

## Observação preliminar sobre a influência da pressão de homogeneização *upstream* na estabilidade coloidal do leite UHT submetido ao teste do álcool

Preliminary observations about the influence of the upstream homogenization pressure on the colloidal stability of UHT milk in the ethanol test

Observación preliminar sobre la influencia de la presión de homogenización *upstream* en la estabilidad coloidal de la leche UHT sometida a la prueba de alcohol

Recebido: 13/08/2021 | Revisado: 20/08/2021 | Aceito: 04/11/2021 | Publicado: 07/11/2021

**Jaqueline de Almeida Celestino**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5693-9813>

Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

E-mail: [jaqueline@ice.ufjf.br](mailto:jaqueline@ice.ufjf.br)

**Rodrigo Stephani**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0237-8325>

Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

E-mail: [rodrigostephani@gmail.com](mailto:rodrigostephani@gmail.com)

**Alan Frederick Wolfschoon Pombo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8198-7059>

INOVALEITE, Alemanha

E-mail: [awolfschoon@googlemail.com](mailto:awolfschoon@googlemail.com)

**Antônio Fernandes de Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3238-936X>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [afc1800@yahoo.com](mailto:afc1800@yahoo.com)

**Ítalo Tuler Perrone**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3393-4876>

Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

E-mail: [italotulerperrone@gmail.com](mailto:italotulerperrone@gmail.com)

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da pressão de homogeneização *upstream* (antes do tratamento térmico) na estabilidade do leite integral pasteurizado quando submetido ao teste do álcool, visando processamento UHT sem adição de estabilizantes. Quatro diferentes pressões de homogeneização (0 MPa, 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa, além do tratamento controle) foram avaliadas em temperatura de 80°C (temperatura de homogeneização média utilizada nas indústrias de leite UHT), empregando dois métodos de observação do comportamento coloidal do leite após o teste do álcool (concentrações de etanol entre 72% (v/v) e 96% (v/v), em intervalos de 2% (v/v)): visualização direta e análise de distribuição do tamanho das partículas. Os resultados de LS demonstraram que o tratamento 0 MPa não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para valores de  $d_{10}$  até o álcool 86% (v/v), mostrando assim uma maior estabilidade quando comparado ao tratamento controle (estável ao álcool  $\leq 82%$  (v/v)). Verificou-se que as estabilidades dos tratamentos controle, 20 MPa e 40 MPa foram mantidas até a concentração do álcool  $\leq 80%$  (v/v) ( $p > 0,05$ ), comportamento distinto ao observado no tratamento 80 MPa que apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) após adição do álcool  $\geq 78%$  (v/v). Esses dados demonstraram que a homogeneização *upstream* aplicando pressões entre 20 MPa e 80 MPa teve influência negativa no teste do álcool. Sob as condições do estudo, a não adição dos estabilizadores não pode ser recomendada.

**Palavras-chave:** Tamanho de partículas; Processamento UHT; Etanol.

### Abstract

The purpose of this work was to study the influence of the upstream homogenization pressure (before heat treatment) on the stability of pasteurized whole milk when submitted to the alcohol test, aiming at UHT processing without the addition of stabilizers. Four different homogenization pressures (0 MPa, 20 MPa, 40 MPa and 80 MPa, in addition to the control treatment) were evaluated at a temperature of 80°C (average homogenization temperature used in the UHT milk industry). Two methods of observation of the colloidal behavior of milk after the alcohol test (ethanol concentrations between 72% (v/v) and 96% (v/v), at 2% (v/v) intervals) were applied: direct visualization and particle size distribution (LS) analysis. The LS results showed that the 0 MPa treatment did not present significant difference ( $p > 0.05$ ) for values of  $d_{10}$  up to 86% alcohol (v/v), thus showing a higher stability when compared to the control treatment (with stability up to 82% (v/v) alcohol). It was found that the stability of the control, 20 MPa and 40 MPa

treatments were maintained up to 80% alcohol (v/v) ( $p>0.05$ ); a distinct behavior was observed in the 80 MPa treatment which presented a statistically significant difference ( $p<0.05$ ) after an alcohol concentration  $\geq 78\%$  (v/v). These data demonstrate that upstream homogenization applying pressures between 20 MPa and 80 MPa had a negative influence on the alcohol test and based on the results of the observations, the elimination of stabilizers could not be supported.

**Keywords:** Particle size; UHT processing; Ethanol.

### Resumen

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la presión de homogenización *upstream* (antes del tratamiento térmico) sobre la estabilidad de la leche integral pasteurizada cuando se somete a la prueba de alcohol, con el objetivo de procesar leche UHT sin la adición de estabilizadores. Se evaluaron cuatro presiones de homogeneización diferentes (0 MPa, 20 MPa, 40 MPa y 80 MPa, además del tratamiento de control) a una temperatura de 80 °C (temperatura promedio de homogenización utilizada en las industria de leche UHT). Dos métodos de observación del comportamiento coloidal de la leche después de la prueba de alcohol (concentraciones de etanol entre 72% (v/v) y 96% (v/v), a intervalos de 2% (v/v)) fueron utilizados: visualización directa y análisis de distribución del tamaño de partícula (LS). Los resultados de LS mostraron que el tratamiento con 0 MPa no presentó diferencia significativa ( $p>0.05$ ) para valores de tamaño de partícula  $d_{10}$  hasta 86% (v/v) de alcohol, mostrando así una mayor estabilidad en comparación con el tratamiento de control (estable hasta  $\leq 82\%$  (v/v) de alcohol). Se encontró que la estabilidad de los tratamientos de control a 20 MPa y 40 MPa se mantuvo hasta una concentración de alcohol  $\leq 80\%$  de alcohol (v/v) ( $p>0.05$ ). Un comportamiento distinto fue observado en el tratamiento de 80 MPa, que presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) a concentraciones de alcohol  $\geq 78\%$  (v/v). Estos datos demuestran que la homogeneización *upstream* aplicada a presiones entre 20 MPa y 80 MPa influye negativamente en la prueba de alcohol. La no utilización de estabilizadores no puede ser recomendada, basado en los resultados del presente estudio.

