

## **LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO E FATORES QUE AFETAM A ESTABILIDADE DO LEITE**

(Not acid unstable milk and factors affecting the stability of milk)

Rafaella Belchior BRASIL<sup>1\*</sup>; Edmar Soares NICOLAU<sup>1</sup>; Marco Antônio Pereira da SILVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Goiás.

### **RESUMO**

Estabilidade do leite refere-se à resistência relativa do leite em suportar o tratamento térmico industrial sem sofrer coagulação. A estabilidade do leite ao teste do álcool em princípio, é utilizada para identificar amostras de leite com alta contaminação bacteriana, devido às más condições de higiene e de conservação durante a produção primária, o que causa menor estabilidade durante o tratamento térmico. No entanto, pode ocorrer precipitação da proteína no teste do álcool, sem, haver acidez acima de 0,18g/ácido láctico/100mL de leite, denominado de leite instável não ácido, que é um problema que acomete rebanhos leiteiros e/ou indústrias lácteas, que se caracteriza pela perda de estabilidade da proteína, o que resulta em precipitação na prova do álcool 72% sem, haver acidez acima de 0,18g/ácido láctico/100mL de leite, gerando prejuízos a todos os elos da cadeia, já que o leite mesmo apto ao beneficiamento, sem acidez elevada é rejeitado ou subvalorizado pela indústria. No Brasil, a incidência do leite instável não ácido ainda carece de diagnóstico devido à falta de trabalhos de pesquisa, por ser um problema multifatorial, pois a estabilidade térmica do leite é um dos fatores importantes para aumentar a vida-de-prateleira de derivados lácteos, garantir adequadas condições de processamento e proporcionar maior qualidade ao consumidor final.

**Palavras-chave:** Estabilidade térmica, micelas de caseína, teste do alizarol

### **ABSTRACT**

Stability of milk refers to the milk relative resistance to withstand the heat treatment without undergoing industrial coagulation. The stability of milk to test the alcohol in principle, is used to identify milk samples with high bacterial contamination due to poor hygiene and conservation during primary production, which causes less stability during heat treatment. However, precipitation of the protein in the test for alcohol, can occur without, having acidity above 0.18g/lactic acid/100 ml of milk, milk does not called unstable acid which is a problem affecting dairy herds and / or dairy industries which is characterized by the loss of protein stability, resulting in the precipitation test of 72% ethanol, no significant acidity above 0.18g/lactic acid/100 ml of milk, thus impairing all chain links, as the same room for processing milk without high acidity is rejected or undervalued by the industry. In Brazil, the incidence of not acid unstable milk still lacks diagnosis due to lack of research, to be a multifactorial problem, since the thermal stability of milk is one of the important factors to increase the shelf-life of dairy derivatives, ensure adequate processing conditions and provide higher quality to the final consumer.

**Key-words:** Thermal stability, casein micelles, alizarol test

---

\* Endereço para correspondência:  
E-mail: [rafaellabelchior@hotmail.com](mailto:rafaellabelchior@hotmail.com)

## INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite está exigindo cada vez mais, matéria-prima de qualidade, que apresente bom rendimento e que não comprometa o processamento industrial.

Desta forma, para a produção de derivados lácteos com qualidade e maior segurança alimentar para o consumidor, é importante que o setor produtivo e as indústrias de processamento tenham conhecimento da composição, grau de contaminação e estabilidade do leite, que são aspectos importantes no destino da matéria-prima para o processamento mais adequado, evitando problemas durante a industrialização e armazenamento dos derivados lácteos (Silva et al., 2012).

A contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição química e caracterização física do leite, como a estabilidade térmica estão entre os padrões de qualidade preconizados pela Instrução Normativa 62/2011 (IN 62/2011), (Brasil, 2011).

Estabilidade do leite refere-se à resistência relativa do leite em suportar o tratamento térmico industrial sem sofrer coagulação. Para estimar a estabilidade e acidez do leite nas propriedades, antes do carregamento para a indústria, é utilizado o teste do álcool ou alizarol (solução alcoólica com alizarina), cujos procedimentos são regulamentados pela IN 62/2011.

