

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Determinação de caseína e ácidos graxos livres em leite cru bovino

Beatriz Meduri

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2012**

Beatriz Meduri
Engenheira Agrônoma

Determinação de caseína e ácidos graxos livres em leite cru bovino

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO FERNANDO MACHADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Meduri, Beatriz

Determinação de caseína e ácidos graxos livres em leite cru bovino / Beatriz Meduri. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2012.
49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Caseína 2. Ácidos graxos livres 3. Leite cru 4. Armazenagem - Condições
5. Células somáticas I. Título

CDD 637.1
M493d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Aos meus avós João e Odete, pessoas que amo absolutamente com todo o meu coração

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de estudo e crescimento profissional. Da mesma forma, agradeço ao Departamento de Zootecnia e à Clínica do Leite pela possibilidade de adquirir conhecimento na área de Qualidade do leite durante quase três anos de estudo.

Ao professor Paulo Fernando Machado, pela orientação, aprendizado e paciência durante este período. Cada crítica, ou elogio, me tornou e continuará me tornando alguém melhor a cada dia, em busca de superação e crescimento profissional. Muito obrigada por ter me recebido.

Ao grupo da Clínica do leite: Laerte, Augusto, Fabio, Aline e Juliana, agradeço pelo auxílio na pesquisa, companheirismo nas horas de estudo e, em especial, à Aline, Juliana e Fábio, pela amizade construída neste período.

Agradeço ao Professor Tadeu, do Departamento de Ciências Exatas e à Aline Zampar pelo auxílio nas análises estatísticas e interpretação dos resultados.

Neste período, construí grandes amizades, pessoas especiais que a vida me deu a oportunidade de conhecer, aos quais não posso deixar de agradecer.

Aline Zampar, Ellen, Eva e Joaquina, muito obrigada pelas incontáveis horas de conversa sobre a vida, além do companheirismo e do ombro amigo sempre próximo de mim.

À Juju, queridíssima, que fielmente não desgrudou de mim nem por um segundo até que esta dissertação fosse depositada, com muito carinho e amizade.

Às meninas Denise, Julia, Marina e Susane, amigas que me acompanharam desde os meus primeiros dias em Piracicaba, companheiras de muitas risadas e de muita compreensão, pessoas que me acolheram quando não conhecia ninguém, em um momento tão novo da minha vida. Nunca havia encontrado pessoas tão parecidas comigo, como vocês.

À Aline, Rafa, Paulinha e Michele, obrigada por terem não apenas dividido uma casa, problemas e soluções ao meu lado, mas também por terem me acolhido em um período de dificuldade, com muito carinho e compreensão. Em especial, à Aline e Rafa, pela amizade que vou levar para a vida toda.

Amigos queridos, vocês foram essenciais na minha vida, de formas distintas, preenchendo os meus momentos com muita alegria. Eu amo muito cada um de vocês.

Ao meu amor Fabrício pelo companheirismo.

À minha irmã gêmea, amada e amiga Ju, à minha mãe Rose e ao meu pai Marcos, obrigada por fazerem parte da minha história, cada um à sua maneira, um tão diferente do outro em essência, mas apaixonados, indiscutivelmente, um pelo outro. Vocês me ensinaram a importância das nossas relações de amor e de amizade durante toda a trajetória da minha vida.

EPÍGRAFE

*“É preciso ter um caos dentro de si
para se dar a luz à
uma estrela dançarina”.*

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CASEÍNA E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM AMOSTRAS DE LEITE CRU SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	23
2.1 Introdução	23
2.2 Material e Métodos.....	25
2.3 Resultados e Discussão	26
2.3.2 A caseína	27
2.3.3 Ácidos graxos livres (AGL)	29
Conclusão	32
Referências	32
3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CASEÍNA E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM AMOSTRAS DE LEITE CRU DE ACORDO COM A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	37
3.1 Introdução	38
3.2 Material e Métodos.....	39
3.3 Resultados e Discussão	40
3.3.1 Análise de variância	42
3.3.2 Local de coleta e a concentração de caseína	43
3.3.3 Interação entre época de coleta e classes de CCS sobre a concentração de caseína	44
3.3.4 Interação entre local e época de coleta sobre as concentrações de AGL.....	45
3.3.5 Interação entre época de coleta e classes de CCS sobre a concentração de AGL	47
3.4 Conclusão.....	48
Referências	48

RESUMO

Determinação de caseína e ácidos graxos livres em leite cru bovino

A caseína e os ácidos graxos livres (AGL) são importantes componentes do leite relacionados às suas características industriais e sensoriais. Alguns fatores são responsáveis por alterações em suas concentrações, dentre eles, pode-se destacar as condições de armazenamento, além da agitação e, principalmente, a contagem de células somáticas (CCS). Para estudar tais alterações, avaliou-se através do presente estudo o efeito da temperatura de armazenamento (-20°C e 7°C) e da idade das amostras (3, 6, 9 e 12 dias), assim como da CCS (CCS1: ≤ 400 mil, CCS2: 400-750 mil e CCS3: ≥ 750 mil células somáticas/mL de leite). O efeito das condições de armazenamento sobre a caseína e os AGL foi avaliado no primeiro estudo. O efeito da CCS sobre a caseína e os AGL, por outro lado, foi avaliado no segundo estudo. No primeiro estudo, observou-se aumento nos teores de AGL ao longo do tempo, ou seja, acompanhando o aumento do período de armazenamento, com médias superiores em amostras resfriadas (7°C), em relação às congeladas (-20°C). Desta forma, sugere-se que análises laboratoriais devem ser realizadas em até três dias para este componente, devido ao seu aumento progressivo em amostras resfriadas. Para a caseína, entretanto, não foi identificada interação entre os fatores idade e temperatura. As médias deste componente não diferiram considerando-se as condições de armazenamento avaliadas, indicando que as análises para este componente podem ser realizadas até doze dias após a coleta, independente da temperatura de armazenamento. No segundo estudo, identificou-se interação entre classes de CCS e época de coleta, para caseína. A partir dos resultados de AGL, pode-se concluir que o leite encontra-se com altas concentrações deste componente, quando coletado na propriedade rural, sendo também observada influência da CCS sobre as concentrações de caseína e AGL no leite cru. Os AGL apresentaram incrementos significativos comparando-se amostras coletadas em diferentes locais, no trajeto da fazenda à indústria. Por outro lado, comparando-se os mesmos locais: tanque, rota e silo, as médias de caseína não diferiram. Observou-se correlação entre as variáveis CCS e caseína e CCS e AGL.

Palavras-chave: Proteólise; Lipólise; Rancidez; Armazenamento

ABSTRACT

Determination of casein and free fatty acids in raw bovine milk

The casein and the free fatty acids (FFA) are important milk components related to its industrial and sensory characteristics. Some factors are responsible for changes in their concentration among them can highlight the storage conditions, as well as agitation and, especially, the somatic cell count (SCC). To study such changes, we assessed through the present study the effect of storage temperature (-20°C and 7°C) and the age of samples (3, 6, 9 e 12 days), as well as the CCS (CCS1: ≤ 400 mil; CCS2: 400-750 mil; CCS3: ≥ 750 mil somatic cells/mL of milk). The effect of CCS storage conditions on casein and FFA was evaluated in the first study. The effect of CCS on casein and FFA moreover, was evaluated in the second study. In the first study, it was observed increased levels the AGL over time, ie, accompanying the increase of the storage period, with means higher in refrigerated samples (7°C), in relation to frozen samples (-20°C). Thus, it is suggested that laboratory examinations shall be performed up to three days to this component, due to their progressive increase in refrigerated samples. For casein, however, was not identified interaction between the factors age and temperature. The mean of this component did not differ considering the storage conditions, indicating that the analyzes for this component can be made until twelve days after collection, regardless of storage temperature. In the second study, we identified interactions between CCS classes and seasons, for casein. From the FFA results, we can conclude that milk meets with high concentrations of this component, when collected in the rural property, being also observed influence of CCS on concentrations of casein and FFA in raw milk. The FFA showed significant increases compared to samples collected at different locations on the path from farm to industry. On the other hand, comparing the same locations, tank, route and silo, the casein average did not differ. Correlation was observed between the variables casein and CCS and FFA and CCS.

Keywords: Proteolysis; Lipolysis; Rancidity; Storage

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do leite

A qualidade do leite envolve características relacionadas à integridade da matéria-prima. A sua determinação é realizada por meio de análises físico-químicas, microbiológicas e nutricionais. Existe uma relação estreita entre a composição do leite e o seu rendimento industrial, a qual é atribuída, principalmente à fração caseína (KRUIF, 2003; VARISCO et al., 2004). Por outro lado, a sua qualidade sensorial tem relação direta com a composição lipídica e liberação de ácidos graxos livres (AGL).

Alterações nos teores de caseína e AGL estão diretamente relacionadas à proteólise e à lipólise do leite, respectivamente, os quais ocorrem devido à presença de enzimas endógenas ou exógenas ao leite, responsáveis pela desagregação das micelas de caseína, assim como pela quebra de triglicerídeos e conseqüente desenvolvimento de rancidez hidrolítica e outros defeitos sensoriais, denominados “off-flavor” (KRUIF, 2003; DEETH, 2006).

A caseína

A caseína é a principal proteína pertencente à fração protéica do leite, a qual representa cerca de 80% das proteínas totais. A estrutura granular das micelas de caseína é composta pelas caseínas do tipo α , β , γ e κ -caseína, somadas à água e aos minerais, principalmente o cálcio e o fósforo. A agregação das caseínas de diferentes tipos resulta na formação de grânulos insolúveis, os quais ficam em suspensão no leite fluido (GONZÁLEZ e CAMPOS, 2003).

As micelas de caseína compreendem uma região central hidrofóbica e uma camada periférica hidrofílica, onde o fragmento C-terminal polar das moléculas de κ -caseína encontra-se exposto. A fosforilação ocorre, principalmente, nas regiões polares das caseínas, localizadas na periferia das micelas (α_1 , α_2 e β). Os grupos fosfato localizam-se nas voltas formadas por β -caseína, que “dobram” a molécula e aproximam esta fração das demais, formando um domínio altamente hidrofílico. Os principais sítios de fosforilação em bovinos são α_1 , α_2 e β -caseínas (KRUIF, 2003).

