

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária

CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS NA INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO DO LEITE CAPRINO

Cláudia Inez Pereira Lima

Belo Horizonte
Minas Gerais
1988

Cláudia Inez Pereira Lima

CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS NA INATIVAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO DO LEITE CAPRINO

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte
Minas Gerais
1988

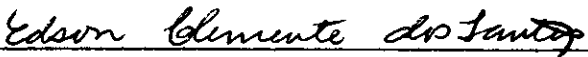
L732c LIMA, Cláudia Inez Pereira, 1958 -
Caracterização dos diferentes tratamentos térmicos na
inativação da fosfatase alcalina para a avaliação da e-
ficiência da pasteurização do leite caprino. Belo Hori-
zonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1988.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Leite de cabra - Pasteurização. 2. Fosfatase alca-
lina. I - Título.

CDD - 637.17

Aprovada em: 01 / 09 / 88



PROF. EDSON CLEMENTE DOS SANTOS
- Orientador -



PROF. FRANCISCO CECÍLIO VIANA



PROF. RONON RODRIGUES

Ao meu ex-chefe, e amigo
Dr. Protógenes U. dos
Santos, pelo apoio, dedico
esta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Edson Clemente dos Santos, pela valiosa orientação e incentivo, indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos Professores Francisco Cecílio Viana e Ronon Rodrigues pelas importantes sugestões apresentadas.

Aos Professores do curso, pelos ensinamentos recebidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, que me propiciou as facilidades para desenvolver os experimentos em seus laboratórios, na cidade de Juiz de Fora.

Aos Bioquímicos André Luís Pinto da Silva e Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e ao Estatístico Paulo de Oliveira, da EPAMIG, pelo precioso auxílio nas análises e interpretações.

À colega Márcia Cristina de Sena, pelo agradável convívio e pelo auxílio na redação desta.

À minha mãe, pelo apoio.

Aos colegas do curso, pela amizade.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

CLÁUDIA INEZ PEREIRA LIMA, filha de Amando Coelho Lima e Maria Aparecida Pereira Lima, nasceu em Resplendor, Minas Gerais, aos 6 dias do mês de fevereiro de 1958.

Obteve o diploma de médica veterinária em julho de 1983, pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ingressou no Instituto Nacional de Assistência Médica e Previdência Social, em março de 1980, através de concurso público realizado pelo DASP.

Em fevereiro de 1984, iniciou o curso de Mestrado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, na área de Medicina Veterinária Preventiva.

Atualmente, pertence ao quadro de funcionários do Ministério da Agricultura, prestando serviços ao SERPA/DFA/MG.

RESUMO

A pesquisa da atividade da enzima fosfatase alcalina no leite cru de cabra, em relação à eficiência dos processos de pasteurização propostos, à semelhança do que ocorre com o leite de vaca, foi o objetivo deste trabalho para definir os parâmetros para a legislação oficial deste leite no mercado. Tentou-se quantificar a influência da gordura, extrato seco total e acidez sobre os níveis de fosfatase alcalina e, ainda, os aspectos microbiológicos do leite antes e após os tratamentos térmicos ($59^{\circ}\text{C}/30'$; $63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$; $65^{\circ}\text{C}/30'$). Procedeu-se, também, à pesquisa de reativação, incubando-se o leite tratado a $65^{\circ}\text{C}/30'$, à temperatura de 5°C por 24 e 72 h. Foi observado que o leite cru de cabra apresentou resultados de fosfatase alcalina iguais a 7,58; 6,41 e 7,56 μg de fenol/ml, em relação ao de vaca que apresentou 10,95 μg de fenol/ml. As amostras de leite de cabra tratadas termicamente apresentaram resultados $59^{\circ}\text{C}/30'$ (1,69; 1,62; 1,88); $63^{\circ}\text{C}/30'$ (0,92; 0,81; 0,97); $65^{\circ}\text{C}/15'$ (0,91; 0,80; 0,87); $65^{\circ}\text{C}/30'$ (0,79; 0,87; 0,84), enquanto as amostras de leite de vaca registraram $59^{\circ}\text{C}/30'$ (8,47); $63^{\circ}\text{C}/30'$ (2,44); $65^{\circ}\text{C}/15'$ (2,18); $65^{\circ}\text{C}/30'$ (2,17). Baseado nestes achados, os parâmetros do leite bovino não são adequados para avaliar a eficiência da pasteurização no leite caprino. Houve uma correlação entre a porcentagem de gordura e o extrato seco total, em relação a fosfatase alcalina, porém o mesmo não ocorreu em relação a acidez no leite. Os tra-

tamentos térmicos empregados foram eficientes para reduzir a flora microbiana das amostras, segundo estes resultados, indicando os valores médios para a contagem global de \log_{10} 6,31 para o leite cru e \log_{10} 3,25; \log_{10} 3,06; \log_{10} 2,75; \log_{10} 2,39 para as amostras tratadas a $59^{\circ}\text{C}/30'$; $63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$ e $65^{\circ}\text{C}/30'$, respectivamente; para a contagem de coliformes foi encontrada uma contagem igual a \log_{10} 3,68 para o leite cru e não houve crescimento de coliformes nas amostras de leite tratadas termicamente. Foi observada uma pequena reativação nas amostras de leite incubadas, porém os baixos índices foram em consequência do curto período de incubação.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A fosfatase alcalina do leite.....	3
2.1.1. Importância.....	3
2.1.2. Fatores que influenciam sua concentração.....	5
2.1.2.1. Estágio de lactação.....	5
2.1.2.2. Teor de gordura.....	5
2.1.2.3. Alterações patológicas do úbere.....	6
2.1.3. Efeitos da temperatura de pasteurização.....	6
2.1.4. Métodos de análise.....	8
2.2. A reativação da fosfatase alcalina.....	11
2.3. Alguns parâmetros de interesse na composição do leite caprino.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material.....	16
3.1.1. Amostras.....	16
3.1.2. Metodologia de amostragem.....	17
3.2. Métodos.....	17
3.2.1. Determinação de acidez.....	17
3.2.2. Técnica de determinação de gordura.....	17

