

Efeito da temperatura das amostras de leite na concentração de cálcio solúvel e de beta-caseína: interferência no teste de estabilidade frente ao etanol

[Effect of milk sample temperature on the concentration of soluble calcium and beta-casein: interference with the ethanol stability test]

F.F. Costa¹, M.A.V.P. Brito^{2*}, G.N. Souza², D.B.C. Pereira⁴, I.S.B. Pinto^{2,3}, M.F. Martins²

¹Faculdade de Farmácia e Bioquímica – Universidade Federal de Juiz de Fora – Governador Valadares, MG

²Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG

³Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa – BAT II - FAPEMIG

⁴Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG – Juiz de Fora, MG

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação do perfil proteico e do cálcio solúvel na coagulação do leite pelo etanol nas temperaturas de 4°C, 10°C, 15°C e 20°C. Amostras de leite de 61 animais foram avaliadas quanto à estabilidade ao etanol nas concentrações de 66 a 92% (v/v) nas temperaturas de 4°C, 10°C, 15°C e 20°C. Três amostras, após 24 horas de armazenamento a 4°C, foram ultracentrifugadas em quadruplicata (40.000 x g) a 4°C e a 20°C, respectivamente, por 60 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e submetido à análise do cálcio solúvel pela técnica via úmida (digestão nitroperclórica) e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica. O perfil proteico foi analisado pela técnica de eletroforese capilar empregando *kit* específico para determinação proteica. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre o aumento da temperatura das amostras e a estabilidade do leite frente às diferentes concentrações de etanol. A porcentagem de cálcio solúvel no sobrenadante após ultracentrifugação foi maior nas amostras tratadas a 4°C ($P < 0,05$). As amostras ultracentrifugadas na temperatura de 4°C apresentaram quantidades superiores de β -caseína no sobrenadante em comparação com as amostras tratadas a 20°C. O abaixamento da temperatura favoreceu a migração da β -caseína e do cálcio coloidal para a fase solúvel do leite, o que possivelmente favoreceu o aumento da instabilidade das amostras no teste do etanol. Os resultados sugerem que a temperatura ideal para a realização de teste de estabilidade do leite frente ao etanol deveria ser de 21°C.

Palavras-chave: temperatura do leite, etanol, cálcio, β -caseína, eletroforese

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the variation in protein profile and soluble calcium in milk coagulation by ethanol at 4°C, 10°C, 15°C and 20°C. Milk samples from 61 dairy cows were evaluated for stability of ethanol concentrations from 66 to 92% (v/v) at temperatures of 4°C, 10°C, 15°C and 20°C. Three samples were ultracentrifuged (40,000 x g) after 24 hours of storage at 4°C and 20°C, respectively, for 60 minutes. Their supernatants were removed and subjected to analyses of soluble calcium through nitro-perchloric digestion and atomic absorption spectrophotometry. The protein profiles were determined by capillary electrophoresis using a specific kit for protein determination. The results showed a positive correlation between the increase in temperature of the samples and the stability of milk against various concentrations of ethanol. The percentage of soluble calcium in the supernatant after centrifugation was higher in samples treated at 4°C ($P < 0.05$). The samples ultracentrifuged at 4°C showed higher amounts of β -casein in the supernatant compared with samples stored at 20°C. The lowering of the temperature favored the migration of β -casein and colloidal calcium to the soluble phase of milk, which may also have favored the instability of milk in the ethanol test. According to the results, the milk sample temperature for the ethanol stability test should be 21°C.

Keywords: milk temperature, ethanol, calcium, β -casein, electrophoresis

Recebido em 4 de fevereiro de 2013

Aceito em 20 de agosto de 2013

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: maria.brito@embrapa.br

INTRODUÇÃO

O teste da estabilidade do leite ao álcool (etanol) foi introduzido por volta de 1890, na Alemanha, para avaliar a presença de acidez desenvolvida por contaminação bacteriana, quando não era comum o uso de refrigeração para a conservação do leite (Ayers e Johnson, 1915). Posteriormente, a aplicação desse teste com essa finalidade foi abandonada, devido à melhora na qualidade microbiológica e porque problemas na estabilidade do leite associados à estação do ano, dieta e estágio da lactação e saúde da glândula mamária foram reconhecidos (Horne, 2003).