As frações α_1 , α_2 , β e κ -caseína apresentam propriedades funcionais distintas. A fração κ -caseína, localizada na camada externa da micela, é insensível ao cálcio, impedindo desta forma a precipitação das demais frações α_1 , α_2 , β -caseína, sensíveis ao cálcio, quando há mistura do leite (MÜLLER-BUSCHBAUM et al., 2007). Pequenas variações na concentração de cada tipo

de caseína influenciam fortemente o tamanho das micelas, a reatividade do coalho, assim como as características reológicas da coalhada (KRUIF, 2003).

As moléculas individuais da caseína são pouco solúveis em ambiente aquoso. No entanto, os grânulos da micela de caseína mantêm uma suspensão colóide no leite. A proteólise é responsável pela dissociação das micelas, insolubilidade da caseína e formação de material gelatinoso, o coalho, utilizado na formação de derivados sólidos do leite (GONZALEZ e CAMPOS, 2003). A fração γ é um fragmento peptídico derivado da proteólise de β -caseína (VARISCO et al., 2004).

Durante a proteólise, ocorre rápida e extensiva degradação da estrutura flexível da caseína por enzimas proteolíticas, como a plasmina. Os principais fatores relacionados à proteólise são altas temperaturas, tempo de armazenamento, pH, presença de enzimas proteolíticas e CCS. Embora a caseína não seja significativamente afetada pelo calor, há grande sensibilidade às enzimas proteolíticas (VARISCO et al., 2004).

Ácidos Graxos Livres (AGL)

Os triglicerídeos são os lipídeos de grande importância, uma vez que consistem em 98% da gordura total do leite. Os triglicerídeos são formados por três ácidos graxos unidos por ligação covalente e ligados a uma molécula de glicerol por pontes éster (GONZALEZ e CAMPOS, 2003). Devido a ação de fatores como agitação mecânica, tratamentos térmicos, congelamento seguido por descongelamento, pH, tempo de armazenamento, homogeneização e CCS, há lipólise e conseqüente liberação de AGL no leite.

A lipólise resulta da desestabilização de camadas adsorvidas sobre os glóbulos de gordura, como a lecitina, tornando-os susceptíveis à ação de enzimas lipolíticas, como a lipoproteína lípase (SANTOS et al., 2003a; SANTOS et al., 2003b). Os processos que perturbam as camadas adsorvidas sobre os glóbulos de gordura podem ter efeito sobre a liberação de AGL devido à catálise dos triglicerídeos mediante a presença de enzimas lípase (SANTOS et al., 2003b). Das quais a principal representante em leite fresco é a lipoproteína lípase.

No leite bovino, a maior parte das lípases encontra-se associada às micelas de caseína (SANTOS et al., 2003a, 2003b). Os responsáveis pelo desenvolvimento de rancidez hidrolítica no leite e derivados são, principalmente, os ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico, caprótico, caprílico, cáprico e láurico (SHIPE et al., 1978).

Análises laboratoriais

As amostras de leite cru devem passar por análise laboratorial antes de serem destinadas à indústria para o processamento.

Após a implantação da IN-51 à cadeia produtiva do leite, todo o volume de leite produzido no país passou a ser analisado pelos laboratórios da RBQL, vinculados ao MAPA, antes de serem entregues às indústrias. Desta forma, tornou-se possível o conhecimento prévio da sua qualidade, assim como, dando-se ao mesmo o destino adequado no beneficiamento, seja para a produção de queijo, manteiga, leite UHT ou outros derivados, de acordo com a sua composição.

Para garantir a integridade das amostras coletadas nas fazendas é necessário que as mesmas sejam mantidas sob baixas temperaturas, além da adição de conservantes químicos, como o bronopol (KROGER, 1985).

Amostras de leite mal conservadas, submetidas a mudanças de temperatura e longo período de armazenamento, podem sofrer intensa lipólise e proteólise, devido à aceleração da proliferação de microrganismos e a maior liberação de enzimas favoráveis a estes processos (FLORIS et al., 2003; KRUIF, 2003).

Temperatura e tempo de armazenamento

A temperatura de refrigeração (de 4°C a 10°C) é considerada essencial para garantir a integridade das amostras de leite durante o seu transporte, independente do uso de conservantes químicos (KROGER, 1985), o que sugere a presença de tanques de expansão nas fazendas, assim como a manutenção desta temperatura nos caminhões de coleta.

No Brasil, considera-se imprescindível a adição de conservantes químicos às amostras de leite, como é o caso do bronopol, o que se deve à extensa área territorial e longa distância entre fazendas e laboratórios, o que impossibilita a chegada das amostras em até 48 horas (CASSOLI et al., 2010). Entretanto, o uso de conservantes químicos em amostras de leite deve estar aliado à temperatura de resfriamento.

Mantendo-se o leite resfriado na fazenda e durante o seu transporte em caminhões isotérmicos, reduz-se o desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos (NÖRNBERG et al., 2009). Segundo Nörnberg et al. (2009), estes microrganismos são capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termo resistentes, as quais mantêm a sua atividade após a pasteurização.

Desta maneira, a partir da IN-51, exige-se a conservação do leite cru sob refrigeração (BRASIL, 2002).

Potencial atividade lipolítica e proteolítica foram observadas por Arcuri et al. (2008) e Tebaldi et al. (2008) a partir de 4°C, as quais apresentaram aumentos gradativos acompanhados do aumento de temperatura. Segundo os autores, a razão deste processo está aliada à presença das bactérias gram-negativas e enzimas liberadas por elas, principais responsáveis pela deterioração de leite cru refrigerado.

Como limitação ao levantamento de tais informações é importante frisar que na literatura não há pesquisas abrangendo a questão dos efeitos do binômio temperatura x idade sobre as concentrações de caseína e AGL.

Mastite

A mastite é uma inflamação intra-mamária que altera a composição e as propriedades tecnológicas do leite, além aumentar a atividade das proteases bacterianas, responsáveis pela destruição das células e pela descamação do epitélio mamário, alterando as propriedades dos tecidos da glândula (OGOLA et al., 2007). Os níveis de mastite no rebanho têm sido monitorados através dos níveis de CCS (SCHUKKEN et al., 2003).

Apesar de outros fatores exercerem influência sobre variações na CCS de vacas em lactação, tais como idade, ordem de parto, período de lactação, mês e estação do ano, o estado de infecção da mastite é o principal responsável pela sua variação (HARMON, 1994). Portanto, a CCS do leite de uma vaca indica o grau de infecção da glândula mamária, assim como, a CCS do leite de um tanque de resfriamento indica a incidência média de mastite no rebanho (MACHADO et al., 2000).

São descritas alterações na composição do leite mastítico relacionadas ao aumento da CCS. Quist et al. (2008) observaram reduções progressivas nas concentrações de proteína e gordura, por outro lado, Machado et al. (2000) observaram maior porcentagem de gordura, menor de proteína e lactose e ausência de alterações nas porcentagens de sólidos totais. Redução na concentração de caseína em quartos infectados por mastite subclínica foram observadas por Zafalon et al. (2008).

A composição protéica do leite com alta CCS também sofre modificações, como a expulsão incompleta do soro, dificultando a ação da flora láctica, essencial à boa maturação dos queijos e

ao desenvolvimento de suas propriedades sensoriais. Com a incompleta expulsão do soro, ocorre deterioração, aumenta-se o tempo de coagulação e têm-se a formação de coágulos mais fracos. Como consequência, há aumento de umidade no queijo e queda no rendimento de matéria seca e na produção de queijos (FLORIS et al., 2003; QUIST et al., 2008).

A atividade proteolítica é decorrente, principalmente, da presença de plasmina, derivada do plasminogênio, responsável pela divisão de caseínas em proteose-peptonas. No leite mastítico, a separação das caseínas tem seu início no úbere, entretanto, esta ação tem continuidade após a ordenha, mesmo quando o leite é refrigerado. A plasmina exerce a sua ação proteolítica basicamente sobre a β -caseína; as frações α_1 e α_2 são as menos afetadas, enquanto que a κ -caseína, a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina não são afetadas (FLORIS et al., 2003).

Em relação à composição lipídica, o leite com elevada CCS sofre atividade mais intensa das lipases sobre os triglicerídeos, resultando em defeitos em sua qualidade sensorial, como por exemplo, a rancidez (SANTOS et al., 2007). Uma das razões se deve à ação enzimática, a qual passa a ocorrer a partir de membranas do endotélio capilar, devido ao vazamento ou devido à síntese endógena de células secretoras da glândula mamária (AZZARA e DINICK et al., 1985).

Azzara e Dinick et al. (1985) observaram altas concentrações de AGL em amostras de leite coletadas de tanques de expansão, assim como, aumento progressivo em sua concentração, evidenciando intensa atividade lipolítica, durante o armazenamento. Segundo os autores, as causas relacionam-se à integridade da membrana dos glóbulos de gordura, à lipase celular e à presença de macrófagos no leite, originados da glândula mamária, os quais podem secretar enzimas lipolíticas.

A mastite altera a composição do leite devido a alterações provocadas na permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e na habilidade de síntese do tecido secretor, além de haver ação direta dos patógenos ou enzimas sobre os componentes já secretados no interior da glândula (MACHADO et al., 2000).

Objetivou-se determinar as alterações nos componentes do leite caseína e AGL, em amostras de leite cru, sob o efeito dos fatores: CCS e condições de conservação de amostras, como a temperatura e o tempo de armazenamento. Partiu-se da hipótese que tais fatores exercem influência negativa sobre a caseína e os AGL, acelerando os processos de proteólise e lipólise no leite. Buscou-se, desta forma, compreender tais alterações para que possam ser reduzidas ou

evitadas durante o processo de coleta e armazenamento de amostras de leite, assim como, durante o seu transporte, da fazenda até a indústria.

Referências

ARCURI, F.A.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255. 2008.

AZZARA, C. D. E DINICK, P.S. Lipoprotein Lipase Activity of Milk from Cows with Prolonged Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.3171-3175, 1985.

BRASIL. Instrução Normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. Estabelece o regulamento fixar os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção, a identidade e a qualidade do leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p.13-22, set. 2002.