**Palabras clave:** Tamaño de partícula; Procesamiento UHT; Etanol.

## 1. Introdução

O leite é um sistema complexo constituído por uma emulsão de gordura e uma dispersão coloidal de proteínas em uma solução aquosa de sais, vitaminas, peptídeos, lactose e oligossacarídeos (Michalski & Januel, 2006). Tecnologias de conservação utilizando tratamento térmico são amplamente utilizadas nas indústrias de laticínios, visando permitir maior tempo de armazenamento e distribuição para consumo sem deterioração (Lewis & Heppel, 2000).

No Brasil, destaca-se o processamento térmico em ultra alta temperatura (UHT), no qual o produto homogeneizado é submetido a temperaturas entre 130 °C e 150 °C por 2 a 4 segundos (Brasil, 1997). Para ser submetido a este tipo de tratamento em alta temperatura, o leite deve apresentar adequada aptidão ao processamento térmico, ou seja, é preciso que as proteínas presentes no leite sejam estáveis na dispersão coloidal, mesmo em condições térmicas extremas, como no caso do UHT (Fox et al., 2015).

Parte da estabilidade térmica do leite é fornecida pela estrutura micelar das caseínas, sendo essa responsável pela resistência da dispersão coloidal à coagulação durante o aquecimento (Walstra et al., 2005). Neste sentido, visando determinar a estabilidade térmica das proteínas, utiliza-se o teste do álcool como análise de recepção do leite na planta industrial (Bylund, 2003). Logo, o leite com baixa estabilidade térmica é identificado através da precipitação ou formação de grumos quando exposto ao etanol (Tetra Pak, 2021).

O teste do álcool é realizado misturando-se as amostras de leite em igual volume com uma solução de álcool etílico, assim, as proteínas tornam-se instáveis em determinada concentração alcoólica (Karlsson et al., 2017). Na presença do etanol ocorre a agregação das micelas devido à redução da constante dielétrica da mistura, gerando colapso da  $\kappa$ -caseína e consequente diminuição da repulsão estérica (Horne & Parker, 1981b). A redução da constante dielétrica da fase aquosa conduz a uma diminuição da hidratação, o que aliado às interações dos grupamentos laterais nas cadeias de polipeptídios com grupamentos alquil na fase aquosa, modifica a orientação das forças levando à modificação das estruturas terciária e secundária da proteína, e finalmente à sua irreversível coagulação (Horne, 2016). A estabilidade térmica do leite será melhor quanto maior for a concentração da solução de álcool etílico utilizada sem que ocorra coagulação (Tsioulpas et al., 2007). Portanto, o teste do álcool tornou-se um indicador da estabilidade térmica do leite, demonstrando assim se o mesmo está apto ao tratamento

UHT (Karlsson et al., 2019).

Em muitas indústrias, há um processo que antecede o tratamento UHT: a homogeneização *upstream*. A mesma consiste em um tratamento mecânico dos glóbulos de gordura no leite, causado pelo transporte do líquido sob alta pressão, através de uma pequena passagem, a fim de estabilizar a emulsão de gordura reduzindo o tamanho dos glóbulos e evitando assim sua separação durante o tempo de armazenamento (Lopez, Cauty & Guyomarc'h, 2015), além de interferir também na estrutura coloidal. A homogeneização rompe a membrana biológica que cobre os glóbulos de gordura do leite e refaz sua estrutura adicionando proteínas, principalmente as micelas de caseína na superfície da nova membrana (Obeid et al., 2020; Ye et al., 2017). Deste modo, a membrana dos glóbulos de gordura é drasticamente alterada pelo processo de homogeneização (Obeid et al., 2019).

Partindo-se desta premissa, o presente trabalho objetiva estudar a influência da pressão de homogeneização na estabilidade coloidal do leite pasteurizado, visando processamento UHT, empregando um teste simples, barato e amplamente utilizado pelas indústrias, que é o teste do álcool (Horne, 2016), porém não somente pela visualização direta (olho humano), mas também utilizando um analisador de tamanho de partículas (LS). Esta avaliação visa inferir sobre a interferência da homogeneização *upstream* na estabilidade coloidal, com foco em ganhos no desempenho e na produtividade em escala industrial.

## 2. Metodologia

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Química e Tecnologia – QUIMTEC – do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O experimento consistiu na produção de iogurtes suplementados com leite e posterior análise para caracterização microestrutural. O experimento consistiu de um delineamento com 5 tratamentos (pressões de homogeneização de 0 MPa, 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa) e 3 repetições totalizando 15 produções.