	Página
3.2.3. Determinação do extrato seco total.....	17
3.2.4. Preparo de amostras.....	18
3.2.4.1. Tratamentos térmicos.....	18
3.2.5. Análises microbiológicas.....	19
3.2.5.1. Coleta de amostras.....	19
3.2.5.2. Contagem global de microrganismos aeróbios mesofílicos.....	19
3.2.5.3. Contagem de coliformes.....	19
3.2.6. Determinação da fosfatase alcalina.....	19
3.2.6.1. Técnica de análise.....	20
3.3. Delineamento estatístico.....	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Níveis de fosfatase alcalina nos leites de <u>ca</u> <u>bra</u> e vaca.....	22
4.2. Composição em EST e % de gordura do leite capri no.....	23
4.3. Acidez.....	25
4.4. Análises microbiológicas.....	26
4.5. Reativação da fosfatase alcalina.....	26
5. DISCUSSÃO.....	32
5.1. Níveis de fosfatase alcalina nos leites de <u>ca</u> <u>bra</u> e de vaca.....	32
5.2. Influência do EST e % de gordura.....	33
5.3. Acidez no leite de cabra e vaca.....	35
5.4. Análises microbiológicas.....	35
5.5. Reativação da fosfatase alcalina.....	36
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Influência de diferentes tratamentos térmicos na inativação da fosfatase alcalina, nos leites caprino e bovino.....	22
TABELA II - Variação entre extrato seco total e % de gordura do leite de cabra e de vaca, de rebanhos da bacia leiteira de Juiz de Fora-MG	24
TABELA III - Variação da acidez do leite de cabra e de vaca de rebanhos da bacia leiteira de Juiz de Fora - MG.....	27
TABELA IV - Comparação entre a contagem global de microrganismos, no leite submetidos aos diferentes tratamentos térmicos.....	28
TABELA V - Comparação entre a contagem de coliformes no leite caprino e bovino, submetidos aos tratamentos térmicos distintos.....	29
TABELA VI - Reativação da fosfatase alcalina no leite caprino e bovino.....	30

1. INTRODUÇÃO

A composição do leite caprino difere do leite bovino também no seu teor em fosfatase alcalina. Entretanto, esta enzima termolábil já foi suficientemente estudada no leite bovino cru, em função de suas características físico-químicas, frente a tratamentos térmicos, mas carece ainda de investigação em leite de outras espécies, a exemplo do leite caprino. É sabido que esta enzima é inativada pela pasteurização, quando o processo é devidamente efetuado, segundo observações de KAY & GRAHAM (1933) servindo, por isto, de referência para garantir a qualidade sanitária dos laticínios.

A pesquisa da atividade desta enzima no leite caprino é usada como parâmetro para diferenciar o leite cru do devidamente pasteurizado (ou recontaminado com leite cru). Segundo LOEWNSTEIN et alii (1980), muitas das técnicas usadas no controle sanitário do leite bovino são inadequados para o leite caprino, sendo necessárias pesquisas neste setor.

O Brasil possui um rebanho de 9.037.000 cabeças de caprinos ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL (1984), sendo a maioria destes, animais rústicos e com boa produtividade em áreas pobres; por esta razão, os caprinos tornaram-se uma boa opção para a produção de leite e fabricação de queijos finos. Com a maior utilização industrial deste leite houve, por parte dos produtores, um grande interesse em importar animais e estabelecer um sistema de criação mais especializado, objetivando u

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. A fosfatase alcalina do leite

A fosfatase alcalina (fosfohidrolase monoéster ortofosfórica) é uma enzima de natureza glicoprotéica, com peso molecular 170.000 daltons, coeficiente de sedimentação 6,0s, apresentando baixa especificidade de substrato e forte variação do pH ótimo, em função da natureza do substrato, do tampão e da força ionizante do meio de incubação. Esta enzima é pouco sensível à L-fenilalanina, inibida pela L-homoarginina e imidazol. É estimulada por íons Mg^{++} e, suas características sugerem uma atividade muito fraca, se existente, dentro do leite (LINDEN, 1982).

2.1.1. Importância

De acordo com BURGWALD (1939), o teste da amilase foi a primeira tentativa de se utilizar a dosagem de uma enzima no controle da pasteurização do leite, não obtendo sucesso por não ser suficientemente sensível e/ou específico para detectar pequenas variações no tratamento térmico.

Foram KAY & GRAHAM (1933), na Inglaterra, os primeiros a verificar que a fosfatase alcalina estava associada à gordura do leite, encontrando-se adsorvida à proteína que reveste o glóbulo. Esses autores, pela primeira vez, mostra-