A estabilidade do leite ao teste do álcool em princípio, é utilizada para identificar amostras de leite com alta contaminação bacteriana, devido às más condições de higiene e de conservação durante a produção primária, o que causa menor estabilidade durante o tratamento térmico.

No entanto, pode ocorrer precipitação da proteína no teste do álcool, sem, haver acidez acima de 0,18g/ácido láctico/100mL de leite, denominado de leite

instável não ácido (LINA), que é um problema que acomete rebanhos leiteiros e/ou indústrias lácteas.

O leite com baixa estabilidade térmica pode coagular durante o processo de pasteurização ou Ultra Alta Temperatura (UAT), aderindo-se aos equipamentos de processamento, o que resulta em elevação dos custos de limpeza e aumento no descarte de leite.

Observando o crescente reconhecimento da importância da qualidade do leite, tanto pelas empresas, órgãos de fiscalização e regulação quanto pelos consumidores cada vez mais exigentes, objetivou-se com este estudo revisar sobre o leite instável não ácido, assim como os fatores que afetam a estabilidade do leite.

## DESENVOLVIMENTO

### 1. Qualidade do leite

A qualidade do leite é determinada por aspectos de composição e higiene, que podem ser resumidos em qualidade higiênica ou inocuidade, qualidade nutricional, sensorial e tecnológica (Monardes, 2004).

O leite deve apresentar composição química, composta por sólidos totais, gordura, proteína, lactose e minerais, microbiológica, baseada na contagem total de bactérias, que auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha, uma vez que a ocorrência de resultados elevados pode indicar a existência de falhas generalizadas nos procedimentos de ordenha e refrigeração do leite na propriedade (Soriano et al., 2001), sensorial, relacionada ao sabor, odor, aparência e número de células somáticas (CS) que atendam aos parâmetros exigidos pela legislação (Zanela, 2006).

A composição do leite varia de acordo com fatores como raça, idade, saúde da glândula mamária, estágio de lactação,

manejo nutricional e estações do ano (Dobranić et al., 2008).

É composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3% a 3,5%; gordura, 3,5% a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (Sgarbieri, 2005).

Já as CS são, normalmente, células de defesa (leucócitos) do organismo que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater agentes agressores e compreendem de 80% a 98%, sendo as demais, células epiteliais dos alvéolos, de 2% a 20% do total (Shallibaum, 2001).

Os consumidores estão exigindo, cada vez mais, que alimentos sejam seguros, nutritivos e tenham sabor de produto fresco. Dessa forma, o objetivo dos programas de qualidade do leite é assegurar que a qualidade nutritiva, o sabor e a aparência sejam preservados, e que micro-organismos patogênicos e adulterantes não estejam presentes (Zanela et al., 2006).

Deste modo, os padrões mínimos estabelecidos para o recebimento industrial do leite com relação à composição química são: 3,0% de gordura, 2,9% de proteína e 8,4% de sólidos desengordurados. Os valores máximos preconizados para CCS e CBT são decrescentes, em três etapas, até 30/06/2014, até 30/06/2016 e após esta data, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país com valores máximos de 600 mil CS/mL, 500 mil CS/mL e 400 mil CS/mL e 600 mil UFC/mL, 300 mil UFC/mL e 100 mil UFC/mL, respectivamente (Brasil, 2011).

Tsenkova et al. (2001) relataram que a CCS presente na secreção láctea é um indicador geral da saúde da glândula mamária, amplamente utilizado como indicador de mastite subclínica, sendo aceita, também, como medida padrão para determinar a qualidade do leite.

Além disso, o aumento da CCS está associado com reduções na caseína, gordura e lactose do leite, aumento da atividade enzimática e redução da qualidade e rendimento dos produtos lácteos (Reis et al., 2013).

Com relação à caracterização física, o leite deve apresentar acidez titulável de 0,14 a 0,18g/ácido láctico/100mL de leite e deve ser estável em solução alcoólica com 72% de etanol, que atualmente é a graduação mínima obrigatória, (Brasil, 2011). No entanto, graduações de 76%; 78% e até 80% têm sido praticadas por diversas indústrias, na expectativa de selecionar leite de melhor qualidade.