### 2.1 Homogeneização

Para o experimento foram utilizadas amostras de leite fluido pasteurizado com 3,2 % (m/v) de gordura, sendo as mesmas provenientes de uma empresa de Juiz de Fora/MG (Costa, 2016). Para cada repetição, foram utilizados 4 litros de leite pasteurizado que foram pré-aquecidos até 80 °C (temperatura de homogeneização média utilizada nas indústrias) em banho-maria com uma taxa de aquecimento de 2,0 °C por minuto. Logo após o aquecimento, coletou-se a amostra do leite para ser utilizado como tratamento controle do experimento (Costa, 2016). Em seguida, o restante do leite foi submetido ao processo de homogeneização (homogeneizador modelo APV-1000) variando-se a pressão aplicada para cada tratamento, sendo estes: 0 MPa, 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa. Em seguida, todas as amostras foram resfriadas até temperatura de 6,0°C ± 2,0 °C visando avaliação do teste do álcool. Todo este procedimento foi realizado em triplicata (n=3).

### 2.2 Teste do álcool

As soluções alcoólicas foram preparadas em concentrações variando entre 72% (v/v) a 96% (v/v), em intervalos de duas unidades percentuais. As graduações alcoólicas foram conferidas e ajustadas com auxílio de um densímetro digital “DENSITO 30P” (Costa, 2016). O pH das amostras foi medido com o pH-metro de bancada e foi adicionada de ácido ou base, de acordo com o pH médio do leite (6,7). O teste do álcool foi realizado nos quatro tratamentos de homogeneização e no leite não homogeneizado (Controle), em placas de Petri e com o uso de micropipetas de 2 mL. Foram misturados 2 mL de álcool e 2 mL de leite para cada ensaio de variação alcoólica. Cada tratamento foi submetido ao teste do álcool em duplicata (Costa, 2016). Em cada ensaio de variação alcoólica foi observada a reação de desestabilização ao álcool em placa de Petri. Para melhor caracterização, a seguinte escala de níveis de desestabilização foi considerada: (-) não houve coagulação, (1) início de

coagulação, (1+) pouca coagulação, (1++) coagulação média e (1+++) coagulação extensa.

### 2.3 Análise de distribuição do tamanho das partículas por difração laser (LS)

A análise de tamanho das partículas dos leites não homogeneizados e homogeneizado, quando submetidos às diferentes graduações alcoólicas no teste do álcool, foi realizada pelo analisador de partículas Beckman Coulter LS 13 320 por difração laser (Costa, 2016). As amostras dos leites mantidas na temperatura de  $6,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  após a mistura com etanol foram imediatamente destinadas ao LS, e os resultados de distribuição dos tamanhos das partículas foram obtidos utilizando o índice de refração de 1,332 para o meio dispersante (água), 1,47 para gordura e 1,57 para as micelas de caseína (Costa, 2016).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Teste do álcool pela visualização direta

A inferência sobre a estabilidade coloidal do leite mediante o uso do teste do álcool é um procedimento amplamente difundido no Brasil. Segundo a Instrução Normativa nº 76 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2018), a inspeção da qualidade do leite cru refrigerado deve apresentar estabilidade em uma concentração alcoólica mínima de 72% (v/v). Devido ao baixo custo e alta simplicidade, o teste do álcool continua em uso, mesmo apresentando limitações analíticas relacionadas principalmente à forma de visualização do analista e não de um sistema instrumental.

Na Tabela 1 apresentam-se os resultados obtidos neste estudo, utilizando o método referência de caracterização do teste do álcool (visualização direta com olho humano). O tratamento controle (leite que não foi submetido ao processo de homogeneização) apresentou coagulação em concentração alcoólica 84% (v/v), sendo o leite estável até o álcool 82% (v/v). O leite que passou pelo homogeneizador sem pressão (0 MPa), apresentou maior estabilidade ao etanol (mantendo íntegra as características do coloide em graduação alcoólica acima do leite Controle), coagulando no álcool 86% (v/v). Já o leite homogeneizado a 20 MPa, apresentou menor estabilidade ao teste do álcool em relação ao controle, gerando grumos no álcool 82% (v/v). Os tratamentos 40 MPa e 80 MPa diminuíram ainda mais a estabilidade do leite quando comparados ao controle, formando ambos, precipitados a partir do álcool 80% (v/v).

**Tabela 1.** Resultados da média das observações visuais do teste do álcool (n=3).

Tratamentos	Concentração do etanol (%v/v)										$\Delta\text{Etanol } (\%v/v)^*$ (82 ± X)**
	72	74	76	78	80	82	84	86	88	90	
Controle	-	-	-	-	-	-	1	1+	1++	NR	NA
0 MPa	-	-	-	-	-	-	-	1	1+	1+++	3,0 ± 1,0 <sup>a</sup>
20 MPa	-	-	-	-	-	1	1+	1++	NR	NR	- 1,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
40 MPa	-	-	-	-	1	1++	1+++	NR	NR	NR	- 4,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
80 MPa	-	-	-	-	1	1+++	1+++	NR	NR	NR	- 4,0 ± 0,0 <sup>c</sup>

Legenda: (-) não houve coagulação, (1) início de coagulação, (1+) pouca coagulação, (1++) coagulação média, (1+++) coagulação extensa, (NR) não realizada e (NA) não aplicada.

\*Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

\*\* $\Delta\text{Etanol}$  calculado pela diferença entre o valor da concentração alcoólica máxima obtida para o tratamento Controle (82 %v/v) em relação à concentração alcoólica máxima de não coagulação dos demais tratamentos (X). Fonte: Autores.