CASSOLI, L. D. ; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.2, p.434-439, 2010.

DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.16, p.555-562, 2006.

FLORIS, R. E ALTING, A.C.; AALBERSBERG, W.Y. Caseins-derived peptides. In: AALBERSBERG, W.Y. **Progress in Biotechnology**. Elsevier Science: Amsterdam, 2003. p. 226-233.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, p. 2103-2112, 1994.

GONZÁLEZ, F.H.D; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: _____. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. UFRGS: Porto Alegre, 2003. p. 31-47.

KROGER, K. Milk sample preservation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p. 783-787, 1985.

KRUIF, C.G. Caseins. In: ASLBERSBERG, W.Y.; HAMER, R.J.; JASPERSE, P.; DE JONGH, H.H.J.; DE KRUIF, C.G.; WALSTRA, P.; DE WOLF, F.A. **Progress in Biotechnology**. Elsevier Science: Amsterdam, 2003. p.1-284.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.F.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MÜLLER-BUSCHBAUM, P.; GEBHARDT, R.; ROTH, S.V.; METWALLI, E.; DOSTER, W. Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. **Biophysical Journal**, San Diego, v.93, n.3, p.960-968, 2007.

NÖRNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientistae Veterinariae**, Porto Alegre, v.37, n.2, p.157-163, 2009.

OGOLA, H.; Shitandi, A.; Nanua, J. Effects of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v.8, p.237-242, 2007.

QUIST, M.A.; LE BLANC, S.J.; HAND, K.J.; LAZENBY, D. Milking-to-milking variability for milk yield, fat and protein percentage, and somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.9, p. 3412-3423, 2008.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 2491-2503, 2003a.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D.M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 1601-1607, 2003b.

SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, C.A.F.; AUGUSTO, L.F.B.; AQUINO, A.A. Atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.4, p.832-836, 2007.

SHIPE, W.F.; BASSETTE, R.; DEANE, D.D.; DUNKLEY, W.L.; HAMMOND, E.G.; HARPER, W.J.; KLEYN, D.H.; MORGAN, M.E.; NELSON, J.H.; SCANLAN, R.A. Off Flavors of milk: nomenclature, standards, and bibliography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.61, p. 855-869, 1978.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISSON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.34, p.579-596.

TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A.; PICCOLI, R.H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.753-760, 2008.

VARISCO, G.; BOLZONI, G.; CORNOLDI, M. 2004. **Casein**: Determining casein in milk for the quality of dairy products. 2004. Disponível em: <http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20latte/pubblicazioni/La%20caseina.pdf>. Acesso em 16 out. 2011.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Revista Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CASEÍNA E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM AMOSTRAS DE LEITE CRU SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Resumo

A caseína e os ácidos graxos livres (AGL) são indicadores de qualidade relacionados às características industriais e sensoriais do leite e derivados. As condições de armazenamento de amostras de leite podem interferir nas análises de AGL e consumo de leite. Avaliou-se o efeito de condições de conservação (tempo e temperatura de armazenamento), sobre as concentrações de caseína e AGL, obtidos por meio da metodologia de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Foi utilizado delineamento fatorial, com efeito de duas temperaturas (-20 e 7°C) e quatro tempos de conservação de amostras. Para os AGL, foi observada interação entre os fatores e por análise de regressão linear foi observada correlação entre os fatores avaliados. Os teores de AGL aumentaram ao longo do tempo, apresentando médias superiores em amostras resfriadas (7°C), em relação às congeladas (-20°C). Portanto, as análises de AGL devem ser realizadas em até três dias, devido ao seu aumento progressivo em amostras resfriadas. Para caseína, não foi identificada interação entre os fatores idade e temperatura, entretanto, foi observado efeito da temperatura. Médias de caseína referentes às amostras resfriadas foram superiores, em relação às amostras congeladas, indicando que as análises para este componente podem ser realizadas até doze dias após a coleta, e as amostras devem ser mantidas resfriadas.

Palavras-chave: Lipólise; Proteólise; Temperatura; Tempo de armazenamento

Abstract

The casein and free fatty acids (FFA) are quality indicators related to industrial and sensory characteristics of milk and dairy products. The conditions of storage of milk samples can interfere in the analysis of FFA and milk consumption. We evaluated the effect of storage conditions (storage time and temperature), on the concentrations of casein and FFA, obtained through the method of Fourier Transformed Infrared (FTIR). Factorial design was used, with the effect of two temperatures (-20°C e 7°C) and four storage times of samples. For the FFA, there was interaction between the factors and linear regression correlation was observed between the studied factors. FFA levels increased over time, with higher average cooled samples (7°C) in respect of frozen (-20°C). Therefore, the analysis of FFA to be performed within three days because of the progressive increase in samples cooled. For casein, was not identified interaction between the factors age and temperature. Medium casein regarding samples were cooled higher compared to frozen samples, indicating that the analyzes for this component can be made until twelve days after collection, and samples should be kept refrigerated.

Keywords: Lipolysis; Proteolysis; Temperature; Storage time

2.1 Introdução

A caseína e os ácidos graxos livres (AGL) podem ser utilizados como indicadores de qualidade de leite. A caseína está diretamente relacionada ao rendimento industrial do leite e

derivados (KARLSSON et al., 2005). Segundo Varisco et al. (2004), na produção do queijo *Grana Padano*, uma variação de 0,1% na relação caseína/proteína total resulta em produção de 0,30% mais ou menos queijo, para cada 100 kg de leite processado. A redução no teor de caseína pode ser causada pelo aumento da proteólise, o que resulta em dissociação das micelas, pela ação de proteases (KRUIF, 2003).

A proteólise do leite pode resultar no acúmulo de pequenos peptídeos, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor amargo e adstringente (MA et al., 2000). A proteólise ocorre devido à presença de enzimas protease, principalmente a plasmina endógena, a qual tem a atividade aumentada em leite com elevada CCS. O principal substrato para a atividade proteolítica no leite é a caseína (SANTOS et al., 2003a).

Os AGL são originados a partir da hidrólise de triglicerídeos, por ação, principalmente, da lipoproteína lipase, com o rompimento da membrana dos glóbulos de gordura. A concentração de AGL está relacionada a características sensoriais do leite e derivados quando presentes acima de limites de tolerância à rancidez hidrolítica (KOCA et al., 2007; HANUŠ et al., 2008).

Quando o leite é submetido à agitação ou turbulência em excesso, a membrana dos glóbulos de gordura do leite torna-se sujeita ao rompimento, permitindo que enzimas lipolíticas, principalmente a lipase lipoprotéica, atuem sobre os triglicerídeos, hidrolisando-os. Outras causas relacionadas à lipólise espontânea no leite são: altas concentrações de constituintes do sangue no leite, final de lactação, nutrição inadequada e mastite (CARTIER e CHILLIARD, 1990). Entretanto, as suas causas durante a mastite ainda não estão esclarecidas (SANTOS et al., 2007).

Segundo Santos et al. (2003b) em leite bovino, a maior parte das enzimas lipase está relacionada às micelas de caseína.

A atividade lipolítica provoca o desenvolvimento de defeitos sensoriais, tais como a rancidez hidrolítica (OSAWA e GONÇALVES, 2006).

Partindo da hipótese que as condições de armazenamento podem exercer influência sobre as atividades proteolítica e lipolítica no leite, provocando alterações nos resultados obtidos através das análises laboratoriais, os quais não caracterizariam o leite coletado nas fazendas, devido à perda de integridade das amostras. Objetivou-se, portanto, avaliar as condições de conservação: temperatura e tempo de armazenamento às quais as amostras são mantidas da coleta à análise, sobre os teores de caseína e AGL, em amostras de leite cru bovino.

2.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de leite cru de tanques de expansão de 57 propriedades localizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, totalizando 399 dados amostrados para a determinação de caseína e AGL.

O leite das fazendas foi coletado a partir de tanques de expansão. Em seguida, o leite dos tanques de expansão de cada fazenda foi agitado e transferido para um galão limpo e seco, com 3.000 mL de capacidade e, em seguida, subdividido e transferido para frascos de 40 mL contendo o conservante bronopol (Microtabs[®]), na concentração de 0,02 mg/mL.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas à Clínica do Leite, laboratório sediado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, onde foram submetidas a duas fontes de variação: tempo decorrido entre a coleta e análise (idade da amostra) e temperatura de armazenamento.

As temperaturas de armazenamento testadas foram: congelamento (-20°C) e resfriamento 7°C. As idades de amostras testadas foram: três, seis, nove e doze dias. As amostras controle foram mantidas à temperatura de 7°C, com idade igual de três dias, situação semelhante àquela em que amostras chegam ao laboratório o mais rapidamente possível e permanecem resfriadas.

O delineamento experimental adotado foi em Blocos Inteiramente Casualizados (BIC), com as amostras distribuídas em arranjo fatorial desbalanceado (2x4), uma vez que foram avaliadas interações entre duas temperaturas de armazenamento: -20°C (congelamento) e 7°C (resfriamento) e quatro períodos de análise: 3,6,9 e 12 dias, não tendo sido avaliado o efeito da temperatura de congelamento (-20°C) em amostras com três dias.

Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto à concentração de caseína (em g/mL de leite) e AGL (mmol/100 g de gordura) por meio da metodologia FTIR (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier), pelo equipamento MilkoScan FT+ 6000 (FOSS ANALYTICAL).

Os resultados foram submetidos a análise de variância considerando-se os efeitos de temperatura, idade da amostra e sua interação (Temperatura x Idade da amostra) sobre as concentrações de caseína e AGL. O efeito das fazendas foi considerado como efeito fixo de blocos. Havendo um total de 57 fazendas, cada uma delas foi considerada como um bloco. Quando houve interação significativa, realizou-se o desdobramento dos efeitos observados, bem como, a comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), pelo procedimento GLM (SAS,

2008). Em seguida, realizou-se análise de regressão linear para os resultados de AGL, considerando-se o efeito da interação entre idade da amostra e temperatura, utilizando o procedimento REG (SAS, 2008).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Análise de variância

Foi observado elevado coeficiente de variação nos resultados de AGL, o que indica alta variabilidade deste componente nas amostras analisadas em relação à média.