O volume de leite industrializado, no 1º trimestre de 2013 foi de 5,669 bilhões de litros, e 92,5% do leite adquirido teve origem de estabelecimentos sob inspeção federal, 6,7% de estabelecimentos sob inspeção estadual e o residual, sob municipal, o preço líquido pago aos produtores foi de R\$ 0,87 por litro na média nacional para o produto entregue em março (IBGE, 2013).

Assim, para que a demanda de leite possa ser atendida e para que o Brasil consiga conquistar novos mercados, é preciso qualificar todos os elos da cadeia produtiva de modo a garantir qualidade e a produção segura de alimentos.

## **2. Teste do álcool**

Após a ordenha e posterior resfriamento do leite, a primeira análise a que o leite é submetido para averiguar a sua qualidade é o teste do álcool. Este teste é realizado nas propriedades rurais antes do recebimento do leite pelo transportador e novamente é realizado na plataforma de recebimento do leite nas indústrias (Fischer et al., 2012).

Essa prova avalia a estabilidade das proteínas lácteas submetidas à desidratação provocada pelo álcool e é

usada para estimar a estabilidade do leite quando submetido ao tratamento térmico (Omoarukhe et al., 2010).

Consiste na mistura de partes iguais de leite e álcool 72% (Stumpf et al., 2013), com a qual se avalia a formação de um precipitado ou coagulação, uma vez que a adição de etanol ao leite induz várias alterações nas micelas de caseína, como o colapso da camada de  $\kappa$ -caseína, a redução na carga micelar e a precipitação do fosfato de cálcio, que colaboram para a redução da estabilidade micelar da  $\kappa$ -caseína, com consequente coagulação (O'Connell et al., 2006).

Quando ocorre a precipitação das frações protéicas do leite, o resultado é positivo e conclui-se que o leite é instável ao teste do álcool, sendo que o resultado dessa prova determinará o aceite ou a rejeição do leite por parte da indústria.

Os resultados positivos dessa prova podem ser observados quando ocorre acidez excessiva do leite decorrente da fermentação da lactose e produção de ácido láctico, causada por micro-organismos (Battaglini et al., 2013) tal acidez é considerada um dos principais fatores da estabilidade reduzida do leite, além disso, tem sido relatado que mudanças repentinas na dieta dos animais, subalimentação, bem como acidose metabólica também podem diminuir a estabilidade do leite (Zanela et al., 2006; Marques et al., 2010; Marques et al., 2011).

Entretanto, essa prova tem apresentado resultado positivo em leite com valores de pH e acidez aceitáveis (pH: 6,6 a 6,8 e/ou acidez titulável de 0,14 a 0,18g/ácido láctico/100mL de leite) e CCS, CBT dentro dos valores adequados (Costabel et al., 2011). De acordo com Oliveira et al. (2011), 40% a 50% das amostras de leite apresentando acidez dentro dos valores aceitáveis, precipitam no teste álcool, sendo o produtor penalizado

por ter o leite descartado de forma injustificada.

A indústria busca utilizar graduações alcoólicas cada vez mais elevadas na triagem do leite, na tentativa de obter matéria-prima de melhor qualidade e garantir leite estável a temperaturas mais elevadas de beneficiamento, principalmente para produção de leite UAT, porém a correlação entre o aumento da graduação alcoólica e o aumento na resistência térmica, não é verdadeira (Molina et al., 2001).

Oliveira et al. (2011), no estado de São Paulo, coletaram 451 amostras de leite, sendo 217 no período chuvoso e 234 no período seco, de propriedades leiteiras fornecedoras para usinas de beneficiamento de leite e observaram que a graduação de 72% pode ser eficaz, pois não houve aumento do número de amostras positivas, caracterizadas pela precipitação da proteína, com o aumento da concentração do álcool Fig. 1.

No entanto, alguns autores demonstraram que o aumento progressivo da graduação alcoólica, resultou no aumento de amostras positivas (Molina et al., 2001; Silva et al., 2012). Assim, a atual forma de utilização do teste do álcool deveria ser reavaliada, deixando de ser um teste utilizado para o aceite ou a rejeição de leite por parte da indústria e passando a ser uma análise para a destinação do uso de matéria-prima dentro da indústria.