De acordo com os resultados obtidos pela visualização direta, desenvolvemos um indicador de estabilidade coloidal mediante a variação no nível da concentração alcoólica limite para a formação dos agregados, que chamamos de  $\Delta\text{Etanol}$  (lê-se delta etanol). Este parâmetro, também apresentado na Tabela 1, tem como objetivo mostrar a variação da estabilidade ao teste do álcool dos tratamentos que passaram pelo processo de homogeneização em relação aos seus respectivos controles. Verifica-

se pelo valor de  $\Delta$ Etanol, que o tratamento 0 MPa apresentou uma variação positiva média de  $3,0 \pm 1,0$  % (v/v) em relação ao controle considerando as três repetições. Já os demais tratamentos que foram submetidos ao processo de homogeneização diminuíram a estabilidade ao álcool com o aumento progressivo das pressões de homogeneização, sendo os valores de  $\Delta$ Etanol (% v/v) -  $1,0 \pm 1,0$ , -  $4,0 \pm 0,0$  e -  $4,0 \pm 0,0$  respectivamente para os tratamentos 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa.

Observa-se pelos resultados, que o leite submetido ao processo de homogeneização sem pressão (0 MPa) e com 20 MPa, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para o  $\Delta$ Etanol em relação aos demais tratamentos. Contudo não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os leites homogeneizados a 40 MPa e 80 MPa, indicando similaridade na influência da estabilidade coloidal do leite pasteurizado para as duas pressões.

É imperativo destacar que a faixa usual de pressão de homogeneização do leite para processamento UHT é de 20 MPa. Assim, é possível inferir que a etapa de homogeneização *upstream* pode diminuir a estabilidade coloidal do leite, estando o mesmo mais suscetível à influência da intensidade do tratamento térmico aplicado. Segundo Sweetsur & Muir (1983), a estabilidade ao calor do leite integral apresentou uma redução gradual com o aumento pressão de homogeneização, sugerindo ser uma consequência do aumento da adsorção de proteína, especialmente caseína, nos glóbulos de gordura homogeneizados do leite, favorecendo a coagulação.

O leite submetido ao homogeneizador a 0 MPa é o que obteve melhores resultados de estabilidade, indicando que o coloide sofre algum tipo de alteração na sua estrutura, mesmo não havendo pressão para modificar os glóbulos de gordura. Acredita-se que isso provavelmente é devido à menor formação de uma membrana secundária apresentando espessura mais fina (*thickness*) sobre os glóbulos, devido ao estresse mecânico aplicado na passagem do leite, e à existência de ligações formadas entre as soro proteínas e as caseínas, durante a rampa de aquecimento do leite até 80°C.

Conforme os estudos de Michalski et al. (2002), o potencial  $\zeta$  (zeta) aparente dos glóbulos de gordura do leite homogeneizado aumentou com a pressão de homogeneização e atingiu um platô de aproximadamente de -20 mV, correspondente ao potencial  $\zeta$  das micelas de caseína, quando a interface está quase totalmente coberta pelas mesmas. Esse aumento gradual do potencial  $\zeta$  aparente com a aumento da pressão de homogeneização exercida no leite ocorre devido a diminuição de tamanho dos glóbulos de gordura homogeneizados, de modo que a fração de superfície da membrana do glóbulo de gordura coberta por proteínas aumenta.

Da mesma forma, Obeid et al. (2019) investigaram o papel da homogeneização nas interações entre os glóbulos de gordura do leite e as caseínas e constataram que em pH de 6,7, às micelas de caseína e os glóbulos de gordura são carregados negativamente, possuindo um potencial  $\zeta$  de -15 a -20 mV e um potencial  $\zeta$  de -13 mV, respectivamente. Porém, o glóbulo de gordura está estabilizado por um conjunto de glicoproteínas formando o glicocálice, que gera estabilidade física e as micelas de caseína exibem uma camada estabilizadora na  $\kappa$ -caseína, evitando então o contato entre elas pelas repulsões eletrostáticas e estéricas. Para os glóbulos de gordura homogeneizados, o impedimento estérico na sua interface vai diminuindo com a substituição do material original da membrana por micelas de caseína após a homogeneização. Assim, os glóbulos de gordura homogeneizados são capazes de estabelecer forças de adesão mais altas com micelas de caseína, devido às caseínas adsorvidas em sua interface triacilgliceróis/água.

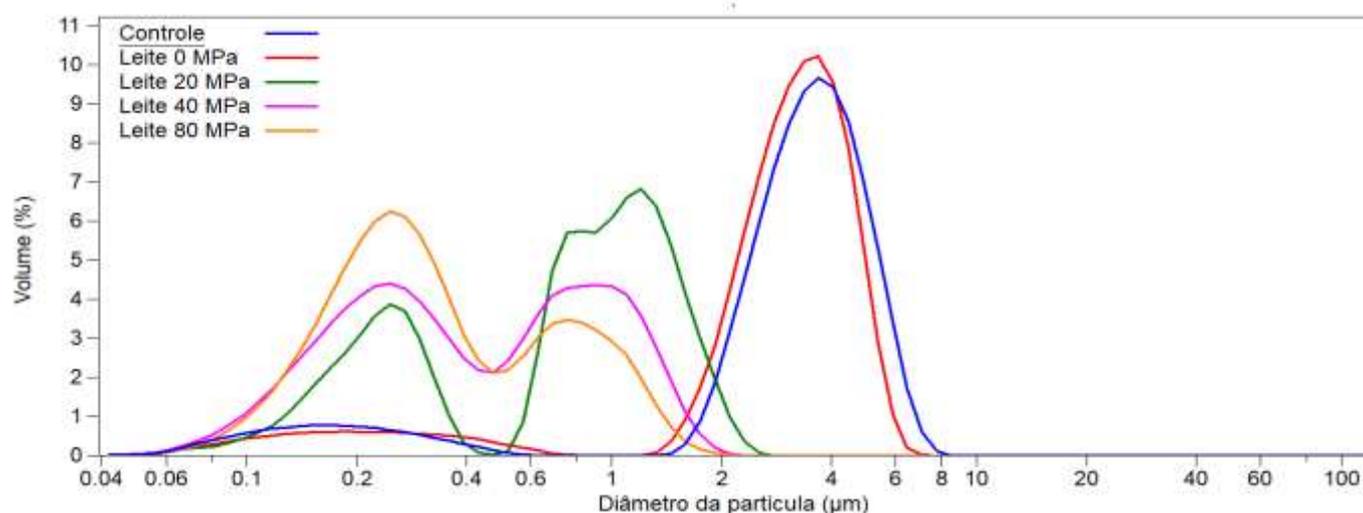
## 3.2 Análise de distribuição do tamanho das partículas