ram que em temperaturas entre 60-75^oC cerca de 96% desta enzima é inativada, enquanto o *Mycobacterium tuberculosis* é totalmente destruído, e descreveram um método qualitativo para distinguir o leite cru do leite pasteurizado (ou indevidamente pasteurizado). SCHARER (1938) o teste da fosfatase alcalina detecta adição de 0,5% de leite cru ao leite pasteurizado. SANDERS & SAGER (1947) e SANDERS & SAGER (1948) afirmaram que para a inspeção adequada do leite é necessário um rígido controle tempo/temperatura de pasteurização, sendo que os resultados negativos para a fosfatase alcalina, logo após o tratamento térmico, são indicadores da destruição dos microrganismos tidos como patogênicos, possivelmente presentes. HETRICK & TRACY (1948) consideraram o teste de fosfatase alcalina suficientemente sensível para detectar importantes variações nas condições de pasteurização. Segundo CAMPBELL & McFARREN (1961) a presença de uma quantidade apreciável da enzima após o tratamento térmico é indicativo de uma pasteurização inadequada, pois há um rígido paralelismo entre a inativação térmica da fosfatase alcalina e a destruição dos microrganismos patogênicos existentes no leite. RICHARDSON et alii (1964) afirmaram que a presença da fosfatase alcalina no leite pasteurizado é de grande importância para a saúde pública, desde que sua presença indica pasteurização imprópria ou recontaminação com leite cru. A pasteurização do leite tem por finalidade destruir os microrganismos nocivos a um nível que não constitua risco para a saúde pública, além de reduzir o número de saprófitas e, deve ser negativo ao teste da fosfatase alcalina, apresentando resultados equivalentes a menos de 2,2 microgramas de fenol liberado por mililitro da amostra, segundo as normas da INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF (1971). A termo-resistência da fosfatase alcalina é ligeiramente superior a dos patógenos, acima dos limites de tempo e temperatura reconhecidos para a adequada pasteurização; o teste é suficientemente sensível para detectar importantes variações nas condições de pasteurização com base na atividade da fosfatase residual (MURTHY et alii, 1972). A prova da fosfatase alcalina é indicada no controle da eficiência da pasteuriza

ção e pode, também, detectar a adição de leite cru ao leite pasteurizado, nas quantidades de 2%, segundo SÃ (1978). Para o leite pasteurizado, segundo a legislação em vigor, a prova da fosfatase alcalina deve ser negativa, BRASIL. Leis, decretos, etc. (1980). O maior interesse da fosfatase alcalina está na sua utilização como teste para o controle da pasteurização do leite e creme (VEISSEYRE, 1980). A fosfatase alcalina deve ser usada no controle da pasteurização, visto que a curva da inativação da enzima é paralela à da *Coxiella burnetii* e do *Mycobacterium tuberculosis* (ATHERTON, 1983).

2.1.2. Fatores que influenciam sua concentração

2.1.2.1. Estágio da lactação

BURGWALD (1939) afirmou que o leite de vacas em estágios iniciais da lactação apresentaram menores teores de fosfatase alcalina. HAAB & SMITH (1956), trabalhando com vacas Holstein e Jersey, encontraram que a máxima produção total de fosfatase alcalina por lactação, ocorreu na 24ª semana pós-parto, sendo que os valores mínimos e máximos ocorreram, aproximadamente, nas 1ª e 28ª semanas pós-parto, respectivamente. LINDEN & GED (1976) observaram níveis de fenol acima de 200µM, para vacas com mais de 24 semanas de lactação, e abaixo de 50 µM para animais com menos de 10 semanas de lactação. ANIFANKIS & ROSAKIS (1983), trabalhando com ovinos, verificaram maiores teores de fosfatase alcalina no leite desta espécie que em bovinos e caprinos e, observaram ainda, baixos teores enzimáticos no início da lactação, com aumento no meio do período, tendendo a declinar no fim.

2.1.2.2. Teor de gordura

BURGWALD (1939) afirmou que não há relação entre teor de gordura e fosfatase alcalina para o leite bovino cru. O mesmo foi observado por HAAB & SMITH (1956). LINDEN & GED

(1976) estudaram a atividade fosfatásica em leite bovino e verificaram que o aumento nos teores desta enzima é paralelo ao aumento da porcentagem de gordura. Já no leite de ovinos, ANIFANTAKIS & ROSAKIS (1983) verificaram correlação positiva entre os teores de fosfatase alcalina e porcentagem de gordura.

2.1.2.3. Alterações patológicas do úbere

BURGWALD (1939) afirmou que o leite de vacas com mamite apresentava maior teor de fosfatase alcalina que o leite normal. ABRAMYAN & BUNIATYAN (1970) observaram que no leite de cabra e de vaca havia uma elevação de, aproximadamente, 60% no teor de fosfatase alcalina, após 24-48h de infecção experimental do úbere. BOGIN & ZIV (1973) verificaram níveis de fosfatase alcalina até seis vezes maiores em leite de vaca mamítico, se comparado aos teores no leite normal. FUQUAY et alii (1975) estudaram a variação nos teores de fosfatase alcalina no plasma de vacas com mamite induzida por coliformes e verificaram alta concentração desta enzima dois dias após a infecção. AMIRA et alii (1981) verificaram maiores teores de fosfatase alcalina em leite mamítico de cabras e apontaram, como possíveis fontes de enzima o sangue, o tecido glandular, além do número muito grande de neutrófilos presentes.

2.1.3. Efeitos da temperatura de pasteurização

SANDERS & SAGER (1948), verificando dados de testes de fosfatase alcalina para amostras de leite de vaca aquecidas a temperaturas específicas por vários períodos de tempo, constataram que a destruição da enzima pelo calor é muito rápida no início e, diminui a uma taxa muito baixa com o tempo; encontraram como binômio tempo/temperatura requerido para reduzir a atividade enzimática da fosfatase alcalina a 4 unidades/ml em leite integral: 37,5' a 61,6°C; 30' a 62,05°C; 24'' a 71,1°C e 15'' a 76°C, observando ainda que a temperatura requerida para fornecer resultado negativo ao teste de fosfatase alcalina em