### **3. Leite instável não ácido (LINA)**

O aparecimento do leite que reage positivamente à prova do álcool, sem apresentar acidez elevada, provir de vacas com mastite ou leite alterado, trata-se de um problema prático que é vivenciado com alguma frequência nos rebanhos leiteiros. Este tipo de alteração teve diferentes denominações dependendo do local onde foi estudado, como por exemplo, Leite

instável não ácido (LINA) e Síndrome do leite anormal (SILA) (Ceballo, 2011).

Assim, quando a perda da estabilidade não está associada à contaminação bacteriana e não é causada pela acidez elevada, pode ser considerada LINA, que se caracteriza pela perda de estabilidade da proteína, o que resulta em precipitação na prova do álcool 72% sem, haver acidez acima de 0,18g/ácido láctico/100mL de leite, Fig. 2. Desta forma, ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas do leite, podendo alterar a qualidade nutricional (Marques et al., 2007).

Em estudo realizado no noroeste do Rio Grande do Sul, Zanela et al. (2009) analisaram 2.396 amostras de leite e observaram que a ocorrência de LINA ao álcool 76% foi de 55,2%. Esta ocorrência causa significativos prejuízos a toda cadeia produtiva, uma vez, que o leite é rejeitado ou subvalorizado pela indústria, mesmo que este apresente níveis de acidez considerados normais, estando apto para ser processado (Roma Junior et al., 2009).

Pois sendo a caseína instável, o aumento da temperatura durante o processamento térmico pode promover a coagulação do leite, trazendo grandes transtornos à indústria (Silva et al., 2012), como deposição de proteínas nos equipamentos, ocasionando maior número de interrupções do funcionamento para limpeza dos mesmos, problema que não inviabiliza o processamento, mas gera dificuldades e aumento de custos (Marques et al., 2007).

Além disso, essa alteração bioquímica é associada à gelatinização do leite UAT, um dos principais problemas que afetam este produto (Nornberg et al., 2009), que é um dos lácteos mais consumidos, tendo em vista a praticidade de conservação, de uso e também ao longo

período de vida comercial (Martins et al., 2008).

A utilização do LINA na indústria pode ocasionar menor rendimento no processamento industrial, uma vez que este tipo de leite pode apresentar menores teores de lactose, proteína e em algumas situações gordura (Fischer et al., 2012).

Entretanto, Ribeiro et al. (2006) realizaram um experimento no qual o leite proveniente de vacas da raça Jersey com resultado positivo e negativo ao álcool 76%, foi submetido ao processo de elaboração do iogurte batido. Esses autores não constataram alterações no tempo de fermentação, pH e viscosidade do iogurte batido elaborado com LINA.

Costabel (2009) utilizou leite instável ao álcool 72% e 80% no processamento industrial de queijo e observou que a porcentagem de retenção de proteína no coágulo foi maior nas amostras que apresentaram instabilidade ao álcool 72%. As instáveis ao álcool 80% tiveram uma maior porcentagem de retenção de gordura e sólidos totais. Porém, isso não resultou em mudanças no rendimento industrial e não foram observadas diferenças significativas entre o processamento de queijo com amostras positivas e negativas ao teste do álcool a 72% e 80%. Deste modo, este tipo de leite pode ser utilizado na fabricação de produtos lácteos, pois o mesmo não apresenta problemas à saúde pública.

No Brasil, a incidência do LINA ainda carece de diagnóstico devido à falta de trabalhos de pesquisa, por ser um problema multifatorial, pois a estabilidade térmica do leite é um dos fatores importantes para aumentar a vida-de-prateleira de derivados lácteos, garantir adequadas condições de processamento e proporcionar maior qualidade ao consumidor final.

#### 4. Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite

Cerca de 95% da caseína do leite estão presentes na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas, que são responsáveis pela estabilidade térmica do leite (Fox & Brodtkorb, 2008).

A coagulação do leite por aquecimento prolongado a altas temperaturas é uma consequência da perda de estabilidade das micelas de caseína, como resultado de numerosas mudanças físicas e químicas dos componentes (Singh, 2004). Devido a este aquecimento, a quantidade de fosfato de cálcio associado às micelas aumenta e ocorre dissociação da  $\kappa$ -caseína, diminuindo a estabilidade (O'Connell et al., 2006).