Segundo Slaghuis et al. (2004), a fração AGL sofre incrementos consideráveis, em função do tempo, a partir da ordenha, atingindo níveis máximos de atividade lipolítica decorridas 24 horas. Contudo, Pesquisas referentes à concentração de AGL no leite são escassas na literatura, principalmente relacionadas à conservação de amostras.

Já para caseína, o coeficiente de variação foi baixo, evidenciando que a sua concentração manteve-se próxima da média nas situações avaliadas, o que sugere ausência de proteólise nas amostras analisadas.

Houve efeito da temperatura e do tempo de armazenamento, assim como, da interação destes fatores sobre os AGL (Tabela 1). Pesquisas desenvolvidas por Sundheim e Bengtsson-Olivercrona (1985) e Ma et al. (2003) confirmam o efeito de ambos os fatores sobre a atividade lipolítica no leite.

Tabela 1. Análise da variância para a caseína e AGL, de acordo com os efeitos temperatura de armazenamento, idade da amostra e suas interações.

Causas da variação	Caseína	AGL
Fazenda	<0,0001	<0,0001
Temperatura de armazenamento (T)	<0,01	<0,0001
Idade da amostra (IDA)	0,0279	<0,0001
T x IDA	0,0193	<0,0001

Sobre a caseína, por outro lado, houve efeito apenas da temperatura de armazenamento, o qual fora observado também por Ma et al. (2003) e Ismail e Nielsen (2010) como um dos responsáveis por influenciar a concentração da plasmina endógena no leite, principal responsável pela atividade proteolítica.

A temperatura exerce influência sobre a proteólise e a lipólise, pois as principais enzimas envolvidas nestes processos, plasmina e lipoproteína lípase, são ativadas quando o leite é

submetido à temperatura de refrigeração, causando gradativa degradação das proteínas do leite, principalmente caseína, e dos lipídeos, principalmente os triglicerídeos, respectivamente (Ma et al., 2003).

Conforme esperado também houve efeito das fazendas sobre os teores de ambos os componentes, caseína e AGL, o que se deve a questões associadas a fatores tais como: raça, sanidade, alimentação, época do ano, mesorregião, entre outros. Entretanto, este efeito não foi o foco do estudo.

Segundo Law (1979) e Cousin (1982), as bactérias psicrotróficas são as principais responsáveis pela produção de enzimas extracelulares, associadas à atividade proteolítica e lipolítica no leite. Segundo os pesquisadores, o tempo limite para comece a ser observado desenvolvimento destes microrganismos no leite cru refrigerado é de cinco dias, o que torna a ausência de efeito do tempo de armazenamento sobre a caseína, observado no presente estudo, aceitável.

2.3.2 A caseína

Apenas o fator temperatura apresentou efeito sobre os teores de caseína. A maior concentração de caseína (2,42g/L (a); $p < 0,05$) fora observada em amostras resfriadas (7°C), com seis e com nove dias de idade, assim como em amostras congeladas (-20°C), com nove dias de idade. Sua menor concentração (2,40g/L (b); $p < 0,05$), por outro lado, fora observada em amostras congeladas, com nove dias de idade. Apesar da proximidade numérica, a diferença entre as médias é biologicamente considerável, uma vez que a caseína é um componente sólido pouco variável no leite.

Assim como no presente estudo, Vasbinder et al. (2003), Karlsson et al. (2005) e Oliveira e Timm (2007), observaram efeito da temperatura de armazenamento sobre a concentração de caseína, efeito que, segundo os autores, está associado à exposição da caseína ao resfriamento, que torna a fração β -caseína mais solúvel, desestabilizando as micelas.

Segundo Oliveira e Timm (2007), a proteólise nas amostras resfriadas é observada devido à solubilização do fosfato do cálcio contido nas micelas e conseqüente redução das interações hidrofóbicas e formação de gel. Segundo Ma et al. (2003), a plasmina, principal enzima envolvida na proteólise do leite, é ativada à temperatura de refrigeração, causando gradativa degradação das proteínas do leite, em especial, à caseína.

Entretanto, Vasbinder et al. (2003) e Karlsson et al. (2005) relatam ser necessário submeter as amostras à temperaturas mais altas, entre 20 e 45°C, para que seja identificada atividade proteolítica. O que estaria associado à interações hidrofóbicas, responsáveis pela agregação de partículas de caseína, e indução de gelatinização, causada pelo enfraquecimento das ligações da fração β - e κ -caseína com as micelas, provocando o seu desaparecimento por ação da enzima endógena plasmina.

Diferente do observado no presente estudo, Grotenhuis et al. (2003), a partir de amostras de leite refrigeradas, verificaram efeito do tempo de armazenamento sobre a proteólise. O efeito do tempo de armazenamento fora observado após trinta horas de armazenamento, quando a caseína tornou-se instável, gelatinizando o leite. Guinot-Thomas et al. (1995), por outro lado, descreveram mesmo efeito em amostras resfriadas, decorridos seis dias, quando observaram decréscimo da fração caseína, o que foi atribuído à sua hidrólise por proteases microbianas, como a plasmina.

A ausência de efeito do tempo de armazenamento sobre a caseína sugere não ter havido ação enzimática da plasmina e demais proteases em doze dias, período de avaliação proposto.

A fração κ -caseína, e seus filamentos hidrofílicos, localizados na superfície das micelas, são responsáveis pela estabilidade da estrutura coloidal das micelas, resistência à coagulação e clivagem e insolubilidade em água. De tal maneira, a κ -caseína é uma barreira à agregação das micelas (KRUIF, 2003; OLIVEIRA e TIMM, 2007).

A integridade das micelas, segundo Kruif (2003), depende também da presença dos íons cálcio, os quais, juntamente com a fração κ -caseína, formam uma suspensão coloidal estável na estrutura micelar.

Segundo Floris et al. (2003), com a degradação das micelas e a ocorrência de proteólise, há liberação de peptídeos e aminoácidos livres, também responsáveis pelo desenvolvimento de “flavor” em produtos lácteos.

Não tendo sido observado efeito do fator tempo de armazenamento, sugere-se que análises voltadas aos teores de caseína possam ser realizadas em até doze dias, conforme o período avaliado no presente estudo. As amostras, entretanto, podem ser mantidas resfriadas ou congeladas, sem que seja alterada a concentração deste componente do leite.

2.3.3 Ácidos graxos livres (AGL)

O desenvolvimento de defeitos relacionados ao sabor do leite tem como causa a rancidez, atribuída à hidrólise enzimática de triglicérides por enzimas lipase, como a lipoproteína lipase, com liberação de AGL no leite. Em altas concentrações, os AGL tornam o leite intolerável ao consumo. Na Nova Zelândia considera-se a concentração de 1 mmol de AGL/100g de gordura como indicadora de problemas sensoriais (THOMSON e WOOLFORD, 2005), entretanto, na República Tcheca, o leite com concentração entre 0,5 e 1,2 mmol de AGL/100g de gordura são considerados intoleráveis ao consumo (HANUŠ et al., 2008).

O binômio: temperatura de armazenamento x idade

Devido à interação encontrada entre os fatores propostos (tempo e temperatura de armazenamento), por meio da análise de variância (Tabela 1), realizou-se desdobramento da interação dos fatores, por meio da qual, alterações ocorridas nos teores de AGL ao longo do tempo nas diferentes temperaturas podem ser observadas (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação de médias de AGL presente no leite sob diferentes temperaturas e períodos de análise das amostras

		Idade (dias)			
		3	6	9	12
		AGL (mmol/100g de gordura)			
Temperatura	-20	-	1,14 ^{Aa}	1,04 ^{Aab}	0,94 ^{Ab}
(°C)	7	0,67 ^a	0,89 ^{Bb}	0,89 ^{Bb}	0,97 ^{Ab}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a idade da amostra (3, 6, 9 e 12 dias); médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a temperatura de conservação da amostra (-20°C), (7°C).

A menor média referente à concentração de AGL em amostras de leite cru foi observada em amostras com três dias de idade, resfriadas (7°C). Já a maior média foi observada em amostras com seis dias, congeladas (-20°).

Amostras mantidas congeladas (-20°), observadas com seis, nove e doze dias, apresentaram decréscimos nas concentrações de AGL médias, de acordo com o aumento do tempo de armazenamento, sendo significativa a diferença existente entre as médias de AGL obtidas em amostras com seis e doze dias de idade.

As amostras resfriadas (7°C), por outro lado, apresentaram acréscimos nas concentrações de AGL médias, em amostras mais velhas. A menor média obtida foi em amostras com três dias e a maior, em amostras com doze dias de idade. Diferiram significativamente as médias de AGL

observadas em amostras com três dias, em relação às amostras analisadas aos seis, nove e doze dias.

As médias de AGL observadas em amostras analisadas aos seis e aos nove dias diferiram comparando-se a temperatura de armazenamento: congelamento (-20°C) e resfriamento (7°C). As médias mais altas foram observadas quando congeladas, com seis e com nove dias. As médias de AGL de amostras com doze dias de idade não diferiram sob as temperaturas avaliadas. Já amostras armazenadas por três dias foram avaliadas apenas resfriadas.

O início da atividade lipolítica foi observado em amostras resfriadas (7°C), a partir dos três dias de idade ($x=0,67$), uma vez que a média de AGL já encontra-se superior aos limites relacionados ao desenvolvimento de rancidez hidrolítica descritos anteriormente. Estes mesmos limites foram observados também em amostras congeladas (-20°C), entretanto, a partir de seis dias de armazenamento ($x=1,14$), uma vez que as mesmas não foram avaliadas após três dias de armazenamento.

As análises laboratoriais do presente estudo tiveram início com três dias de armazenamento, uma vez que, devido à extensa área territorial do Brasil, amostras com menos de três dias não encontram-se no laboratório disponíveis para análise (CASSOLI et al., 2010).

Sundheim e Bengtsson-Olivercrona (1985) descreveram que o resfriamento a 4°C induz atividade lipolítica no leite, sendo observada máxima atividade, após o período de três a cinco horas de armazenamento. Segundo Ma et al. (2003), amostras de leite cru mantidas sob refrigeração durante o armazenamento e o transporte apresentam crescimento de bactérias psicrotólicas em, no máximo, cinco dias. Estes microrganismos produzem enzimas extracelulares, responsáveis pela lipólise, assim como pela proteólise no leite.