Os estudos pioneiros sobre as variações da estabilidade do leite bovino no teste do álcool, em pH normal, foram feitos com amostras de leite de diversos rebanhos leiteiros (Davies e White, 1958; Donnely e Horne, 1986). Verificou-se que amostras de leite de vacas individuais apresentaram coagulação em soluções de etanol variando em concentrações de 66 a 90% (v/v). Os fatores que mais contribuíram para a variação da estabilidade ao etanol foram os altos balanços de sais solúveis no final da lactação e o baixo pH natural do leite no início da lactação. Demonstrou-se que as amostras de leite com alta concentração de cálcio iônico foram menos estáveis ao teste do etanol (Davies e White, 1958). Posteriormente, foi comprovado que a coagulação do leite pelo álcool é afetada pela concentração dos sais minerais (Horne e Muir, 1990). A adição de pequenas quantidades de cloreto de cálcio e magnésio torna o leite menos estável, coagulando em concentrações alcoólicas mais baixas, enquanto sais de citrato de sódio e de fosfato de sódio causam o efeito oposto (Turnier e De Kruif, 2002; Horne, 2003; Tsioulpas *et al.*, 2007).

Diversos estudos (Creamer *et al.*, 1977; Ali *et al.*, 1980; Davies e Law, 1983; O'Connell *et al.*, 2001; Huppertz e De Kruif, 2007) mostraram que ocorrem variações nas propriedades físico-químicas do leite em função da temperatura, do pH e da concentração de sais. Entre as modificações que acontecem durante o processo de resfriamento do leite, estão incluídas a dissociação das caseínas, especificamente a β -caseína, solubilização do fosfato de cálcio coloidal e diminuição no tamanho das micelas (Walstra e Van Vliet, 1986; Horne, 2003).

De maneira geral, não há recomendação sobre a temperatura do leite para a realização do teste do etanol, que vem sendo utilizado como uma medida alternativa da estabilidade térmica do leite mesmo na ausência de comprovação científica para esse fim (Chavez *et al.*, 2004). Após pesquisa em diversas fontes, foram encontradas somente as recomendações de 15 e 25°C (Mur, 1966) ou a 21°C (Revilla, 1982). No Brasil, o teste do etanol (alizerol) é realizado, em geral, imediatamente antes da coleta do leite nas propriedades rurais, quando a temperatura de manutenção do leite está na faixa de 3 a 7°C. Considerando as alterações do complexo caseinato do leite relacionadas à temperatura de refrigeração, em especial a dissolução do fosfato de cálcio associado às caseínas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação do perfil proteico e do cálcio solúvel na coagulação do leite pelo etanol nas temperaturas de 4°C, 10°C, 15°C e 20°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de 500mL de leite de 61 animais individuais da raça Holandesa oriundos de um rebanho com histórico de contagem de células somáticas $\leq 400.000/\text{mL}$ e contagem total de bactérias $\leq 100.000\text{ufc}/\text{mL}$. Os animais encontravam-se em diferentes estágios de lactação, e foram escolhidos aleatoriamente. Coletaram-se as amostras em frascos estéreis e, imediatamente após a coleta, foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas ao laboratório para processamento. No laboratório, cada amostra foi dividida em quatro partes de cerca de 100mL cada e mantidas a 4°C por não mais de 24 horas. Imediatamente antes da realização do teste do álcool, as amostras foram incubadas nas temperaturas de 4°C, 10°C, 15°C e 20°C. Após a estabilização da temperatura, cada amostra foi testada frente a concentrações de etanol, variando de 66 a 96%, com intervalos de 2% (v/v) (Brasil, 1981).