Além disso, micelas de caseína de maior tamanho são menos resistentes ao aquecimento do que micelas de menor diâmetro, devido ao menor conteúdo de  $\kappa$ -caseína, o que as torna mais susceptíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Connell & Fox, 2000) que, em quantidades elevadas, diminui consideravelmente a capacidade da caseína em manter sua estrutura física, causando uma desestruturação micelar e consequente aumento da hidrofobicidade, o que determina maior agregação das micelas (Philippe et al., 2003).

O pH é outro fator importante para se determinar a estabilidade do leite, em pH abaixo de 6,2 a estabilidade térmica do leite é mínima, uma vez que a quantidade de cálcio iônico no leite se eleva, aumentando a chance de ocorrer a precipitação. Esta acidificação reduz a carga e a hidratação das proteínas e as ligações que mantêm as micelas de caseína juntas são mais fracas e escassas a pH 5,2 ou 5,3 (O'Connell et al., 2006).

De acordo com Holt (2004), o leite mastítico e do final da lactação têm três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da

lactação. O fator responsável por este efeito é o aumento no pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e íons, uma vez que a mastite altera a permeabilidade vascular das células secretoras de leite, afetando o equilíbrio salino do leite (Na, Cl, Ca, P e K).

Além disso, leite com alta CCS possui atividade enzimática elevada, o que contribui para o aumento da proteólise e lipólise, tanto antes da ordenha (no úbere) como após a ordenha, durante o armazenamento (Deeth, 2006).

Os lisossomos dessas células contêm enzimas proteolíticas, dentre as quais a catepsina D, que pode produzir para- $\kappa$ -caseína e caseínomacropéptido a partir da  $\kappa$ -caseína que em altas concentrações, pode causar a coagulação do leite (Hurley et al., 2000).

A qualidade microbiológica do leite é influenciada pela saúde do rebanho e pela higiene praticada na cadeia produtiva (Fagundes et al., 2006), sendo que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração devem ser adequadas para minimizar a contaminação microbiana e a multiplicação de bactérias psicotróficas (Pinto et al., 2006).

No leite obtido sob condições sanitárias adequadas, os psicotróficos representam menos de 10% da microbiota total, comparada a mais de 75% quando obtido sob condições não higiênicas (Nielsen, 2002). Dentre as espécies do gênero a *Pseudomonas fluorescens* é a espécie isolada com maior frequência de produtos lácteos refrigerados (Pinto et al., 2006).

O armazenamento do leite em tanques refrigeradores e coleta da matéria-prima a cada 48 horas aumentam as chances de multiplicação de bactérias psicotróficas proteolíticas, que se desenvolvem em baixas

temperaturas (0°C a 15°C), produzindo enzimas termoestáveis que podem atuar sobre a  $\kappa$ -caseína, resultando na desestabilização do leite (Nornberg et al., 2009).