um período de tempo foi, geralmente, encontrado como sendo $0,7^{\circ}\text{F}$ menor para o leite magro que para o leite integral. HETRICK & TRACY (1948) afirmaram que variações nos teores iniciais de fosfatase alcalina podem requerer diferenças no binômio tempo/temperatura necessário para sua inativação. McGUGAN & HOWSAN (1964) estudaram os teores de fosfatase alcalina em queijos Cheddar produzidos com leite pasteurizado por 16" a $56,6^{\circ}\text{C}$, $60,^{\circ}\text{C}$, $63,3^{\circ}\text{C}$ e 66°C e verificaram 14, 21, 51 e 88% de inativação desta enzima, respectivamente. PARKASH & JENNESS (1968) mediram a atividade fosfatásica do leite caprino tratado a $62,5^{\circ}\text{C}$ por 5' e concluíram que os níveis desta enzima são reduzidos a valores pouco detectáveis, sendo que este resultado pode ser apenas um reflexo do baixo nível inicial da enzima. Acentuaram que não há dados seguros que forneçam uma informação satisfatória a respeito da sensibilidade térmica da enzima no leite caprino. LINDEN & GED (1976), trabalhando com amostras de leite de vaca, verificaram que o tratamento a 55°C de leite com maior ou menor atividade fosfatásica produziram a mesma curva de desnaturação térmica. MURTHY & PEELER (1980) estudaram o efeito da temperatura sobre a fosfatase alcalina, verificando que a fosfatase residual mínima detectável após o tratamento HTST é maior para o creme que para o leite. LINDEN (1982) afirmou que diferenças na composição do leite (porcentagem de gordura, teor protéico, minerais) são responsáveis por variações no teor residual de fosfatase alcalina após a pasteurização. ROSAKIS & ANIFANTAKIS (1982) pesquisaram o efeito de diferentes temperaturas sobre a atividade fosfatásica no leite bovino, ovino e caprino, e verificaram que a enzima do bovino é mais resistente ao tratamento térmico que as demais que apresentaram igual sensibilidade, sendo que o leite caprino não apresentava, no entanto, resultados constantes quando analisados pelo teste de rotina para fosfatase alcalina. ATHERTON (1983, 1984) observou, seguidamente, que a pequena quantidade de fosfatase alcalina no leite de cabra resulta no fracasso do teste para a distinção entre o produto cru e o pasteurizado.

2.1.4. Métodos de análise

Os métodos de dosagem da atividade fosfatásica no leite são inúmeros, havendo diferenças entre as quais as mais importantes dependem da natureza do substrato e do tipo de tampão utilizado. O princípio destas análises se baseia na hidrólise, pela fosfatase, de seu substrato, liberando um fenol que é dosado, e seu teor relacionado à quantidade da enzima presente inicialmente.

KAY & GRAHAM (1933) publicaram a seqüência de um método para a dosagem da fosfatase no leite pasteurizado a $62,7^{\circ}\text{C}$ por 30'. Este método foi, posteriormente, modificado pelos autores, em 1935, que usaram o fenilfosfato dissódio como substrato, em substituição ao sódio β -glicerofosfato. Segundo os autores, este teste é capaz de detectar leite tratado a $62,7^{\circ}\text{C}$ por 20', em lugar de 30' ou $1,5^{\circ}\text{F}$ abaixo da temperatura mínima para pasteurização ou, ainda, a mistura de 0,25% de leite cru ao leite corretamente pasteurizado. O leite de 2,3 unidades azuis "Lovibond" foi padronizado para leite corretamente pasteurizado $62,7^{\circ}\text{C} - 30'$. SCHARER (1938) publicou o procedimento de um teste para fosfatase alcalina com apenas 1 hora de incubação, usando o 2,6 dibromoquinonacloroimida (BQC), substância mais sensível ao fenol que o reagente de Folin e Ciocalteu. O autor propôs, por conveniência, identificar a unidade de cor com a intensidade produzida por 0,001 mg de fenol por 5 ml de solução. O padrão contendo 0,5 ppm de fenol conteria 0,0025 mg (2,5 δ) de fenol por 5 ml ou 2,5 unidades. Este teste pode detectar 1°F de variação na temperatura; 25' no tratamento a $61,6^{\circ}\text{C}$ em lugar de 30', e adição de 0,5% de leite cru ao leite devidamente pasteurizado. SCHARER (1938) também desenvolveu um teste rápido para uso a nível de campo, que pode ser feito em 10 a 15 minutos. Este teste, no entanto, não é tão sensível quanto o teste de laboratório. O leite devidamente pasteurizado toma coloração ligeiramente acinzentada. ROGER (1939) verificou que o "Scharer Rapid Field Test" pode detectar, facilmente, pequenas variações na pasteurização, quando bem usado como roti-

na. SANDERS & SAGER (1947) apresentaram modificações usadas na análise da fosfatase alcalina do leite de cabra: aumento do volume da amostra de 1 para 3 ml, uso de tampão bário-borato-hidróxido preparado com 27 g de hidróxido de bário e 11 g de ácido bórico, ambos dissolvidos em 500 ml de água destilada, além do uso de precipitante preparado com 7,5 g de sulfato de zinco e 0,1 g de sulfato de cobre dissolvidos em 100 ml de água destilada. KOSIKOWSKI (1949) publicou o método Cornell para determinação da fosfatase alcalina: 1 ml de leite é misturado com 10 ml de substrato tampão carbonato; os tubos teste são incubados a 32-37°C por 18-24 h; 1 ml de solução ácida precipitante é adicionado aos tubos; procede-se à filtração em papel Whatman nº 42; 5 ml do filtrado são colocados em tubo pequeno onde se adiciona 1 ml de sulfato de cobre 0,05%, 2% de solução Calgon e 5 ml de solução de carbonato de sódio 8%; 11 gotas de solução de BQC (50 mg/10 ml de álcool metílico absoluto) são adicionados; o tubo é incubado a 37°C por 15'; o desenvolvimento de cor é comparado com os padrões; valores acima de 58 δ fenol/0,5 ml de leite indicam leite cru ou indevidamente pasteurizado. KOSIKOWSKI, em 1951, publicou algumas modificações do método, descrevendo o procedimento para a análise "longa" (18-24 h a 32-37°C); "curta" (1 h a 37°C); "teste rápido de campo" (10' a 37°C). McFARREN et alii (1963) publicaram resultados de análises de fosfatase onde se procedeu a leitura da quantidade de fenol liberado pela amostra através da espectrofotometria. Os autores concluíram ser o teste mais simples, com menor consumo de tempo e podendo ser usado o limite de 2,3 µg de fenol ou menos por ml, como critério para adequada pasteurização. KOSIKOWSKI (1964) publicou estudo usando a diálise como método para determinação da fosfatase no leite e produtos lácteos, onde se podia detectar menos de 0,1% de leite cru, ou redução de 1-2°F na pasteurização HTST. O mesmo autor KOSIKOWSKI (1966, 1970), relacionou modificações do teste da fosfatase através da diálise. KLEYN & LIN (1968) descreveram um novo método para detecção da fosfatase alcalina do leite, usando-se monofosfato de fenoltaleína como substrato e verificaram ser o método bas-