### 3.2.1 Leite sem adição de etanol

Visando melhor compreensão da influência da pressão de homogeneização sobre o diâmetro hidrodinâmico das micelas de caseínas e os glóbulos de gordura nos leites, foram realizadas análises de distribuição do tamanho das partículas utilizando difração laser (LS). Na Figura 1, é possível observar as curvas de distribuição do diâmetro das partículas ( $\mu\text{m}$ ) em relação ao volume (%).

Os dados apresentados na Figura 1 são relacionados aos leites obtidos nos diferentes tratamentos estudados (controle, 0 MPa, 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa). Observa-se um perfil bimodal em todas as curvas, independente do tratamento aplicado, porém podendo ser constatadas diferenças entre os tratamentos sem (controle, 0 MPa) e com pressão de homogeneização (20 MPa, 40 MPa, e 80 MPa). Para os tratamentos controle e 0 MPa, encontramos uma população de partículas na região entre 0,06 – 0,60  $\mu\text{m}$ , relacionada tipicamente às micelas de caseínas. Já a segunda população de partículas entre 1,0 – 8,0  $\mu\text{m}$  é atribuída aos glóbulos de gordura. Assim, apesar das curvas apresentarem uma pequena diferença de distribuição, assumimos que não se verificaram mudanças significativas na micro ou nano estrutura dos leites. Já no tratamento 20 MPa observamos também duas populações distintas de partículas, porém em faixas diferentes, entre 0,06 – 0,40  $\mu\text{m}$  para as caseínas e 0,5 – 3,0  $\mu\text{m}$  para os glóbulos de gordura. Já as distribuições das partículas dos tratamentos 40 MPa e 80 MPa não apresentaram uma separação tão definida entre as duas populações observadas, havendo uma forte interseção entre as duas na região próxima a 0,5  $\mu\text{m}$ , deixando nítida a influência da pressão de homogeneização na estrutura coloidal.

**Figura 1.** Curvas representando a distribuição do tamanho das partículas nos diferentes tratamentos: — controle (sem processo de homogeneização); — 0 MPa; — 20 MPa; — 40 MPa e — 80 MPa.



Fonte: Autores.

Com curvas obtidas através do LS para os leites após os tratamentos obteve-se os valores de  $d_{10}$ ,  $d_{90}$  e região menor que 1,0  $\mu\text{m}$ , conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise de distribuição do tamanho das partículas dos leites após cada tratamento, sem adição de etanol.

Tratamentos	$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )*	$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )*	< 1,0 $\mu\text{m}$ (% volume)*
Controle	$0,30 \pm 0,02^b$	$5,28 \pm 0,06^c$	$11,75 \pm 0,47^a$
0 MPa	$0,35 \pm 0,08^b$	$4,98 \pm 0,39^c$	$11,85 \pm 0,48^a$
20 MPa	$0,16 \pm 0,04^a$	$1,56 \pm 0,04^b$	$64,95 \pm 7,51^b$
40 MPa	$0,15 \pm 0,01^a$	$1,15 \pm 0,01^{a,b}$	$83,68 \pm 0,15^c$
80 MPa	$0,10 \pm 0,05^a$	$0,82 \pm 0,16^a$	$95,65 \pm 5,02^d$

$d_{10}$  e  $d_{90}$ : valor igual ou inferior do diâmetro das partículas que representam 10% ou 90% do volume respectivamente.

\*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Autores.

Observa-se pelos dados de  $d_{10}$  na Tabela 2, que 10% do volume das partículas do tratamento controle e 0 MPa possuem diâmetro inferior a 0,30  $\mu\text{m}$  e 0,35  $\mu\text{m}$  respectivamente, não havendo diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos. Já para as pressões de 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa foram observados valores  $d_{10}$  de 0,16  $\mu\text{m}$ , 0,15  $\mu\text{m}$  e 0,10  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Também não houve diferença significativa entre estes tratamentos ( $p>0,05$ ). É possível observar, entretanto, a influência do aumento gradual da pressão de homogeneização na diminuição dos valores  $d_{10}$  dos leites homogeneizados, reforçando o impacto da homogeneização no glóbulo de gordura do leite.