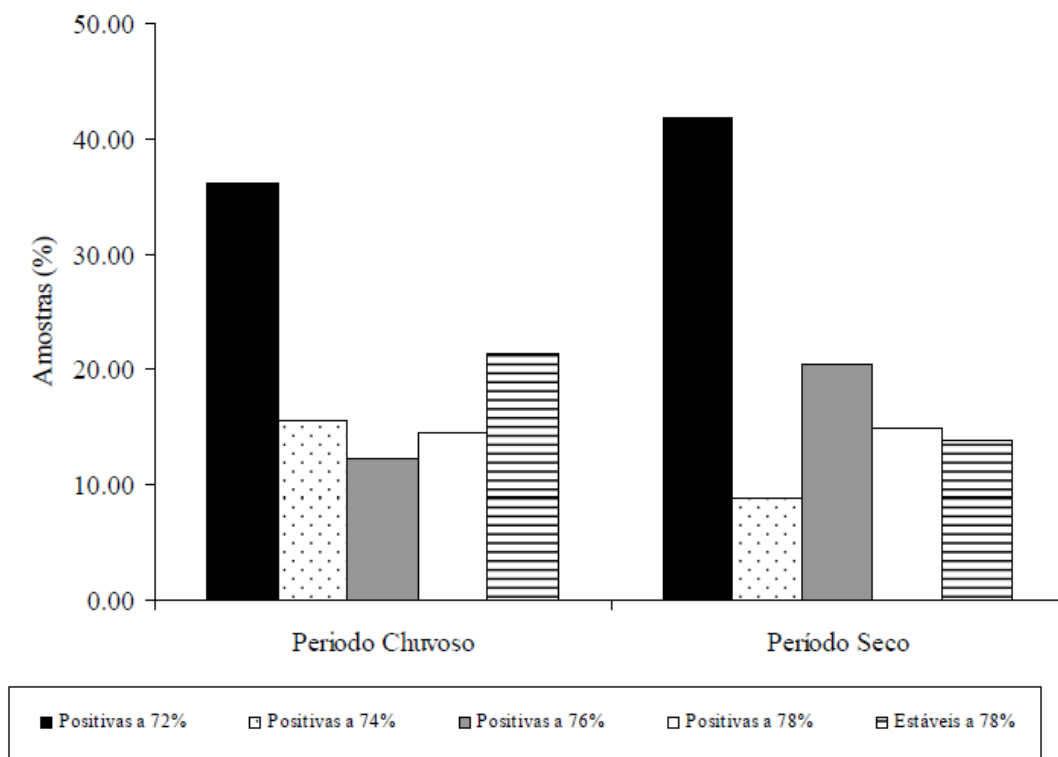
A ação das proteases de psicrotróficos é distinta entre as frações protéicas do leite, sendo a  $\kappa$ -caseína, mais susceptível à ação destas enzimas, enquanto que as proteínas do soro são resistentes ao ataque das proteases (Gaucher et al., 2008).

Os processos de pasteurização inativam a maioria dos micro-organismos presentes inicialmente no leite cru, entretanto, a multiplicação de bactérias psicrotróficas possibilita a produção de proteases e lipases resistentes à pasteurização, que estão associadas a

alterações sensoriais e tecnológicas indesejáveis no leite e derivados.

Como alterações na aparência, odor e sabor do leite e derivados, geleificação do leite UAT, instabilidade térmica nos derivados do leite e perdas de rendimento durante a produção de queijos (Pinto et al., 2006).

Sendo assim, a capacidade do leite em suportar os tratamentos de alta temperatura sem perda da estabilidade torna possível a produção de lácteos esterilizados e com vida-de-prateleira longa (Singh, 2004).



**Figura 1** – Resultados da prova do álcool em diferentes percentuais (v/v) e períodos de realização da análise. Fonte: Oliveira et al. (2011).



**Figura 2** – Fluxograma de diagnóstico do LINA. Fonte: Zanela et al. (2012)



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cadeia produtiva de leite no Brasil apresenta indiscutível importância social e econômica, entretanto apresenta problemas que dificultam seu desenvolvimento.

Alterações na estabilidade do leite na prova do álcool são descritas em diferentes regiões do mundo e do Brasil, é um problema sério e multifatorial e por causas ainda não muito bem esclarecidas, gerando prejuízos a todos os elos da cadeia, já que o leite mesmo apto ao beneficiamento, sem acidez elevada é rejeitado ou subvalorizado pela indústria.

O teste do álcool ainda é considerado uma boa alternativa, por ser rápido, prático e de baixo custo. No entanto, o leite que precipita no teste do álcool, não necessariamente precipita nos tratamentos térmicos e pode ser equivocadamente condenado.

Essa situação é agravada pelo não conhecimento das causas da modificação da estabilidade da caseína não relacionadas à acidez do leite, sendo necessária a continuidade de pesquisas nesta área.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATTAGLINI, A. P. P., BELOTI, V., FAGNANI, R., TAMANINI, R., DUNGA, K. S. Caracterização físico-química e microbiológica do leite bovino instável não ácido em função das estações do ano. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 1, p. 26-32, 2013.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, de 29 DE DEZEMBRO DE 2011. Diário Oficial da União, 30 de dezembro de 2011. Disponível em:

<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/33395065/dou-secao-1-30-12-2011-pg-6>. Acesso em: 19 de Setembro de 2013.