Amostras de leite de três animais foram submetidas à ultracentrifugação em quadruplicata (40.000 x g) a 4°C e a 20°C por 60 minutos utilizando ultracentrífuga Sorvall (EUA) acoplada ao rotor A-841. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi separado para análise do perfil proteico e do cálcio solúvel, realizadas em triplicata, totalizando 12

Efeito da temperatura...

análises por amostra. O perfil proteico foi determinado pela técnica de eletroforese capilar utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies GmbH, Germany) e *kit* específico para determinação proteica (Protein 230 LabChip *kit*, Germany) (Anema, 2009). A determinação do cálcio solúvel foi feita pela técnica de via úmida (digestão nitroperclórica) e leitura através de espectrofotômetro de absorção atômica (Spectra AA 800, Varian, EUA) para determinação do cálcio solúvel (Bataglia *et al.*, 1983; Salinas e Garcia, 1985; Moraes e Rabelo, 1986).

Foi usado o teste t para determinar a significância das diferenças entre os tratamentos, empregando o programa Sisvar 4.3 (Ferreira, 1999) e utilizando-se planilha eletrônica Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da variação da temperatura das amostras de leite na estabilidade ao etanol são

Tabela 1. Efeito da variação da temperatura de 61 amostras de leite de animais individuais na estabilidade ao teste do etanol e porcentagem das amostras coaguladas na concentração do etanol maior e menor que 80% (v/v)

| Amostras | Temperatura | | | |
|------------------|-------------|--------|--------|--------|
| | 4°C | 10°C | 15°C | 20°C |
| % (v/v) etanol | 82,59a | 83,67b | 85,67c | 87,44d |
| Desvio padrão | 5,07 | 4,81 | 4,13 | 3,90 |
| Coagulação ≤ 80% | 27,9 | 23,0 | 9,8 | 4,9 |
| Coagulação > 80% | 72,1 | 77,0 | 90,2 | 95,1 |

*Médias com letras diferentes são diferentes estatisticamente ($P < 0,001$) ao Teste t para amostras pareadas.

A reação de coagulação induzida pelo etanol é um processo de precipitação isoelétrica dependente da quantidade de cargas existentes nas camadas externas das proteínas que compõem as micelas de caseína (Mezdour *et al.*, 2006). A precipitação das micelas de caseína é dependente do perfil de pH, dos componentes iônicos, como metais bivalentes, especialmente íons cálcio que interferem na estabilização estérica do meio, e da constante dielétrica (Tsioulpas *et al.*, 2007). A redução da temperatura causa diminuição da solubilização dos íons de cálcio presentes nos *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal, os quais são responsáveis pela estabilização das proteínas no meio coloidal (Horne, 2003). Apesar das escassas recomendações sobre a temperatura de realização do teste do álcool (Mur, 1966; Revilla, 1982), Tsioulpas *et al.* (2007), no estudo sobre

apresentados na Tab. 1. Verificou-se que, quando a temperatura das 61 amostras de leite foi de 4°C, a concentração média da solução alcoólica necessária para causar a coagulação das amostras foi de 82,59%. Quando a temperatura das mesmas amostras foi de 10°C, 15°C e 20°C, as concentrações médias da solução de etanol que causaram a coagulação das amostras foi de 83,67%, 85,67% e 87,44%, respectivamente. Esses resultados mostraram que, à medida que a temperatura das amostras foi aumentada, a estabilidade ao etanol foi maior ($P < 0,001$). A distribuição de frequência da estabilidade das amostras ao etanol, para concentrações maiores e menores que 80% (v/v), mostrou que, quando as amostras foram mantidas a 4°C, 27,9% coagularam em concentrações alcoólicas menores que 80% (v/v) (Tab. 1). À medida que a temperatura das amostras de leite aumentou, foi maior o número de amostras que coagularam em concentrações de etanol superiores a 80% (v/v).

estabilidade da micela de caseína do leite bovino, recomendaram a realização desse teste a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, pois a temperatura é um fator que influencia no resultado.