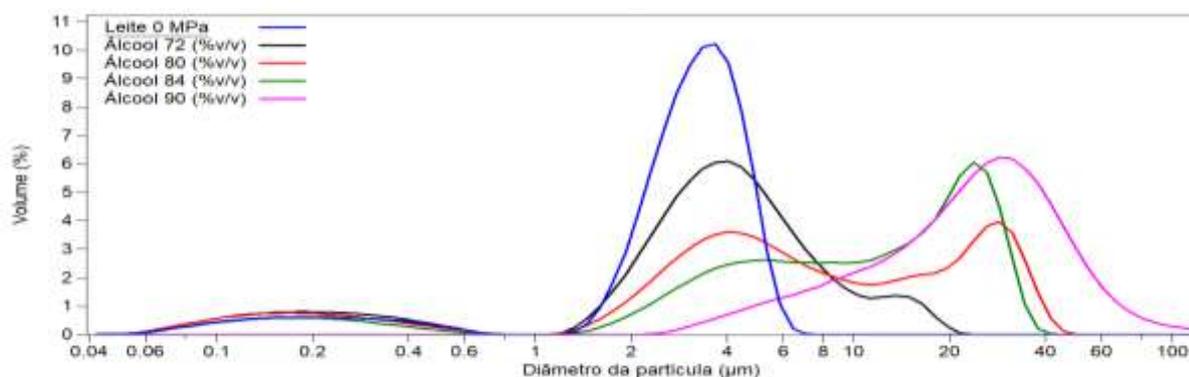
Já para os valores de  $d_{90}$  observamos que os tratamentos controle e 0 MPa apresentaram 90% do volume das suas partículas com tamanho aproximado de 5,0  $\mu\text{m}$ , ( $p>0,05$ ) enquanto os tratamentos submetidos as homogeneizações em 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa possuem partículas cujos valores  $d_{90}$  vão progressivamente diminuindo de 1,56  $\mu\text{m}$ , 1,15  $\mu\text{m}$  até 0,82  $\mu\text{m}$  respectivamente ( $p>0,05$ ), o que corrobora os resultados obtidos anteriormente relativos à diminuição do tamanho dos glóbulos. Para a região menor que 1,0  $\mu\text{m}$  (Tabela 2), tanto no tratamento controle como no leite que passou pelo homogeneizador a 0 MPa, foram identificados valores próximos de 12% do volume das partículas, não havendo diferença significativa ( $p>0,05$ ). Já para os demais tratamentos, encontram-se na região  $< 1,0 \mu\text{m}$ , aproximadamente 65%, 84% e 96% do volume das partículas para o leite homogeneizados a 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa respectivamente ( $p< 0,05$ ), notabilizando o efeito da pressão de homogeneização do processo. Quando a pressão de homogeneização do leite aumenta, o tamanho dos glóbulos de gordura diminui, conforme indicado na literatura especializada, e entre muitos outros, relatado por Michalski et al. (2002).

### 3.2.2 Leite com adição de etanol

Para melhor entendimento da influência do álcool na estabilidade coloidal do leite, além da observação visual indicada no método oficial, também foi realizado o estudo da distribuição do tamanho das partículas por difração a laser, após a mistura do leite com o etanol nas diferentes concentrações. Esses resultados são apresentados na Figura 2.

Com a adição de álcool ao leite (Figura 2), a cada nova graduação alcoólica crescente de 2% (v/v) sobre a anterior, observou-se uma movimentação na distribuição das partículas com redução dos volumes (%) na segunda região (1,0 - 8,0  $\mu\text{m}$ ), surgindo gradativamente uma terceira região de estruturas acima de 10,0  $\mu\text{m}$ , que não existiam no leite inicial. Este deslocamento das partículas para regiões de tamanhos maiores sugere que a dinâmica de desestabilização ao etanol é gradativa e já se inicia no etanol 72% (v/v), mesmo não sendo visível ao olho humano. Esse processo avança com o aumento da graduação alcoólica até a formação de agregados maiores e visíveis ao olho humano, conforme valores apresentados na Tabela 1. A sensibilidade do equipamento de análise de tamanho das partículas por difração laser (LS) permitiu antecipar as percepções de mínimas alterações de distribuição das partículas do leite adicionado de etanol que não eram possíveis pela observação direta. Apesar da Figura 2 apresentar apenas os dados referentes ao tratamento 0 MPa, o comportamento para os demais tratamentos foi similar, considerando o aparecimento de uma terceira população de partículas com a mistura de álcool ao leite.

**Figura 2.** Curvas representando a distribuição do tamanho das partículas do tratamento — 0 MPa sem a adição de etanol e após adição de etanol com diferentes concentrações alcoólicas: — 72% (v/v); — 80% (v/v); — 84% (v/v) e — 90% (v/v).



Fonte: Autores.

Os dados do LS para os leites adicionados de etanol, revelam uma tendência de desestabilização quando analisados os valores de  $d_{10}$  com o aumento da graduação alcoólica como visto na Tabela 3. Nota-se maior estabilidade do tratamento 0 MPa quando submetido ao teste do álcool, gerando partículas aglomeradas somente em concentrações mais elevadas de etanol.

Por meio da Tabela 3, visualizamos que no tratamento 0 MPa não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os valores de  $d_{10}$  até o álcool 86% (v/v), mostrando assim uma alta estabilidade quando comparado ao tratamento controle. Verifica-se que as estabilidades dos tratamentos controle, 20 MPa e 40 MPa são mantidas até o álcool 80% (v/v) ( $p > 0,05$ ), comportamento distinto observado no tratamento 80 MPa que apresenta diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) após o teste de álcool a concentração 78% (v/v). Certifica-se novamente a maior estabilidade do leite que passou através do homogeneizador a 0 MPa em relação aos demais tratamentos de acordo com a análise dos valores de  $d_{10}$  com a adição de etanol ao leite sob o aspecto dos dados da distribuição do tamanho das partículas. Observou-se uma desestabilização clara ao etanol com o aumento das graduações alcoólicas, devido à mudança no tamanho do diâmetro das partículas analisadas através do LS.