tante preciso e específico. KLEYN & YEN (1970) utilizaram a leitura do espectrofotômetro para a determinação dos teores de fosfatase alcalina. Esses autores trabalharam com a diálise através de membrana de celulose para separar a fenolftaleína hidrolisada por esta enzima. A fenolftaleína livre participa do soluto, sendo transferida através dos poros da membrana junto com o tampão e outros solutos, resultando em um cristal claro, dialisável em pH 9,6, o qual pode ser medido diretamente no espectrofotômetro. A IDF (1971) recomendou método de referência para a determinação da fosfatase alcalina no leite, tomando-se a quantidade padrão de 1 ml de leite, substrato difenilfosfato de sódio, precipitante zinco-cobre e indicador BQC para o fenol liberado. BIANCO et alii (1972) descreveram teste de fosfatase alcalina através da diálise: a amostra a ser testada, adicionada de "substrato tampão padrão Cornell", é colocada em tubos de celofane imersos em solução de sulfato de cobre e incubados. Durante o período de incubação o fenol liberado pela fosfatase residual migra através da membrana até a solução de sulfato de cobre. Proteínas e outras substâncias são retidas pela membrana, a qual é removida após a incubação, eliminando a etapa de precipitação do teste "Padrão Cornell". A cor do dialisado é desenvolvida com CQC, então, medida "visualmente" ou por espectrofotometria. A IDF (1978) apresentou o método de rotina para a determinação da fosfatase alcalina no leite utilizando, para tal, 5 ml de substrato tampão e 1 ml de leite. A leitura foi feita por comparador e disco especial. MONGET & LAVIOLETTE (1978) sugeriram outro método com período de incubação de 30' para a detecção da fosfatase alcalina em leite, utilizando a fenolftaleína monofosfato como substrato; esses autores encontraram uma sensibilidade comparável àquela dos métodos oficiais, sendo melhor para o controle da pasteurização que para a contaminação do leite pasteurizado com leite cru. LINDEN & PAQUET (1981) desenvolveram métodos para o controle da pasteurização do leite que requer somente a preparação de duas misturas: um substrato tampão (dietanolamina/ácido hidrocloreico contendo paranitrofenilfosfato) e mistura de triton/ciclohexanona/

n-butilamina/ácido hidrocloreico. Este método, segundo os autores, aumentou a sensibilidade em 2,5 vezes, se comparado ao método oficial da IDF (1971). WILLIAMS (1986) fez modificações no teste de fosfatase alcalina, para a determinação da eficiência de pasteurização em leite caprino, conseguindo detectar níveis similares aos mostrados para o leite bovino. Esse autor introduziu as seguintes alterações: 3ml da amostra (antes 1 ml); 4h de incubação a $37,5^{\circ}\text{C} + 0,5^{\circ}\text{C}$ (antes 2 h); em seguida, procedeu como no teste por ele utilizado como referência, para o leite caprino. Com estas modificações, foi possível a mesma sensibilidade para detectar a pasteurização deficiente ou contaminação com leite caprino cru, nos mesmos níveis conseguidos para o leite bovino.

2.2. A reativação da fosfatase alcalina

O leite e creme, fosfatase negativos, logo após a pasteurização, sob certas condições de armazenagem (tempo e temperatura), podem tornar-se, novamente, fosfatase positivos. Esta atividade fosfatásica do leite ou creme pasteurizado é proveniente da enzima dita "reativada". Este fenômeno denominou-se "reativação da fosfatase" BURGWALD (1939); BARBER & FRAZIER (1943); FRAM (1957); CAMPBELL & McFARREN (1961); SHARMA & GANGULI (1974); VEISSEYRE (1980); LINDEN (1982).

BURGWALD (1939) afirmou que 90% das amostras de manteiga fosfatase alcalina - negativas pelo teste de SCHARER (1938) logo após a produção, ao serem novamente analisadas após 8 dias a 21°C , tornaram-se positivas. O autor concluiu que a atividade fosfatásica foi proveniente da ação bacteriana. HAMMER & OLSON (1941) estudaram a atividade fosfatásica da manteiga e dos microrganismos que crescem neste produto. Eles observaram que a enzima pode ser liberada durante a estocagem por microrganismos do gênero *Pseudomonas*, sendo que o teste de fosfatase não indica pasteurização inadequada do creme. BARBER & FRAZIER (1943) verificaram que o creme pasteurizado fosfatase negativo desenvolveu reação positiva após 3 dias a