A variação da temperatura na estabilidade das micelas de caseína tem sido constantemente investigada por diversos autores (O'Connell *et al.*, 2001; Tunier e De Kruif, 2002; Huppertz e De Kruif, 2007; Le *et al.*, 2008). Entretanto, o principal foco dessas investigações tem sido sobre os efeitos que o aumento da temperatura causa nas micelas de caseína, para maior entendimento da estabilidade térmica do leite.

Na Tab. 2, são apresentadas as concentrações de cálcio solúvel (%) das amostras de leite submetidas à ultracentrifugação nas temperaturas de 4°C e 20°C, respectivamente. Nas amostras

ultracentrifugadas a 4°C, a concentração de cálcio solúvel (0,042%) foi maior ($P < 0,05$) que a concentração presente nas amostras ultracentrifugadas a 20°C (0,036%). Essa diferença foi confirmada nas três amostras e nas quatro repetições realizadas de cada amostra. Esses resultados estão de acordo com outros citados na literatura, que mostram que, quando se abaixa a temperatura, há alteração do equilíbrio entre o cálcio coloidal, presente nas micelas de caseínas, e o cálcio solúvel, em decorrência da dissolução do fosfato de cálcio coloidal (Gaucheron, 2005; Anema, 2009). De acordo

com Horne (2003), a adição de íons cálcio ao leite reduz a carga elétrica da proteína aumentando o ponto isoelétrico. No caso do sistema micelar, a ligação do cálcio e a redução das cargas elétricas contribuem para a diminuição da camada de estabilização estérica, e esses efeitos são dependentes da variação da temperatura (Costa *et al.*, 2008; Trejo e Harte, 2010). O aumento do cálcio solúvel na temperatura de 4°C evidenciou seu envolvimento na redução do ponto de coagulação pelo álcool nas amostras mantidas nessa temperatura.

Tabela 2. Concentração do cálcio solúvel nas amostras de leite submetidas à ultracentrifugação nas temperaturas de 4°C e 20°C

| Temperatura (°C) | Porcentagem do cálcio iônico nas amostras de leite | | | |
|------------------|--|--------|--------|--------------------|
| | A | B | C | Média Geral |
| 4 | 0,050a | 0,042a | 0,036a | 0,042 ^a |
| 20 | 0,039b | 0,035b | 0,029b | 0,034b |

*Na coluna, médias com letras diferentes são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) ao teste t.

O fato de a temperatura da amostra de leite interferir no resultado do teste do álcool pode impactar economicamente produtores e indústrias que empregam esse teste para seleção do leite destinado ao processamento. Esse fato poderá ser mais evidente em amostras que estejam no limite classificatório determinado pela indústria.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados da porcentagem total das frações proteicas presentes nas três amostras de leite submetidas à ultracentrifugação. A ordem de eluição (Fig. 1) foi: α -lactalbumina (pico 1), β -lactoglobulina (pico 2), β -caseína (pico 3), α_s -caseína (pico 4) e κ -caseína (pico 5). Comparando os picos detectados nas amostras de leite submetidas às temperaturas de 4°C e 20°C, respectivamente, foi possível observar uma variação na quantificação das proteínas das três amostras de leite, sendo

que a β -caseína (Fig. 1, pico 3) apresentou maior variação em quantidade.

A diferença de migração da β -caseína da forma micelar agregada para a forma molecular dispersa na fase solúvel do leite, de acordo com a variação da temperatura, foi relatada por Pierre e Brule (1981), Costa *et al.* (2008) e Trejo e Harte (2010). É possível que esse comportamento da β -caseína também contribua para a maior instabilidade das amostras de leite ao etanol nas temperaturas de refrigeração. Com essa migração da β -caseína, as micelas diminuem de tamanho, liberando água e íons cálcio para a fase aquosa do leite (Dickinson *et al.*, 2001). Esse fato pode causar alteração nas cargas micelares totais, o que ocasionaria maior capacidade de agregação entre as micelas e, dessa forma, influenciaria também no ponto de coagulação do leite frente ao etanol.