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

DOBRANIĆ, V.; NJARI, B.; SAMARDŽIJA, M.; MIOKOVIĆ, B.; RESANOVIĆ, R. The influence of the season on the chemical composition and the somatic cell count of bulk tank cow's milk. *Veterinarski Arhiv*, v. 78, p. 235-242, 2008.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 13, n. 3, p. 838-849, 2012.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts

- and significance. *International Dairy Journal, Canada*, v. 18, p. 677-684, 2008.
- GAUCHER, I.; MOLLÉ, D.; GANGNAIRE, V.; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 130-143, 2008.
- HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal, Germany*, v. 33, p. 421-434, 2004.
- HURLEY, M. J.; LARSEN, L. B.; KELLY, A. L.; MCSWEENEY, P. L. H. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 673-681, 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária, Junho de 2013.
- MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; MANZKE, N. Supply of supplements with different levels of energy and protein to Jersey cows and their effects on milk instability. *Brazilian Journal of Animal Science*, v. 39, p. 2724-2730, 2010.
- MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; RODRIGUES, C. M. Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt. *Brazilian Journal of Animal Science*, v. 40, p. 1088-1094, 2011.
- MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JÚNIOR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeitos sobre os aspectos físico-químicos do leite. *Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas*, v. 13, p. 91-97, 2007.
- MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 28, n. 2, p. 295-298, 2008.
- MOLINA, L. H.; GONZÁLEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PINTO, M. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. *Archivos de Medicina Veterinaria, Valdivia*, v. 33, n. 2, p. 233-240, 2001.
- NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in milk: Characteristics, Roles and Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, 2002.
- NORNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotóxicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, p. 157-163, 2009.
- O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the

- minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size. *Journal of Dairy Science*, United States, v. 83, p. 378-386, 2000.
- O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; DE KRUIF, C. G.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, v. 73, p. 312-317, 2006.
- OLIVEIRA, C. A. F.; LOPES, L. C.; FRANCO, R. C.; CORASSIN, C. H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 12, p. 508-515, 2011.
- OMOARUKHE, E. D.; ON-NOM, N.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. *International Journal of Dairy Technology*, v. 63, p. 504-511, 2010.
- PHILIPPE, M.; GAUCHERON, F.; LE GRAET, Y.; MICHEL, F.; GAREM, A. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. *Le Lait, Dairy Science and Technology*, v. 83 p. 45-59, 2003.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- REIS, C. B. M.; BARREIRO, J. R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *Veterinary Research*, v. 9, p. 67, 2013.
- ROMA JÚNIOR, L. C.; MONTOYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; MACHADO, P. F. Sazonalidade da proteína e outros componentes do leite e sua relação com programas de pagamento por qualidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p.1411- 1418, 2009.
- SCHÄELLIBAUM, M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: *Annual Meeting National Mastitis Council*, p.38-46, 2001.
- SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.8, p. 43-56, 2005.
- SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; GIOMBELLI, C. J.; SILVA, M. R. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v. 67, p. 55-60, 2012.
- SINGH H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technol*, v. 57, 2004.
- SORIANO, C.; MICHEO, C.; MENDIEIRA, V. A.; TABERA, A.; STEFANO, A.; CASASNOVAS, G.; PURRÁN, P.; CORRADETTI, A.;

CARABAJAL, S. Evaluación de la calidad de leche de tanque de tambos de la Cuenca Mar y Sierras. *Veterinária Argentina*, v. 18, n. 179, p. 654-667, 2001.

STUMPF, M. T.; FISCHER, V.; MCMANUS, C. M.; KOLLING, G. J.; ZANELA, M. B.; SANTOS, C. S.; ABREU, A. S.; MONTAGNER, P. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. *Animal*, v. 7, n. 7, p. 1137–1142, 2013.

TSENKOVA, R.; ATANASSOVA, S.; KAWANO, S. Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 2550-2557, 2001.

ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R. Unstable non acid milk and milk composition of Jersey cows on feed restriction. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 835–840, 2006.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V.; GOMES, J. F.; STUMPF JR, W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p.1009-1013, 2009.