10°C, e estudando o fenômeno da reativação chegaram às conclusões sobre a influência das bactérias e as condições exigidas para a liberação de fosfatase alcalina neste substrato. WRIGHT & TRAMER (1956) observaram que a reativação da fosfatase alcalina do leite é afetada pela presença de íons Mg^{++} e Mn^{++} ativando o processo e Cu^{++} , Ni^{++} e Co^{++} inibindo. FRAM (1957) estudou a reativação da fosfatase em creme e verificou que a pasteurização por tempo curto leva à reativação após 2h à temperatura ambiente; o tratamento LT não leva à reativação; a reativação é maior em função do teor de gordura e que na pasteurização HTST a reativação da fosfatase não é de origem microbiana. FRAM (1957) observou um aumento na quantidade de fosfatase reativada, em amostras de creme, onde a temperatura de pasteurização e o tempo de estocagem foram maiores. RICHARDSON et alii (1964) verificaram que no creme o potencial de reativação da fosfatase é proporcional à temperatura de estocagem após a pasteurização KRESHECK & HARPER (1966) estudaram fatores que afetam a reativação da fosfatase no leite e verificaram que o pH ótimo está entre 6,2 e 6,8; EDTA adicionado antes do tratamento térmico eliminava completamente a reativação, enquanto a adição após o tratamento inibia o processo em 35%. SHARMA & GANGULI (1974) estudaram a reativação da fosfatase em leite bovino e bubalino e concluíram que a taxa de inativação térmica da enzima nativa e reativada estebelece que a enzima não é de origem microbiana, pois a fosfatase do leite é destruída a 70°C por 1,5' enquanto a microbiana não é apreciavelmente inativada a 70°C - 5'. MURTHY et alii (1976) estudaram a reativação da fosfatase alcalina em produtos lácteos líquidos, pasteurizados pelo sistema UHT, e verificaram que o pH ótimo para reativação está entre 6,2 e 6,8 sendo que a máxima atividade está entre 6,4-6,5; estocagens a 34-35°C apresentavam maior reativação da fosfatase; quanto maior o teor de gordura, maior a taxa de reativação da enzima, sendo que houve uma correlação linear entre a concentração inicial da fosfatase e a taxa de reativação. LINDEN (1979) afirmou que a reativação da fosfatase depende da presença de íons Mg^{++} e Zn^{++} . KUZUYA et alii

(1981) estudaram algumas propriedades da fosfatase reativada do leite de cabra concluíram ser ela similar à enzima do leite bovino, com respeito ao comportamento na coluna de cromatografia Sephadex G-200, no disco de eletroforese, pH ótimo e efeito do íon Mg^{++} e EDTA. LINDEN (1982) resumiu o processo de reativação da seguinte maneira: o íon Zn^{++} fixa-se ao sítio ativo da fosfatase alcalina desmetalizada, desnaturada, revertendo o processo e o Mg^{++} estimula a enzima residual ou reativada.

2.3. Alguns parâmetros de interesse na composição do leite caprino

PARKASH & JENNESS (1968) verificaram que o conteúdo em gordura do leite caprino caracteriza-se por apresentar concentrações relativamente altas de ácidos graxos de cadeia curta com 4-12 átomos de carbono. FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978) estudaram a composição do leite de cabra na plataforma de recepção do CEPE/ILCT-EPAMIG, em Juiz de Fora - MG, e encontraram os seguintes valores médios: EST 14,12%; gordura 4,69%; acidez 17,7^oD. FURTADO (1978) afirmou que a acidez do leite caprino é inferior ao bovino, possivelmente, devido à diferença existente entre os grupos carboxílicos das proteínas dos dois leites. Enquanto a acidez titulável do leite de vaca situa-se na faixa de 16 a 18^oD, aquela, do leite caprino, situa-se na faixa de 14 a 16^oD (leite fresco e ordenhado em boas condições de higiene). A acidez do leite sofre uma grande variação por ser muito influenciada pela ação da temperatura, condições de transporte, higiene da ordenha, entre outros fatores. O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal considera como normal a acidez do leite situada na faixa de 15 a 18^oD. BRASIL. Leis, decretos, etc. (1980). WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978) estudaram os teores médios de EST e gordura no leite caprino, em Juiz de Fora, encontrando 14,23% e 4,75%, respectivamente. JENNESS (1980) reportou os teores de EST e gordura do leite caprino, na raça Saanen, na Austrália e Nigéria. No primeiro país, encontrou valores médios de 13,47%

para o EST e de 4,61% para a gordura e na Nigéria, 12,15% para o EST e 3,41% para a gordura. Os dados reportados pela IDF (1981) apresentaram médias de EST para o leite caprino iguais a 11,5% (variando entre 11,0 e 13,0%) e de gordura iguais a 3,36% (variando entre 2,0 e 5,0%). GRAPPIN et alii (1981) trabalhando com rebanhos mistos Saanen encontraram uma composição do teor de gordura anual igual a 3,38%. MIDDLETON & FITZ-GERALD (1981) estudando rebanho Saanen/Toggenburg e Ango-Nubiana encontraram valores médios de 3,4% para a gordura e 11,65% para o EST. DEVENDRA & McCLEROY (1982) apresentaram médias de 13,9% para EST e 4,8% para o teor de gordura do leite caprino nos trópicos. SAWAYA et alii (1984), na Arábia Saudita, trabalharam com rebanhos Masri e Aardi, encontrando valores médios de 2,83% para a gordura e 11,13% para EST e 3,06% e 11,15%, respectivamente. ATHERTON (1984) afirmou que a porcentagem do leite caprino varia muito no período de lactação estando a média ao redor dos 3,0%. Dados relativos à composição do leite caprino e bovino foram retirados da literatura compilada, estabelecendo-se estas diferenças no QUADRO I.

Os níveis de fosfatase alcalina, detectáveis no leite caprino, são significativamente menores que no leite bovino. SANDERS & SAGER (1947); PARKASH & JENNESS (1968). ROSAKIS & ANIFANTAKIS (1982), na Grécia, encontraram média dos teores de fosfatase alcalina, no leite de cabra, igual a 455µg fenol/ml e no leite de vaca igual a 3536µg fenol/ml e verificaram maior termo-sensibilidade da enzima no leite caprino, em relação ao do leite bovino. Segundo ATHERTON (1983) e ATHERTON (1984) os teores de fosfatase alcalina, no leite caprino, apresentaram-se reduzidos, não permitindo a distinção entre leite cru e pasteurizado. BONASSI (1987) afirma que o teste da fosfatase alcalina não é adequado para avaliar a eficiência de pasteurização no leite de cabra.