Tabela 3. Porcentagem de proteínas presentes no sobrenadante após ultracentrifugação a 4 °C e 20°C

| Temperatura (°C) | Picos eletroforéticos (% das proteínas) | | | | |
|------------------|---|-----------------|------------------|---------------------|-------------------|
| | α -La (1) | β -Lg (2) | β -Cas (3) | α_s -Cas (4) | κ -Cas (5) |
| 4 | 9,2a | 14,2a | 54,2a | 16,2a | 0,87a |
| 20 | 11,2a | 17,5a | 49,3b | 13,6 b | 0,83a |

*Na coluna, médias com letras diferentes são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) ao teste t.

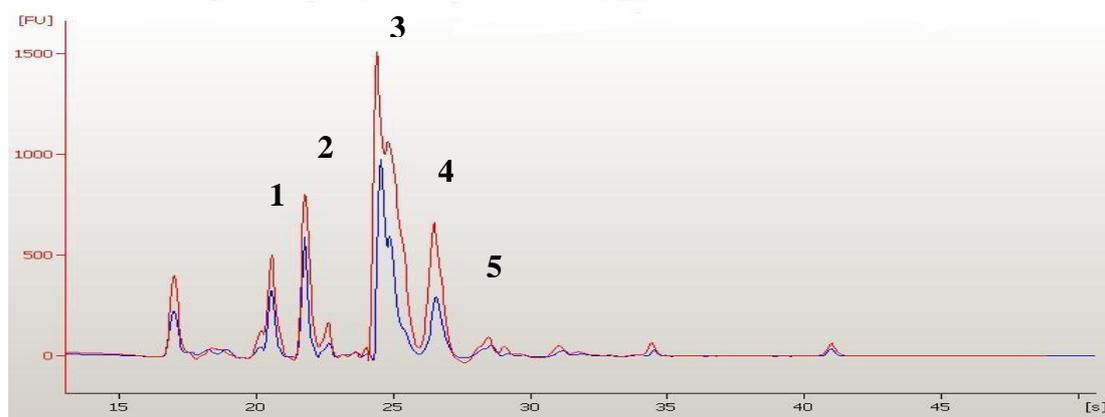


Figura 1. Eletroferograma do sobrenadante das amostras de leite submetidas à ultracentrifugação nas temperaturas de 4°C (linha em vermelho) e 20°C (linha em azul). Identificação dos picos: α -lactalbumina (pico 1), β -lactoglobulina (pico 2), β -caseína (pico 3), α_s -caseína (pico 4) e κ -caseína (pico 5).

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a temperatura tem efeito importante sobre a concentração de cálcio total e de β -caseína na fase solúvel no leite, e esse efeito foi mais evidente a 4°C. Esses dois fenômenos podem estar relacionados à maior instabilidade do leite frente ao etanol em baixas temperaturas. Considerando que muitas vezes o teste do álcool é realizado no Brasil em temperaturas que variam de 3 a 7°C, é recomendável, em casos duvidosos, a repetição do teste a 21°C. Esses casos são aqueles de amostras de leite de boa qualidade higiênica, isto é, contagem bacteriana total menor de 100.000ufc/mL e contagem de células somáticas menor de 400.000 células/mL, e que falharam no teste do álcool.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, 12042/09) pelo auxílio financeiro; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES, PNPd 02858/09-6) pelo fornecimento da bolsa de Pós-Doutoramento a Fabiano Freire Costa. Agradecimentos também ao Sr. Dr. José Renaldi Feitosa Brito pelas sugestões.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.E.; ANDREWS, A.T.; CHEESEMAN, G.C. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. *J. Dairy Res.*, v.47, p.371-382, 1980.
- ANEMA, S.G. Effect of milk solids concentration on the pH, soluble calcium and soluble phosphate levels of milk during heating. *Dairy Sci. Technol.*, v.89, p.501-510, 2009.
- AYERS, S.H.; JOHNSON, W.T. *The alcohol test in relation to milk*. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture (Bulletin of the USDA, 202), 1915. 35p.
- BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F. et al. *Método de análise química de plantas*. Campinas, SP: IAC (IAC. Boletim Técnico, n. 78), 1983. 48 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II Métodos físico-químicos*. Aprovado pela Portaria n.001, de 07/10/81. Brasília, 1981. 123p.
- CHAVEZ, M.S.; NEGRI, L.M.; TAVERNA, M.A.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *J. Dairy Res.*, v.71, p.201-206, 2004.
- COSTA, F.F.; RESENDE, J.V.; ABREU, L.R.; GOFF, H.D. Effect of calcium chloride addition on ice cream structure and quality. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.2165-2174, 2008.