Desta forma, a atividade lipolítica e o aumento na concentração de AGL, têm início logo após a ordenha, ocorrendo continuamente no leite refrigerado, durante o seu transporte e armazenamento. Sua máxima atividade lipolítica ocorre algumas horas após a coleta, de acordo com Deeth (2006), o qual aponta como causa, a ativação da atividade enzimática das lipases em leite refrigerado.

Os incrementos observados nos teores de AGL, em amostras resfriadas (Tabela 2), também foram reportados por Kroger (1985) e Covas et al. (2000), evidenciando que análises voltadas à este componente devem ser feitas rapidamente após a coleta, devido aos incrementos em seu teor, após algumas horas de armazenamento, conforme reportado pelos autores, podendo atingir ou

ultrapassar os limites de tolerância do consumidor ao desenvolvimento de defeitos de qualidade relacionados ao desenvolvimento de rancidez hidrolítica.

O aumento na concentração de AGL em amostras refrigeradas se deve à forte correlação existente a lipólise e a atividade da enzima lipase, sobre a membrana que envolve os triglicerídeos, a lecitina. Esta membrana consiste em uma barreira protetora ao equilíbrio dos triglicerídeos e sais, na interface entre o soro e a fração cremosa do leite. O seu rompimento provoca a quebra das ligações éster existente entre o glicerol e os ácidos graxos, os quais, ligados, formam os triglicerídeos. A quebra destas ligações éster tem como consequência a liberação de AGL e o desenvolvimento de rancidez e outros defeitos sensoriais (KINTNER e DAY, 1965; SUNDHEIM e BENGTTSSON-OLIVERCRONA, 1985).

A menor concentração de AGL nas amostras congeladas com maior tempo de armazenamento não é descrita na literatura, entretanto, provavelmente esteja relacionada à não ação enzimática em amostras mais velhas, cuja atividade lipolítica já tenha atingido níveis máximos nas primeiras horas de armazenamento.

Babcock e Strobel (1954) relataram que, no processo de congelamento, a concentração de gordura apresenta comportamento variável, com aumento progressivo no teor de AGL em frações ainda líquidas (descongeladas), acompanhado por redução nas frações já congeladas das amostras. Ao final do congelamento, é destruída a capacidade de formação de “creme” e as amostras voltam a apresentar o seu teor original de AGL.

Segundo Kroger (1985), o congelamento é prejudicial à integridade das amostras devido à pressão exercida pela baixa temperatura sobre a fase cremosa, provocando a formação de cristais de gelo, os quais resultam na destruição da emulsão de gordura e rompimento das membranas de seus glóbulos, com a consequente liberação de AGL no leite.

O modelo de regressão obtido pelo presente estudo ajustou-se a um modelo quadrático com coeficiente de determinação altamente significativo ($R^2=0,86$; $p<0,05$), a partir das médias observadas para os teores de AGL em função da idade das amostras (três, seis, nove e doze dias), quando armazenadas à 7°C e a -20°C.

A partir do modelo de regressão é possível prever que, cada dia de espera pela análise, ou seja, a cada incremento de um dia na idade das amostras, tem-se um acréscimo de cerca de 0,1409 mmol de AGL/100g de gordura, em amostras resfriadas, e uma redução de 0,0942 mmol de AGL/100g de gordura em amostras congeladas, por dia de armazenamento (Figura 3).

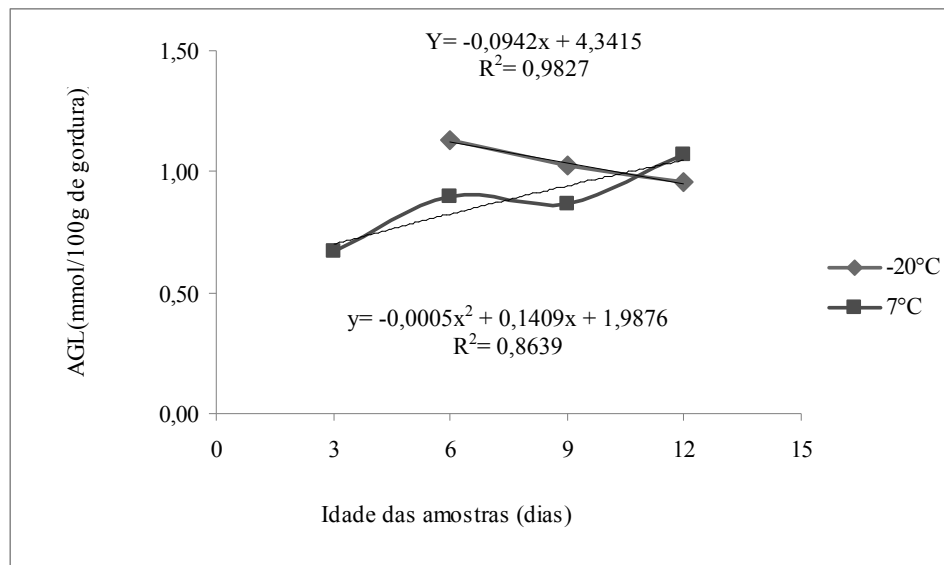


Figura 3. Análise de regressão para o componente AGL

2.4 Conclusão

Para que as análises feitas no leite para o componente AGL representem suas reais características qualitativas, as amostras devem ser analisadas em três dias, sob temperatura de resfriamento (7°C). Quanto à caseína, diferente do observado para AGL, não as suas médias não diferiram nos diferentes períodos de armazenamento avaliados. Entretanto, médias mais altas deste componente foram observadas em amostras congeladas. Portanto, as amostras devem ser mantidas resfriadas e podem ser armazenadas por até doze dias, desde que feito uso de conservante.

Referências

BABCOCK, C.J. E STROBEL, D.R. Frozen homogenized milk: IX Freezing characteristics of homogenized and unhomogenized milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.37, p. 1416-1419, 1954.

CARTIER, P.; CHILLIARD, Y. Spontaneous lipolysis in bovine Milk: combined effects of nine characteristics in native milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, p.1178-1186, 1990.

CASSOLI, L. D. ; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.39, n.2, p.434-439, 2010.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in Milk and dairy products: a review. **Journal of Food protection**, Des Moines, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

COVAS MC, ALDA E, BAEZA A, FERRER L, FERRANDEZ C. Almacenamiento de leche humana: su influencia en la composición química y desarrollo bacteriano en três momentos de la lactancia. **Archivos Argentinos de Pediatría**, Buenos Aires, v.98, p.92-98, 2000.

DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.16, p.555-562, 2006.

FOSS ANALYTICAL. **MilkoScan 6000 FT+**: Operator's Manual. Dinamarca, 2008. 90p.

FLORIS, R. E ALTING, A.C.; AALBERSBERG, W.Y. Caseins-derived peptides. In: AALBERSBERG, W.Y. **Progress in Biotechnology**. Elsevier Science: Amsterdam, 2003. p. 226-233.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.A.; LAURENT, F. Effect of storage conditions on the composition of raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.5, n.2, p.211-223, 1995.

GROTENHUIS, E.; TUINER, R.; KRUIF, C.G. Phase stability of concentrated dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.764-769, 2003.

HANUŠ, O.; VEGRICHT, J.; FRELICH, J.; MACEK, A.; BJELKA, M.; LOUDA, F.; JANŮ, L. Analysis of raw milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. **Czech Journal Animal Science**, Czech Republic, v.53, n.1, p.17-30, 2008.

ISMAIL, B.; NIELSEN, S.S. *Invited review*: Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, p.4999-5009, 2010.

KARLSSON, A.O.; IPSEN, R., SCHRADER, K.; ARDÖ, Y. Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p.3784-3797, 2005.

KINTNER, J.A. E DAY, E.A. Major free fatty acids in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, p.1575-1581, 1965.

KOCA, N.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; HARPER, W.J.; ALVAREZ, V.B. Application of fourier transform infrared spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in swiss cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, p.3596-3603, 2007.

KROGER, K. Milk sample preservation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p. 783-787, 1985.

KRUIF, C.G. Caseins. In: ASLBERSBERG, W.Y.; HAMER, R.J.; JASPERSE, P.; DE JONGH, H.H.J.; DE KRUIF, C.G.; WALSTRA, P.; DE WOLF, F.A. **Progress in Biotechnology**. Elsevier Science: Amsterdam, 2003. p.1-284.

LAW, B.A. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.46, n.3, p.573-588, 1979.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN., M.A.; BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.264-274, 2000.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; SANTOS, M. Effect of CO₂ addition to raw milk on proteolysis and lipolysis at 4°C. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.1616-1631, 2003.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effects of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v.8, p.237-242, 2007.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.102, p.17-22, 2007.

OSAWA, C.C. AND GONÇALVES, L.A.G. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p.593-599, 2006.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 2491-2503, 2003a.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D.M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 1601-1607, 2003b.

SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, C.A.F.; AUGUSTO, L.F.B.; AQUINO, A.A. Atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina, Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.4, p.832-836, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.3** Cary, 2008. 1 CD_ROM.

SLAGHUIS, B. A., BOS, K., DE JONG, O., TUDOS, A. J., TE GIFFEL, M. C. AND DE KONING, K. Robotic milking and free fatty acids. In: MEIJERING, A.; HOGEVEEN, H. and DE KONING, C. J. A. M. **Automatic milking – A better understanding**. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, 2004. p. 341–347.

SUNDHEIM, G., E G. BENGTSSON-OLIVECRONA. Lipolysis in milk induced by cooling or by heparin. Comparisons of amount of lipoprotein lipase in the cream fraction and degree of lipolysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.589-593, 1985.

THOMSON, N. AND WOOLFORD, M. **Free fatty acids in milk**. 2005. Disponível em: <<http://www.dairynz.co.nz/file/fileid/26301>>. Acesso em 15 set. 2011.

VARISCO, G.; BOLZONI, G.; CORNOLDI, M. 2004. **Casein: Determining casein in milk for the quality of dairy products**. Disponível em: <http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20latte/publicazioni/La%20caseina.pdf>. Acesso em 16 out. 2011.