QUADRO I - Dados referentes à composição dos leites caprino e bovino, compilados de vários autores

Autores/local	Gordura (%)	EST (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Minerais (%)	Acidez (°D)
- Leite caprino						
PARKASH & JENNESS (1968) compilação	4,1	13,4	3,3	4,7	0,77	-
JENNESS & SLOAN (1970) compilação	4,5	13,2	-	-	-	-
FURTADO (1978) Brasil	-	-	-	-	-	19
FURTADO (1978) Brasil	4,0	14,5	3,5-3,9	4,0-5,0	-	14-16
FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978) Brasil	4,7	14,1	3,9	4,7	0,77	17,7
SÁ (1978) Portugal	4,8	-	-	-	-	-
WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978) Brasil	4,8	14,2	4,0	4,7	0,78	17,9
JENNESS (1980) Austrália	4,6	13,5	3,4	4,8	-	-
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF (1981) compilação	3,4	11,5	-	-	-	-
MIDDLETON & FITZ-GERALD (1981) Austrália	3,4	11,6	3,3	-	-	-
QURESHI et alii (1981) Índia	4,7	13,3	-	-	-	-
DEVENDRA & McLERoy (1982) África	4,8	13,9	-	-	-	-
- Leite bovino						
JENNESS & SLOAN (1970) compilação	3,7	12,7	-	-	-	-
FURTADO (1978) Brasil	3,5	12,5	3,1-3,5	4,7-5,2	-	16-18
FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978) Brasil	3,5	12,3	-	-	-	16,7
SÁ (1978) Portugal	3,6	-	-	-	-	-
DEVENDRA & McLERoy (1982) África	4,8	13,5	-	-	-	-

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras

As amostras de leite de cabra e de vaca, que são fornecidas diariamente, foram coletadas na plataforma do Centro de Pesquisa/Instituto de Laticínios Cândido Tostes, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - CEPE/ILCT - EPAMIG, provenientes de rebanhos da bacia leiteira da microrregião de Juiz de Fora - MG, no período de maio a julho de 1986. O transporte diário do leite, em latão, era efetuado em caminhão convencional, chegando à indústria até às 12:00 horas, conforme previsto pela legislação BRASIL. Leis, decretos etc. (1980). As propriedades leiteiras onde as amostras de leite de cabra foram obtidas, apresentavam boas instalações para os animais, regime de semi-confinamento e uma ordenha manual, realizada pela manhã.

As amostras de leite caprino foram obtidas de dois produtores, de rebanhos assim especificados: produtor "A" e "B" raça predominante Toggenburg. A amostra "C" foi preparada através de mistura proporcional das duas amostras de leite de cabra, anteriormente descritas (denominada amostra composta).

A amostra "D", de leite bovino, foi coletada na plataforma de recepção, diretamente do tanque de pesagem, sendo

representativa do leite de mistura dos fornecedores do CEPE/ILCT-EPAMIG.

3.1.2. Metodologia de amostragem

O volume de leite caprino recebido diariamente pela indústria era de, aproximadamente, 20 litros, distribuídos pelos dois produtores, ao passo que, o volume de leite bovino era de 16.000 litros.

Foram realizadas 26 coletas de amostras durante o experimento. O volume de cada amostra era de 500 ml de leite, após prévia homogeneização e antes de qualquer tratamento térmico.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação de acidez

Todas as amostras de leite, antes dos tratamentos térmicos delineados nos ensaios experimentais, imediatamente após a chegada ao laboratório, foram analisadas para a determinação da acidez titulável, segundo a técnica recomendada pelo LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL (1981).

3.2.2. Técnica de determinação de gordura

Foi feita a determinação de gordura das amostras de leite, pelo método do butirômetro de Gerber, segundo as normas da IDF (1981).

3.2.3. Determinação do extrato seco total

A determinação do EST das amostras de leite foi conduzida segundo o método analítico recomendado pela IDF (1962).

3.2.4. Preparo das amostras

De cada amostra de leite foram pipetados 20 ml de leite e transferidos para os tubos de ensaio, devidamente identificados, com o nome do produtor e o tratamento térmico a ser efetuado, de forma que cada amostra era desdobrada em sete novas amostras para a pesquisa da fosfatase alcalina.

Estas amostras foram submetidas, no laboratório, aos tratamentos térmicos estabelecidos no delineamento experimental.

3.2.4.1. Tratamentos térmicos

As amostras de leite, nos tubos de ensaio, foram aquecidas em banho de água fervente, até a temperatura programada e, a seguir, transferidas, imediatamente, para banhos-maria com temperatura ajustada e controlada.

As temperaturas preconizadas, conforme delineamento experimental, para estas amostras foram as seguintes:

- 59^oC por 30 minutos;
- 63^oC por 30 minutos;
- 65^oC por 15 minutos;
- 65^oC por 30 minutos.

Foram escolhidos, portanto, tratamentos térmicos de leite pasteurizado (63^oC/30' e 65^oC/30') e não pasteurizado (59^oC/30' e 65^oC/15').

As amostras A, B e D, tratadas a 65^oC por 30 minutos, foram feitas em duplicata que, posteriormente, se prestaram à pesquisa de fosfatase alcalina reativada.

Decorrido o tempo indicado, as amostras de leite foram, rapidamente, retiradas e resfriadas até a temperatura de 8-10^oC, em banho de água gelada.

A seguir, as amostras de leite, em duplicata, dos produtores A, B e D, tratadas a 65^oC por 30', foram incubadas em geladeira, à temperatura ajustada para 5^oC, por períodos de

24 e 72 horas.