**Tabela 3.** Dados de  $d_{10}$  ( $\mu\text{m}$ ) da distribuição do tamanho das partículas do leite pasteurizado após cada tratamento, antes e após adição de álcool (etanol) com diferentes concentrações alcoólicas (72% (v/v) até 88% (v/v)).

Amostras	Controle*	0 MPa*	20 MPa*	40 MPa*	80 MPa*
Leite sem álcool	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,05 <sup>a</sup>
Álcool 72 (%v/v)	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,08 <sup>a</sup>
Álcool 74 (%v/v)	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a</sup>
Álcool 76 (%v/v)	0,42 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
Álcool 78 (%v/v)	0,58 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,04 <sup>a</sup>
Álcool 80 (%v/v)	0,45 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	9,37 ± 0,38 <sup>b</sup>
Álcool 82 (%v/v)	2,41 ± 0,55 <sup>a,b</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,04 ± 3,10 <sup>b</sup>	12,82 ± 1,06 <sup>b</sup>	13,76 ± 0,52 <sup>c</sup>
Álcool 84 (%v/v)	3,14 ± 0,36 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,73 <sup>a</sup>	7,48 ± 0,40 <sup>c</sup>	13,52 ± 1,44 <sup>b</sup>	19,09 ± 1,31 <sup>d</sup>
Álcool 86 (%v/v)	4,43 ± 0,86 <sup>b,c</sup>	0,72 ± 0,58 <sup>a</sup>	10,99 ± 0,84 <sup>d</sup>	NR	NR
Álcool 88 (%v/v)	6,70 ± 2,91 <sup>c</sup>	3,61 ± 0,97 <sup>b</sup>	NR	NR	NR

$d_{10}$ : valor igual ou inferior do diâmetro das partículas que representa 10% do volume; (NR) análise não realizada.

\*Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Autores.

De acordo com os dados estatísticos obtidos pelo LS na Tabela 2, tem-se que os tratamentos controle e 0 MPa não se diferenciam em sua distribuição de tamanho de partículas, porém o leite que foi submetido ao homogeneizador sem pressão (0 MPa) ao ser exposto ao teste do álcool apresentou maior estabilidade coloidal.

Como demonstrado por Michalski et al. (2002), o potencial  $\zeta$  aparente do leite não homogeneizado não é alterado quando se passa o leite no homogeneizador em baixas pressões, como foi relatado pelos autores para o leite a 1 MPa. Dessa forma, pressupõe-se que a estabilidade do leite 0 MPa em relação ao tratamento controle não é explicada por alguma mudança no potencial  $\zeta$ .

Assim, presumivelmente, quando se passa o leite pelo homogeneizador sem pressão, a distribuição do tamanho das partículas não muda sensivelmente (conforme valores obtidos para  $d_{90}$  apresentados na Tabela 2), porém, acredita-se que a distribuição da camada superficial da membrana do glóbulo de gordura possa ser modificada gerando uma estabilização do coloide devido a uma diferente organização na superfície dos glóbulos de gordura do leite, em relação às partículas homogeneizadas. Essa última (a estabilização), provavelmente devida à interação das proteínas desnaturadas e aderidas à membrana do glóbulo, foram resultantes da pasteurização do leite utilizado e do tempo necessário para atingir 80°C antes da homogeneização. Esse ponto precisaria da confirmação analítica da estrutura das partículas criadas. Contudo, Cano-Ruiz & Richter (1997) em seus estudos sobre o efeito da pressão de homogeneização nas proteínas da membrana dos glóbulos de gordura do leite observaram diferenças significativas na composição da membrana do glóbulo de gordura do leite, que foram causadas pelo tratamento térmico aplicado antes do processo de homogeneização. Além disso, Obeid et al. (2020) evidenciaram que o tratamento térmico UHT induziu a formação de complexos entre as micelas de caseína e as proteínas do soro, e que esses agregados proteicos foram adsorvidos na superfície do glóbulo de gordura durante o processo de homogeneização. O colapso da fração hidrofílica da  $\kappa$ -caseína ao adicionar o álcool é necessário para a desestabilização das micelas, ou seja, o ponto onde a carga eletrostática seria nula.

Os leites que foram submetidos ao processo de homogeneização com pressão (20 MPa, 40 MPa e 80 MPa) diminuíram a estabilidade ao etanol devido à modificação de material original da membrana nativa dos glóbulos de gordura, cobertos por uma segunda membrana composta também de caseínas e soro proteínas aderidas à camada original, incrementando sua espessura (*thickness*) nativa, devido ao menor tamanho dos glóbulos resultantes da homogeneização. Essas partículas menores têm provavelmente maior probabilidade de colisões entre si (condição necessária para coagulação) que as partículas maiores observadas no leite não homogeneizado, no ambiente modificado pelo álcool. Isso implicaria em uma desestabilização a uma concentração menor de álcool para as partículas homogeneizadas. A determinação do potencial  $\zeta$  poderia contribuir ao esclarecimento do argumento apresentado. Os resultados obtidos sugerem claramente que pressões de homogeneização maiores de 20 MPa influenciaram negativamente ao teste do álcool, nas condições experimentais do presente estudo.

Akkerman et al. (2021) mostraram em seu estudo da relação entre o tamanho da micela de caseína, composição proteica e estabilidade do leite UHT, que para todos os leite analisados, o processamento por homogeneização *upstream* e tratamento UHT afetou quase todas as características de composição do leite e as deslocaram na mesma direção, sendo que a estabilidade ao etanol diminuiu de 96% (v/v) até 78% (v/v). Essa desestabilização ao álcool ocorre devido ao aumento da ligação de proteínas à gordura do leite com o tratamento térmico após a homogeneização (Hansen et al., 2018).