VASBINDER, A.J.; ROLLEMA, H.S.; BOT, A.; KRUIF, C.G. Gelation mechanisms of milk as influenced by temperature and pH; Studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.1556-1563, 2003.

3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CASEÍNA E ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM AMOSTRAS DE LEITE CRU DE ACORDO COM A CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Resumo

A caseína e os ácidos graxos livres (AGL) são importantes componentes do leite relacionados às características industriais e sensoriais deste e de seus derivados. Entretanto, alguns fatores são responsáveis por alterações em suas concentrações, destacando-se a contagem de células somáticas (CCS). Avaliou-se o efeito da CCS sobre as concentrações de caseína e AGL no leite. O delineamento experimental adotado foi o Inteiramente Casualizado (DIC), com amostras distribuídas em arranjo fatorial 3x3x2. As fontes de variação consideradas foram classes de CCS, locais e épocas de coleta do leite. Realizando-se análise de variância, foram observados, para AGL, efeito de todas as fontes de variação, assim como, das interações entre local e época de coleta, e entre classes de CCS e época de coleta. Para a caseína, identificou-se efeito isolado de local e época de coleta, além da interação entre classes de CCS e época de coleta. Realizou-se teste de Tukey para comparação de médias dos efeitos que apresentaram interação. Na Época 1 (outubro/novembro) observou-se médias de AGL mais altas, e de caseína mais baixas, em relação à Época 2 (março/abril), sugerindo atividades lipolítica e proteolítica mais intensas. A partir dos resultados de AGL, pode-se concluir que o leite já encontra-se com altas concentrações deste componente quando coletado na propriedade rural, o qual aumenta em função da CCS, no trajeto da fazenda à indústria. Os AGL apresentaram incrementos significativos decorrido o transporte, e concentração acima do limite tolerável de “off-flavor”, indicativo de lipólise, em todas as situações avaliadas. Os resultados referentes a caseína, por outro lado, mantiveram médias semelhantes, indicando inexistente atividade proteolítica nas amostras avaliadas, desde a sua coleta nos tanques de expansão até momentos que antecederam o processamento na indústria.

Palavras-chave: Lipólise; Proteólise; Indicadores; Qualidade

Abstract

The casein and free fatty acids (FFA) are important components of milk related to industrial and sensory characteristics of this and its derivatives. However, some factors are responsible for changes in their concentrations, highlighting the somatic cell count (SCC). We evaluated the effect of CCS on the concentration of AGL and casein in the milk. The experimental design was randomized with samples distributed in a factorial arrangement (3x3x2). The sources of variation were considered CCS classes, locations and times of milk collection. Performing analysis of variance were observed for AGL, the effect of all sources of variation, as well as the interactions between local and time of collection, and between classes of CCS and time of collection. For casein identified himself isolated effect of location and time of collection, besides the interaction between CCS classes and time of collection. We conducted Tukey test to compare means that showed interaction effects. In the first time of collection (October/November) showed higher FFA medium, and lower in relation to second time of collection (March/April), suggesting lipolytic and proteolytic activities more intense. From the results of FFA, it can be concluded that the milk is already high concentrations of this component when collected on the farm, which grows with CCS, the path will farm industry. The FFA showed significant increments elapsed

transport, and concentration above the recommended levels of "off-flavor," indicative of lipolysis in all situations evaluated. The results for casein, in other hand, retained similar means, indicating absent proteolysis activity in milk samples, since its collects in the expansion tanks until moments before the processing industry.

Keywords: Lipolysis; Proteolysis; Indicators; Quality

3.1 Introdução

Altas contagens de células somáticas (CCS) no leite estão associadas, principalmente, á mastite, infecção que tem como causa a colonização da glândula mamária por bactérias patogênicas. Entretanto, outros fatores afetam a CCS indiretamente, tais como, a época do ano, o estágio de lactação e a idade da vaca (MAGALHÃES et al., 2006; KOIVULA et al., 2005).

Neste caso, são observadas alterações na composição do leite, pois há aumento da lipólise e proteólise as quais, respectivamente, refletem desestabilização das micelas de caseína, responsável pela redução em seu teor e na relação caseína/proteína total do leite; e pela liberação de ácidos graxos livres (AGL) no leite, devido à quebra de triglicerídeos (SANTOS et al., 2003b; GONZALEZ et al., 2004; CUNHA et al., 2008).

A caseína corresponde a, aproximadamente, 80% das proteínas totais do leite e está diretamente relacionada ao rendimento industrial de produtos lácteos. Incrementos de 0,1% na relação de caseína/proteína total do leite traduz-se em alteração de 0,30% na produção de queijo, para cada 100 kg de leite processado (VARISCO et al., 2004). O leite com alta CCS apresenta maior atividade proteolítica em relação ao leite normal, devido, em parte, ao aumento da plasmina proteinase, responsáveis pela hidrólise da caseína (VERDI et al., 1987).

Em relação aos AGL, este componente lipídico constitui um indicador da qualidade sensorial do leite, devido à hidrólise enzimática de triglicerídeos (SANTOS et al., 2003b). Concentrações acima do limite de 0,5 a 1,2 mmol de AGL/100g de gordura são indicadoras de elevada rancidez oxidativa, denominada de "off-flavour", ou seja, defeitos nos produtos lácteos percebidos pelos consumidores finais (HANUŠ et al., 2008). Além da alta CCS, outros fatores são responsáveis por tais alterações, como a contagem bacteriana total (CBT), nutrição, sazonalidade, agitação, mudanças na temperatura, tempo de armazenamento (DEETH et al., 2006; DICKOW et al., 2011)

Estudos desenvolvidos no Brasil referentes ao desenvolvimento de atividade lipolítica e proteolítica no leite cru refrigerado durante o trajeto da fazenda á indústria, em função da CCS, tendo em vista as alterações na composição do leite ocasionadas por estes processos,

principalmente, sobre a caseína e os AGL. Entretanto, considera-se de fundamental importância avaliar tais alterações na composição no leite, uma vez que são prejudiciais tanto para o consumidor, quanto para o rendimento da indústria. Com base na hipótese de que a CCS exerce influência sobre a composição do leite no trajeto da fazenda à indústria, realizou-se um diagnóstico de situação quanto aos teores de caseína e AGL associados à CCS neste trajeto, considerando-se também duas épocas do ano: começo das águas (outubro/novembro) e final das águas (março/abril).

3.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná, durante os meses de março, abril, outubro e novembro entre os anos de 2009 (outubro/novembro) e 2010 (março/abril).

As coletas foram realizadas em três pontos da cadeia produtiva leiteira, os quais sintetizam o trajeto entre as fazendas produtoras e as fazendas beneficiadoras. Os locais de coleta envolvidos no estudo foram: tanques de expansão de fazendas, caminhões de coleta e silos de armazenamento de leite. Objetivou-se verificar alterações na composição do leite no trajeto das fazendas produtoras às indústrias.

Totalizando 5.195 amostras de leite cru refrigerado: 3.238 amostras foram coletadas de tanques de expansão (Local de coleta 1); 1.044 de caminhões granelizados, na rota de coleta (Local de coleta 2); e 313 de silos de armazenamento de indústrias (Local de coleta 3).

As amostras de leite foram destinadas à análise laboratorial na Clínica do Leite, laboratório credenciado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado no Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Todas as amostras de leite foram armazenadas em frascos de 40 mL, contendo o conservante bronopol (Microtabs[®]), na concentração de 0,02 mg/mL, e, em seguida, analisadas quanto às concentrações de caseína (em g/mL de leite) e AGL (mmol/100 g de gordura), por meio da metodologia de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), através do equipamento *MilkoScanTM FT+*.

A partir das análises, as amostras foram caracterizadas quanto à CCS e agrupadas em três classes: ≤ 400 mil células/mL (Classe 1), de 400 a 750 mil células/mL (Classe 2) e ≥ 750 mil células/mL (Classe 3).

Os intervalos entre as classes foram determinados a partir dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa nº51, os quais vigoraram entre 2007 e 2011 (limite de 750 mil células somáticas/mL) e os quais passariam a vigorar em primeiro de julho de 2011 (limite de 400 mil células somáticas/mL), para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste.

Após a realização das análises laboratoriais, realizou-se análise estatística. O delineamento experimental adotado foi o Inteiramente Casualizado (DIC), com amostras distribuídas em arranjo fatorial (3x3x2).

As fontes de variação avaliadas sobre as concentrações de caseína e AGL foram: classes de CCS (CCS1: ≤ 400 mil, CCS2: 400-750 mil e CCS3: ≥ 750 mil), local de coleta (Local 1: tanque, Local 2: rota e Local 3: silo) e época de coleta (Época 1: março/abril e Época 2: outubro/novembro).

Os resultados obtidos foram avaliados considerando-se os efeitos da CCS, agrupada em classes, do local de coleta e da época de coleta sobre as concentrações de caseína e AGL.

No caso de interação significativa, realizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), disponível no procedimento GLM (SAS,2008). Em seguida, realizou-se análise de regressão linear para os resultados de caseína e AGL, considerando-se o efeito da CCS sobre estes componentes, utilizando o procedimento REG (SAS,2008).