- CREAMER, L.K.; BERRY, G.P.; MILLS, O.E. A study of the dissociation of β -casein from the bovine casein micelle at low temperature. *J. Dairy Res.*, v.62, p.89-100, 1977.
- DAVIES, D.T.; LAW, A.J.R. Variation in the protein composition of the bovine casein micelles at low temperature. *NZ J. Dairy Sci. Technol.*, v.12, p.58-66, 1983.
- DAVIES, D.T.; WHITE, J.C.D. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. II Coagulation by ethanol. *J. Dairy Res.*, v.25, p.256-267, 1958.
- DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; BELYAKOVA, L.E.; ANTIPOVA, A.S. Analyses of light scattering data on the calcium ion sensitive of caseinate solution thermodynamics: Relationship to emulsions flocculation. *J. Colloid Interface Sci.*, v.239, p.87-97, 2001.
- DONNELLY, W.J.; HORNE, D.S. Relationship between ethanol stability of bovine milk and natural variations in milk composition. *J. Dairy Res.*, v.53, p.23-33, 1986.
- FERREIRA, D.F. *SISVAR - Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos*, versão 4.3. Lavras: UFLA, 1999.
- GAUCHERON, F. The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.45, p.473-483, 2005.
- HORNE, D.S. Ethanol stability. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. (Ed). *Advanced Dairy Chemistry*. 3.ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, v.1: Proteins, 2003. p.975-999.
- HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.3613-3626, 1990.
- HUPPERTZ, T.; DE KRUIF, C.G. Ethanol stability of casein micelles cross-linked with transglutaminase. *Int. Dairy J.*, v.17, p.436-441, 2007.
- LE, T.T.; SAVEYN, P.; HOA, H. *et al.* Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. *Int. Dairy J.*, v.18, p.1090-1096, 2008.
- MEZDOUR, S.; BRULÉ, G.; KOROLCZUK, J. Physicochemical analysis of casein solubility in water ethanol solutions. *Lait*, v.86, p.435-452, 2006.
- MORAES, J.F.V.; RABELO, N.A. *Um método simples a digestão de amostras de plantas*. Brasília: EMBRAPA-DDT/EMBRAPA-CNPAF, (EMBRAPA CNPAF. DOCUMENTOS, 12), 1986. 12p.
- MUR, A.G. *Técnicas modernas aplicadas al analisis de la leche*. Madrid: Editorial Dossat S. A., 1966. 445p.
- O'CONNELL, J.E.; KELLY, A.L.; AUTY, M.A.E. *et al.* Ethanol-dependent heat-induced dissociation of casein micelles. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p.4420-4423, 2001.
- PIERRE, A.; BRULE, G. Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. *J. Dairy Res.*, v.48, p.417-428, 1981.
- REVILLA, A. *Tecnología de la leche: procesamiento, manufactura y análisis*. 2. ed. rev. San Jose, Costa Rica: IICA, 1982. 400 p.
- SALINAS, J.R.; GARCIA, R. *Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical/Programa de Pastos Tropicales, 1985. 83p.
- TREJO, R.; HARTE, F. The effect of ethanol and heat on the functional hydrophobicity of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.2338-2343, 2010.
- TSIOULPAS, A.; LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Effect of minerals on casein micelle stability of cow's milk. *J. Dairy Res.*, v.74, p.167-173, 2007.
- TURNIER, R.; DE KRUIF, C.G. Stability of casein micelles in Milk. *J. Chem. Phys.*, v.117, p.1290-1295, 2002.
- WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. The physical chemistry of curd making. *NL. Milk and Dairy J.*, v.40, p.241-259, 1986.