YAN, B.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Effect of Calcium on Absorption Properties and Thermal Stability of Milk during Microwave Heating. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1747, 2018.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R. **LINA - Leite Instável Não Ácido**. Comunicado Técnico (356), EMBRAPA. Pelotas, RS, 2018.

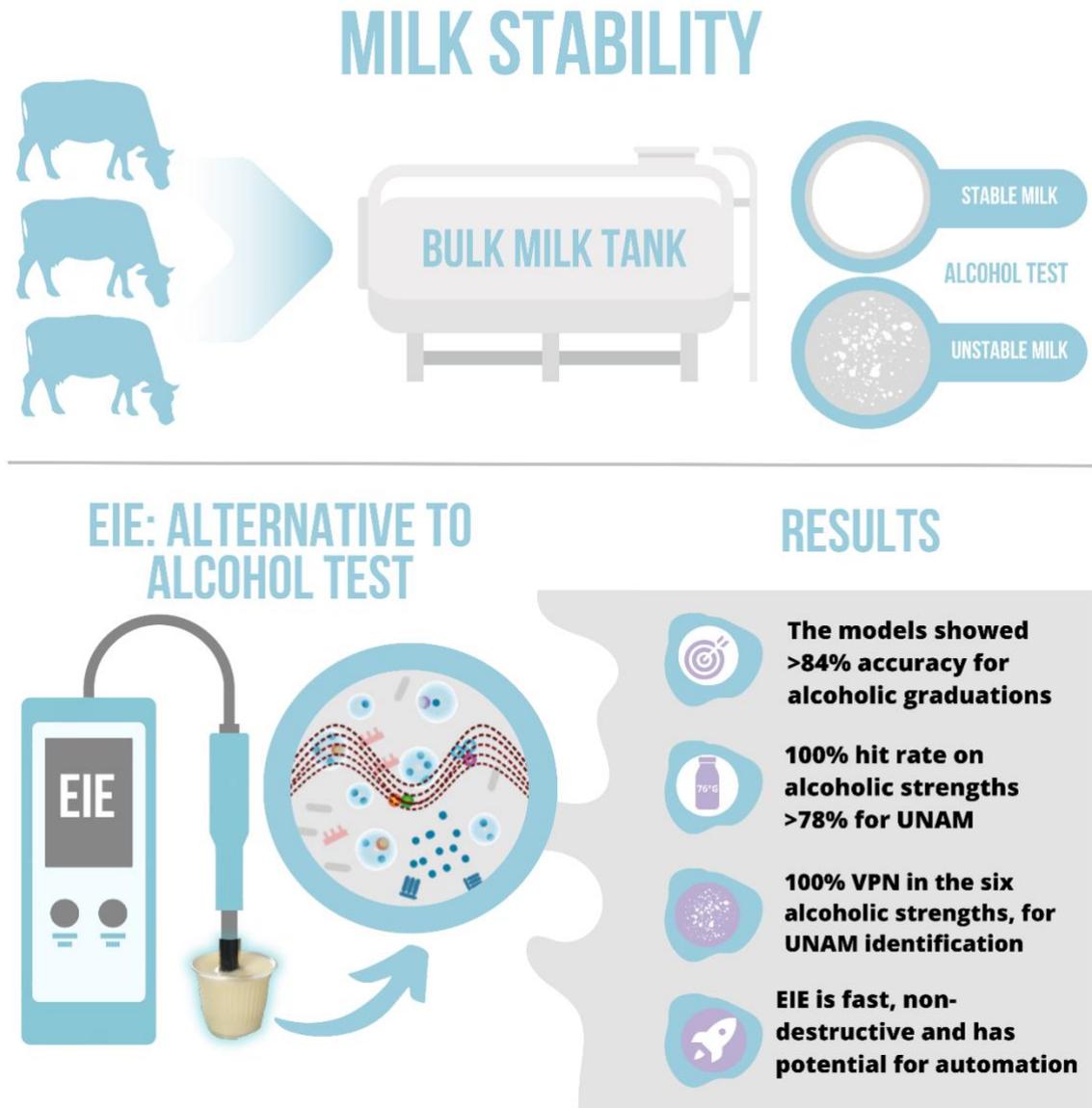
ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. *et al.* Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1009–1013, 2009

## ANEXO A – RESUMO GRÁFICO DO ARTIGO 1



Fonte: Elaborado pela autora

## ANEXO B – RESUMO GRÁFICO ARTIGO 2



Fonte: Elaborado pela autora