3.3 Resultados e Discussão

Na rota (Local 2) e nos tanques de expansão (Local 1), o alto coeficiente de variação indicou elevada magnitude de variação dos dados referentes a amostras coletadas nestes locais em ambas as épocas de coleta, exceto amostras relacionadas à Classe 2 de CCS (400 – 750 mil células/mL), coletadas na Época 2 (março/abril), para as quais o CV foi baixo (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva das concentrações de ácidos graxos livres (AGL) nas amostras coletadas no tanque, rota e silo de acordo com a época de coleta e classes de contagem de células somáticas (CCS)

Local	Época	CCS	N	Média	Mínimo	Máximo	CV%	EP%
Tanque	1	1	608	0,521	0,031	6,451	104,61	0,022
		2	654	0,532	0,022	5,841	92,62	0,019
		3	346	0,571	0,042	2,802	69,70	0,022
	2	1	482	0,342	0,021	2,593	81,20	0,013
		2	761	0,411	0,022	4,052	95,66	0,014
		3	670	0,451	0,022	3,892	79,98	0,014
Rota	1	1	149	0,630	0,079	2,270	50,587	0,026
		2	246	0,555	0,057	1,644	43,322	0,015
		3	52	0,700	0,169	1,224	33,292	0,032
	2	1	77	0,330	0,040	0,861	49,968	0,019
		2	344	0,431	0,027	1,486	7,138	0,013
		3	165	0,428	0,051	1,042	42,396	0,014
Silo	1	1	52	0,764	0,273	2,303	0,064	0,886
		2	118	0,740	0,331	1,892	0,020	0,078
		3	12	0,688	0,480	0,916	0,036	8,170
	2	1	2	0,530	0,439	0,621	0,091	4,268
		2	87	0,424	0,081	0,806	0,018	39,467
		3	40	0,461	0,108	0,812	0,026	35,951

Época de coleta 1: outubro a novembro; Época de coleta 2: março a abril), Classes de CCS (CCS 1: ≤ 400.000 ; CCS 2: 400.000 a 750.000 células/mL; CCS 3: 750.000 células/mL); CV= coeficiente de variação; EP= erro padrão.

Amostras coletadas no silo (Local 3), tanto na Época 1, quanto na Época 2, apresentaram pequena amplitude de variação, provavelmente devido ao menor número de observações, em relação aos demais locais de coleta (Tabela 1).

Foram observados aumentos nas concentrações de AGL durante o trajeto da fazenda até a indústria, tanto do Local 1 para o Local 2, quanto deste último, para o Local 3. As médias de AGL observadas na Época 1 (outubro/novembro) foram superiores às observadas na Época 2, sugerindo atividade lipolítica mais intensa na Época 1, em relação à Época 2 (Tabela 1).

Em relação à caseína, nas Épocas 1 e 2, foi observado baixo coeficiente de variação em amostras coletadas no Local 1 (tanques de expansão), independente da classe de CCS á qual as amostras estavam associadas.

Tabela 2. Análise descritiva das concentrações de caseína nas amostras coletadas no tanque, rota e silo de acordo com a época de coleta e classes de contagem de células somáticas (CCS)

Local	Época	CCS	N	Média	Mínimo	Máximo	CV (%)	EP (%)
Tanque	1	1	668	2,413	1,912	3,191	5,352	0,005
		2	690	2,422	1,871	3,101	5,531	0,005
		3	352	2,411	1,982	3,091	5,094	0,007
	2	1	576	2,563	2,122	3,271	6,123	0,007
		2	837	2,521	2,163	3,241	5,532	0,005
		3	715	2,532	2,093	3,212	5,618	0,005
Rota	1	1	150	2,382	2,080	2,610	3,220	0,006
		2	247	2,384	2,170	2,630	3,213	0,056
		3	52	2,381	2,090	2,560	3,152	0,010
	2	1	81	2,496	2,200	2,740	3,315	0,009
		2	348	2,505	2,190	2,730	2,925	0,004
		3	166	2,512	2,230	2,720	3,151	0,006
Silo	1	1	52	2,394	2,310	2,500	0,005	1,632
		2	118	2,382	2,250	2,470	0,004	1,665
		3	12	2,396	2,320	2,450	0,010	1,384
	2	1	2	2,430	2,390	2,470	0,040	2,328
		2	88	2,479	2,190	2,600	0,007	2,527
		3	41	2,490	2,390	2,570	0,007	1,840

Época1: outubro a novembro; Época2: março a abril; Classes de CCS (CCS1: ≤ 400.000 ; CCS2: 400.000 a 750.000 células/mL; CCS3: 750.000 células/mL); CV= coeficiente de variação; EP= erro padrão.

Foi observada redução na concentração de caseína de acordo com a CCS. As menores médias de caseína ocorreram na Época 1, Local de coleta 2, associadas à CCS3. Já as maiores médias estiveram associadas também à Época 2, entretanto, ao Local de coleta 1 e à CCS1.

Nos silos das indústrias (Local 3), também para caseína, o coeficiente de variação foi de pequena magnitude, o que pode ser decorrente do menor número de amostras em relação aos Locais 1 e 2.

3.3.1 Análise de variância

Considerando-se as concentrações de AGL, a partir da análise de variância, observou-se haver efeito significativo dos fatores: Local de coleta (tanque, rota e silo), Época de coleta (março/abril e outubro/novembro) e Classe de CCS (≤ 400 mil; 400-750 mil; ≥ 750 mil células/mL). Interações entre os fatores: Local e Época de coleta e Época de coleta e Classes de CCS, foram observadas.

Já para a caseína, foram observados efeitos dos fatores: Local de coleta e Época do ano, assim como, da interação entre Época de coleta e Classes de CCS (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da variância para a caseína e AGL do leite, de acordo com os efeitos de local de coleta, época do ano e classe de CCS.

Causas de variação	Níveis de significância	
	AGL	Caseína
Local de coleta	<0,0001	<0,0001
Época do ano	<0,0001	<0,0001
Classes de CCS	<0,0005	0,3024
Local*Época	<0,0005	0,5015
Local* Classes de CCS	0,6278	0,5290
Época* Classes de CCS	<0,0005	<0,0001
Resíduo	0.14	0.01
CV(%)	79.71	5.04
R ²	0.054	0.19

Local (Tanque, Rota e Silo; Época de coleta (Março e Abril; Outubro a Novembro); Classes de CCS (CCS1≤400.000 células/mL; CCS2:401.000-750.000 células/mL; CCS3>750.000 células/mL).

3.3.2 Local de coleta e a concentração de caseína

As médias obtidas de caseína apresentaram diferença significativa entre os locais de coleta, entretanto, apresentaram redução gradual, do tanque de expansão (2,47g/L(0,002)a) para a rota (2,45g/L(0,004)b) e de ambos para o silo (2,44g/L(0,009)c).

As razões para o exposto podem estar relacionadas à atividade da plasmina e outras proteases envolvidas na proteólise, as quais podem ter intensificado sua atividade com a mistura do leite de diferentes origens, dos tanques de expansão, nos caminhões de coleta, e ainda mais com a mistura dos caminhões, nos silos das indústrias.

A redução da relação caseína/proteína total em leite com alta CCS foi descrita por Segundo Santos et al. (2003a), os quais atribuíram o efeito à proteólise da caseína, uma vez que a plasmina, principal enzima endógena responsável pela degradação de caseína no leite, faz com que haja proteólise da caseína no úbere antes da ordenha, na presença de mastite.

Segundo Murphy et al. (1989), alta CCS, quando tem como causa a mastite, modifica o mecanismo sintético de secreção do leite, causando alterações nas concentrações de caseína e proteína do soro. A proteína do soro tem sua concentração aumentada e, conseqüentemente, a razão caseína/proteína total diminui. Desta forma, o leite com alta CCS e, da mesma forma, com menor razão caseína/proteína total, das fazendas com CCS3 (≥750 mil células somáticas/mL), quando misturado, nos caminhões de coleta, ao leite com CCS1 e CCS2 (≤400 mil e 400-750 mil células somáticas/mL), altera a composição do leite resultante da mistura dos tanques nos caminhões de coleta e silos de indústrias com menor concentração de caseína.

3.3.3 Interação entre época de coleta e classes de CCS sobre a concentração de caseína

Considerando-se o efeito da classe de CCS (≤ 400 mil; 400-750 mil; ≥ 750 mil células/mL) sobre a caseína nas duas épocas de coleta do leite (outubro/novembro e março/abril), tanto na Época 1 quanto na Época 2, as médias de caseína não diferiram, sendo iguais em todas as classes de CCS (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação de médias de caseína em amostras agrupadas de acordo com as classes de CCS e épocas de coleta.

		Classes de CCS		
		CCS1	CCS2	CCS3
		Caseína (g/L de leite)		
Época de coleta	Época 1 (out/nov)	2,53 ^A (0,010)	2,50 ^A (0,005)	2,51 ^A (0,007)
	Época 2 (mar/abr)	2,39 ^B (0,007)	2,40 ^B (0,005)	2,40 ^B (0,010)

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a Classe de CCS: CCS1, CCS2 e CCS3 (≤ 400 mil; 400-750mil; ≥ 750 mil células/mL). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a Época de coleta das amostras: Época1 (outubro/novembro) e Época2 (março/abril).

Por outro lado, considerando-se o efeito da Época de coleta sobre a concentração de caseína, as médias diferem dentro de cada classe de CCS. As maiores médias de caseína, considerando-se todas as classes de CCS avaliadas (CCS 1, CCS 2 e CCS 3), foram observadas na Época 2, em relação à Época 1 (Tabela 4).

Amostras coletadas na Época 2 (março/abril), tiveram os teores médios de caseína associados à amostras com alta CCS, reduzidos; e teores médios de caseína mais altos associados à amostras com baixa CCS, sugerindo correlação entre as variáveis. Esta associação, por outro lado, não foi observada na Época 1 (outubro/novembro), período no qual as médias de caseína não diferiram, considerando-se o efeito das classes de CCS sobre a concentração de caseína (Tabela 4).

Verdi et al. (1987) descreveram que, amostras com alta CCS apresentam menor concentração de caseína, em comparação com amostras com baixa CCS. Aumentos na CCS associam-se à menores concentrações de proteína verdadeira, uma vez que, juntamente com a redução da caseína, há redução na relação caseína/proteína total e maior atividade proteolítica em amostras com alta CCS, indicada pela relação caseína/proteína total (VERDI et al., 1987).

Por outro lado, Ogola et al. (2007), avaliando o efeito da CCS sobre os componentes do leite, observaram não haver diferença significativa entre as frações protéicas de amostras de leite.

Entretanto, os autores observaram que as médias relativas à relação caseína/proteína total foram maiores em quartos saudáveis, em comparação com quartos infectados, indicando menor proteólise em quartos saudáveis. Além disso, a fração não-caseína apresentou aumento significativo, acompanhando o aumento da CCS, elevação que teve correspondente redução na relação caseína/proteína total de 1,8 a 4,5% na em quartos com alta CCS.