#### 4. Conclusão

As propriedades interfaciais do sistema coloidal do leite são modificadas pelo processo de homogeneização, e por consequência sua estabilidade ao etanol. Ao comparar as diferentes pressões de homogeneização, verificamos que tanto o leite submetido ao processo com pressão de 0 MPa bem como o leite controle (sem passar no homogeneizador) apresentaram

melhor estabilidade coloidal quando submetido ao teste do álcool, seguido das pressões de 20 MPa, 40 MPa e 80 MPa, nas condições do presente estudo. A utilização de dois métodos de caracterização após o teste do álcool (ótica direta e analisador laser de tamanho de partículas), proporcionou melhor interpretação dos resultados.

Os dados de LS trouxeram grande avanço na interpretação do teste do álcool, salientando a dinâmica de movimentação da desestabilização ao etanol das partículas do leite quando submetido ao processo de homogeneização, simulando condição *upstream* visando um processamento térmico UHT. Portanto, espera-se que essa ferramenta possa vir a ser utilizada pelas indústrias para a tomada de decisões mais assertivas e seguras.

Como perspectivas para futuros trabalhos com estabilidade coloidal é importante a realização da determinação do potencial  $\zeta$ , o que colaboraria para confirmar a inferência gerada através dos experimentos empregados no presente estudo que a homogeneização *upstream* com pressões superiores a 20 MPa influencia negativamente a estabilidade coloidal do leite, visando processamento industrial UHT.

## Agradecimentos

Este trabalho teve apoio das agências brasileiras CNPq, CAPES e FAPEMIG.

## Referências

- Akkerman, M., Johansen, L. B., Rauh, V., Sørensen, J., Larsen, L. B., & Poulsen, N. A. (2021). Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 112, 104856. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104856>
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1997). Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Instrução Normativa nº 76, de 26 de Novembro de 2018. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. *Diário Oficial da União*. Brasília.
- Bylund, G. (2003). Dairy processing handbook. Serbian translation of handbook by Tetra Pak Processing System AB, *Lund* (Sweden).
- Cano-Ruiz, M. E., & Richter, R. L. (1997). Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. *Journal of Dairy Science*, 80, 2732e2739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76235-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76235-0)
- Costa, C. H. F. (2016). Avaliação Microestrutural do leite pasteurizado submetido ao teste do álcool visando processamento UHT. 103 f. *Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados)* – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). Heat-induced changes in milk. In *Dairy chemistry and biochemistry* (pp. 345-375). Springer, Cham.
- Hansen, S. F., Petrat-Melin, B., Rasmussen, J. T., Larsen, L. B., Ostfeld, M. S., & Wiking, L. (2018). Placing pasteurisation before or after microfiltration impacts the protein composition of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 81, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.12.015>
- Horne, D. S. (2016). Ethanol stability and milk composition. *Advanced dairy chemistry*, 225-246. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_9)
- Horne, D. S., & Parker, T. G. (1981). Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: II. The origin of the pH transition. *Journal of Dairy Research*, 48(2), 285-291. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021701>
- Karlsson, M. A., Langton, M., Innings, F., Malmgren, B., Höjer, A., Wikström, M., & Lundh, Å. (2019). Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures. *Heliyon*, 5(9), e02431. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02431>
- Karlsson, M. A., Langton, M., Innings, F., Wikström, M., & Lundh, Å. S. (2017). Variation in the composition and properties of Swedish raw milk for ultra-high-temperature processing. *Journal of dairy science*, 100(4), 2582-2590. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12185>
- Lewis, M. J., & Heppell, N. J. (2000). *Continuous thermal processing of foods*. Aspen Publishers.
- Lopez, C., Cauty, C., & Guyomarc'h, F. (2015). Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy science & technology*, 95(6), 863-893. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0263-0>
- Michalski, M. C., & Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 423-437. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.02.004>
- Michalski, M. C., Michel, F., Sainmont, D., & Briard, V. (2002). Apparent  $\zeta$ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23(1), 23-30. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00203-X)

Obeid, S., Guyomarc'h, F., Francius, G., Guillemin, H., Wu, X., Pezennec, S., ... & Lopez, C. (2019). The surface properties of milk fat globules govern their interactions with the caseins: Role of homogenization and pH probed by AFM force spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110363. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110363>

Obeid, S., Guyomarc'h, F., Tanguy, G., Leconte, N., Rousseau, F., Dolivet, A., ... & Lopez, C. (2020). The adhesion of homogenized fat globules to proteins is increased by milk heat treatment and acidic pH: Quantitative insights provided by AFM force spectroscopy. *Food Research International*, 129, 108847. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108847>

Sweetsur, A. M., & Muir, D. D. (1983). Effect of homogenization on the heat stability of milk. *Journal of Dairy Research*, 50(3), 291-300. <https://doi.org/10.1017/S0022029900023128>

Tetra Pak. (2021). *Long-life milk*. [www.dairyprocessinghandbook.com](http://www.dairyprocessinghandbook.com).

Tsioulpas, A., Lewis, M. J., & Grandison, A. S. (2007). Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *Journal of Dairy Research*, 74(2), 167-173. <https://doi.org/10.1017/S0022029906002330>

Walstra, P., Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2005). *Dairy science and technology*. CRC press.

Ye, A., Cui, J., Dalgleish, D., & Singh, H. (2017). Effect of homogenization and heat treatment on the behavior of protein and fat globules during gastric digestion of milk. *Journal of dairy science*, 100(1), 36-47. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11764>