Ng-Kwai-Hang (1984) observaram correlação negativa entre a CCS e concentração caseína no leite ($r=-0,03$). Segundo os autores, a caseína não está associada significativamente com a CCS. Entretanto, a concentração de proteína total esteja fortemente associada à CCS, assim como a relação caseína/proteína total, a qual apresenta aumento em amostras com alta CCS (NG-KWAI-HANG,1984). Ogola et al. (2007), observaram correlação alta e negativa entre a CCS, agrupada em classes, e a razão caseína/proteína total ($r=-0,83$), assim como, observaram correlação altamente positiva entre a CCS e a fração não-caseína ($r=0,70$).

Como justificativa para a correlação existente entre a CCS e as frações protéicas do leite, encontra-se o fato do leite com alta CCS apresentar maior atividade proteolítica em relação ao leite normal, devido ao aumento das plasminas proteinases, responsáveis pela hidrólise da caseína. A redução na síntese e secreção de caseína em animais com mastite, uma das responsáveis pelo aumento na CCS, possui relação com a degradação desta fração por proteases endógenas ou exógenas (bacterianas) e com os danos causados ao epitélio secretor por toxinas bacterianas (NG-KWAI-HANG,1984).

Verdi et al. (1987) descreveram que o aumento da CCS possui relação direta com o aumento do tempo de coagulação do coalho, com as perdas de gordura no soro do leite, perdas na produção de coalhada e alterações na rigidez e umidade da coalhada.

3.3.4 Interação entre local e época de coleta sobre as concentrações de AGL

Em relação à interação entre o local e época de coleta, na Época 1 (outubro a novembro), as médias de AGL foram superiores às médias obtidas na Época 2 (março a abril). De forma semelhante, foram observadas concentrações médias de AGL mais baixas no Local 1 (tanque), em relação às observadas no silo Local 3 (silo). As diferenças nas médias de AGL observadas entre os locais de coleta foram significativas (Tabela 5).

Em contrapartida, na Época 2 (março a abril), a concentração de AGL no leite aumentou no percurso da fazenda (tanque) à indústria (silo).

Tabela 5. Comparação de médias de ácidos graxos livres (AGL) em amostras agrupadas de acordo com o local e a época de coleta

Época de coleta	Época	Local de coleta		
		Local 1	Local 2	Local 3
		AGL (mmol/100g de gordura)		
Época 1	Época 1	0,68 ^{Ac} (0,010)	0,77 ^{Ab} (0,020)	0,86 ^{Aa} (0,034)
	Época 2	0,59 ^{Bc} (0,009)	0,64 ^{Bb} (0,018)	0,66 ^{Ba} (0,040)

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerados o Local de coleta (Local 1: tanque; Local 2: rota; Local 3: silo). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a Época de coleta das amostras: Época1 (outubro/novembro) e Época2 (março/abril).

Em relação ao local de coleta, Azzara e Dimick (1985) observaram aumento nas concentrações de AGL iniciais, no tanques de expansão (Local 1), assim como alta incidência de lipólise no armazenamento (silo). As principais causas descritas foram: atividade enzimática das lípases ativada sob condições adversas (lipólise induzida) ou por mudanças nas condições fisiológicas e bioquímicas.

A enzima lipoproteína lipase, em leite normal, está associada principalmente à fração caseína e tem sua atividade inibida pela elevada concentração de cloreto de sódio (NaCl), entretanto, o efeito inibitório é dependente de outros fatores do sistema (AZZARA e DIMICK, 1985). O aumento da lipólise está relacionado à maior associação da lipase com o glóbulo de gordura, à lecitina, adsorvida à membrana dos glóbulos de gordura, que, em leite normal, consistiria em uma barreira à lipólise (MURPHY et al., 1989).

Os resultados observados no presente estudo indicam que o leite ainda na fazenda, nos tanques de expansão, já se encontravam com altos valores de AGL ($>0,5$ mmol/100g de gordura), atingindo limites de rancidez hidrolítica apresentados por (HANUŠ et al., 2008). Estudos desenvolvidos por Slaghuis et al. (2004) e Abeni et al. (2005) justificaram que o aumento do AGL ainda na fazenda pode estar relacionado aos equipamentos de ordenha mecânica e homogeneização dos tanques de expansão.

Com o aumento do número de ordenhas, pode-se observar aumento, portanto, de ácidos graxos de cadeia curta no leite, devido a maior frequência de ordenha (SLAGHUIS et al., 2004). De tal forma, o leite chega na indústria com intensa atividade lipolítica, o que reflete, na presença de “off-flavor”, em derivados lácteos, como o queijo, produzido com leite com alta concentração de AGL.

3.3.5 Interação entre época de coleta e classes de CCS sobre a concentração de AGL

Em relação à interação de época de coleta e classes de CCS, as médias de AGL observadas na época 1 (outubro a novembro) foram superiores em todas as classes de CCS, sendo significativa a diferença dentro de as classes de CCS, assim como, entre os períodos avaliados (Tabela 5).

Tabela 2. Comparação de médias de ácidos graxos livres (AGL) em amostras agrupadas de acordo com o a época de coleta e a classe de CCS

		Classe de CCS		
		CCS 1	CCS 2	CCS 3
		AGL (mmol/100g de gordura)		
Época de coleta	Época 1	0,75 ^{Aa} (0,021)	0,76 ^{Aa} (0,015)	0,80 ^{Aa} (0,029)
	Época 2	0,59 ^{Ba} (0,030)	0,63 ^{Bb} (0,016)	0,66 ^{Ba} (0,021)

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerado a Classe de CCS (CCS1: ≤ 400 mil; CCS2: 400-750; ≥ 750 mil células/mL). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), ao ser considerada a Época de coleta das amostras: Época1 (outubro/novembro) e Época2 (março/abril).

Dentro de cada período, observou-se médias superiores nas médias de AGL, em relação ao aumento na CCS. Na Época 2 (março a abril), houve diferença entre as médias obtidas na classe 1 (≤ 400.000 cél/mL), em relação às demais, que não diferiram. Entretanto, na Época 1 (outubro a novembro), apesar do aumento gradual observado em relação às classes de CCS, as diferenças não foram significativas, conforme (Tabela 5).

Santos al. (2003a) não observaram variação significativa nas concentrações de AGL do leite em função das classes de CCS, quando comparadas amostras com baixas (100.00 células/mL) e altas (1.000.000 células/mL) CCS. Portanto, os autores sugeriram que as enzimas responsáveis pela degradação da gordura não estão, necessariamente, associadas à presença de células somáticas no leite.

Entretanto, Ogola et al. (2007), observaram efeito significativo da CCS sobre a concentração de AGL, ou seja, as médias de AGL aumentaram proporcionalmente às médias de CCS. Os autores mensuraram a concentração de AGL no leite em valor de grau ácido (meq/100g de gordura) e observaram alta correlação entre as concentrações de AGL e CCS ($R=0,75$) e um aumento de 0,16 a 0,37 na concentração de AGL em quartos com alta CCS (500.000 células/mL). Desta forma, altas concentrações de CCS no leite estão associadas a altos valores de AGL, afetando a qualidade nutricional, sensorial e a vida de prateleira (OGOLA et al., 2007).

3.4 Conclusão

Conclui-se que a CCS exerce influência sobre as concentrações de caseína e AGL no leite cru, entretanto, a correlação existente entre a CCS e estes componentes é significativa. Os AGL, desde a coleta do leite dos tanques de expansão, apresentaram alta concentração nas amostras, o que dificulta avaliar a lipólise da fazenda à chegada do leite aos silos das indústrias.

Referências

ABENI, F.; DEGANI, L.; CALZA, F.; GIANGIACOMO, R.; PIRLO, G. Milk quality and automatic milking: Fat globule size, natural creaming and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.3519–3529, 2005.

AZZARA, C. D. and DIMICK, P.S. Lipoprotein Lipase Activity of Milk from Cows with Prolonged Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.3171-3175, 1985.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R. ; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, p.19-24, 2008.

DEETH, H.C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.16, p.555-562, 2006.

DICKOW, J.A.; LARSEN, L.B.; HAMMERSHØJ, M.; WIKING, L. Cooling causes in the distribution of lipoprotein lipase and milk fat globule membrane proteins between the skim milk and cream phase. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.94, p.646-656, 2011.

GONZALEZ, H.L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R. et al. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, p.1531-1543, 2004.

HANUŠ, O.; VEGRICHT, J.; FRELICH, J.; MACEK, A.; BJELKA, M.; LOUDA, F.; JANŮ, L. Analysis of raw milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. **Czech Journal Animal Science**, Czech Republic, v.53, n.1, p.17-30, 2008.

KOIVULA, M.; MÄNTYSAARI, E.A.; NEGUSSIE, E.; SERENIUS, T. Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.827-833, 2005.

MAGALHÃES, H.R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V.L.; DE PAZ, C.C.P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.2, p.415-421, 2006.

MURPHY, S.C.; CRANKER, K.; SENYK, G.F.; BARBANO, D.M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.72, p.620-626, 1989.

NG-KWAI-HANG, K.F.; HAYES, J.F.; MOXLEY, J.E.; MONARDES, H.G. Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 361-366, 1984.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effects of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v.8, p.237-242, 2007.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; BARBANO, D.M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 2491-2503, 2003a.

SANTOS, M.V.; MA, Y.; CAPLAN, Z.; BARBANO, D.M. Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 1601-1607, 2003b.

SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, C.A.F.; AUGUSTO, L.F.B.; AQUINOL, A.A. Atividade lipolítica do leite com células somáticas ajustadas para diferentes níveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, p.832-836, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.3** Cary, 2008. 1 CD_ROM.

SLAGHUIS, B. A., BOS, K., DE JONG, O., TUDOS, A. J., TE GIFFEL, M. C. AND DE KONING, K. Robotic milking and free fatty acids. In: Meijering, A.; Hogeveen, H. and DE KONING, C. J. A. M. **Automatic milking** – A better understanding. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, 2004. p. 341–347.

VARISCO, G.; BOLZONI, G.; CORNOLDI, M. 2004. **Casein**: Determining casein in milk for the quality of dairy products. Disponível em: <http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20latte/publicazioni/La%20caseina.pdf>. Acesso em 16 out. 2011.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E.; SENYK, G.F. Variability in true protein, casein, non protein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, p.230-242, 1987.