3.2.5. Análises microbiológicas

3.2.5.1. Coleta de amostras

Semanalmente, foram feitas análises microbiológicas das amostras de leite. Para tal, coletou-se uma alíquota de todas as amostras de leite do dia, antes dos tratamentos térmicos, e, depois, escolhendo-se aleatoriamente, um determinado produtor, analisou-se o leite após todos os tratamentos térmicos indicados.

3.2.5.2. Contagem global de microrganismos aeróbios mesofílicos

Foi feita a contagem global de microrganismos em placas de ágar padrão*, segundo as normas da IDF (1958).

3.2.5.3. Contagem de coliformes

A enumeração de coliformes foi conduzida em meio Violet Red Bile - VRB**, segundo o método descrito pelas normas da IDF (1971), das mesmas amostras usadas para a contagem global.

3.2.6. Determinação da fosfatase alcalina

As amostras de leite dos quatro produtores foram analisadas de acordo com o delineamento, assim previsto: leite cru, leite tratado a 59°C/30 minutos; a 63°C/30'; a 65°C/15' e a 65°C/30'.

As amostras dos produtores A, B e D, tratadas a

* DIFCO nº B2

** DIFCO nº B12

65°C por 30 minutos e submetidas, posteriormente, à incubação a temperatura de 5°C por 24 horas e 72 horas foram analisadas para a verificação analítica da reativação da fosfatase alcalina.

3.2.6.1. Técnica de análise

Foi feita a determinação quantitativa da fosfatase alcalina, de todas as amostras anteriormente descritas, num total, aproximado, de 720 análises; segundo a técnica recomendada por KOSIKOWSKI (1966); KOSIKOWSKI (1970), assim descrita:

1. Em saco de diálise com 8 polegadas de comprimento, amarrado em uma das bordas colocar 10 ml de substrato tampão carbonato-bicarbonato de sódio (37°C - pH 9,4) e 5 ml da amostra de leite.
2. Fechar o saco de diálise e colocar em tubo de ensaio, com 10 ml de solução de sulfato de cobre.
3. Banho-maria a 37°C - 1 h.
4. Descartar os sacos de diálise e adicionar II gotas de BQC na solução, colocando-a a 37°C - 5'.
5. Proceder à leitura em espectrofotômetro (filtro 650 nm).

3.3. Delineamento estatístico

Para a avaliação estatística dos níveis de fosfatase alcalina no leite caprino e bovino, as médias de cada tratamento foram comparadas pela análise de variância, para a determinação da significância das diferenças, ao nível de 5% de probabilidade REMINGTON & SCHORK (1970); SNEDECOR & COCHRAN (1973).

A análise de variância foi também usada para estabelecer as possíveis diferenças dos teores de gordura, EST e acidez no leite caprino e no leite bovino, ao nível de 5% de probabilidade estatística, utilizando-se o teste de Tuckey &

Scheffê para avaliar as diferenças entre as médias específicas (SNEDECOR & COCHRAN, 1973).

A contagem global e o número de coliformes nas amostras de leite foram interpretadas estatisticamente, convertendo-se o número de bactérias por mililitro em \log_{10} /unidades formadoras de colônias (UFC/ml de leite). Foram comparadas as médias de contagem global e coliformes do leite na interpretação estatística, usando-se a análise de variância (REMINGTON & SCHORK, 1970). No leite submetido aos tratamentos térmicos não foi possível a interpretação para o teste de coliformes, segundo o delineamento estatístico.

Determinou-se, ainda, o modelo matemático para melhor explicar a hipótese estatística da significância das variáveis: gordura, EST e acidez do leite sobre os níveis de fosfatase alcalina, atribuindo-se para a variável dependente $Y = \mu\text{g}$ de fosfatase alcalina; X_1 e X_2 para % de gordura e % do EST, respectivamente, e X_3 para a acidez do leite.

O teste de correlação estatística foi usado para estabelecer a comparação entre a fosfatase alcalina reativada nos tempos definidos no delineamento de 24 e 72 horas, ao nível de 1% e 5% de probabilidade estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Níveis de fosfatase alcalina nos leites de cabra e vaca

A TABELA I apresenta as médias de fosfatase alcalina obtidas nos diversos tratamentos térmicos, do leite de vários produtores.

TABELA I - Influência de diferentes tratamentos térmicos na inativação da fosfatase alcalina, nos leites caprino e bovino

Tratamentos térmicos	Produtores			
	A	B	C	D
	(Valores médios (μg fenol/ml))			
CRU	7,58	6,41	7,56	10,95
59 ^o C/30'	1,69	1,61	1,88	8,47
63 ^o C/30'	0,92	0,81	0,97	2,44
65 ^o C/15'	0,91	0,80	0,87	2,18
65 ^o C/30'	0,79	0,87	0,84	2,17

Foi observado que a média de fosfatase alcalina no

leite cru de vaca (10,95) é superior à encontrada para as amostras de leite de cabra (7,58; 6,41; 7,56/ μ g de fenol).

Os tratamentos térmicos inativaram, proporcionalmente, a fosfatase alcalina inicial, tanto para as amostras de leite caprino, como bovino.

Com relação a inativação da fosfatase alcalina, no leite de cada produtor, houve idêntico comportamento, ou seja, as amostras inativadas pelo tratamento 59°C/30' sempre foram estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) das outras amostras tratadas a 63°C/30'; 65°C/15' e 65°C/30'.

Os tratamentos térmicos (63°C/30'; 65°C/15' e 65°C/30') são estatisticamente iguais entre os produtores.

A inativação da fosfatase alcalina, quando submetida aos tratamentos térmicos delineados no ensaio experimental (59°C/30'; 63°C/30'; 65°C/15' e 65°C/30'), foi altamente significativa ($P \leq 0,01$), independentemente do produtor e do tipo de leite, quanto à espécie.

Entre os tratamentos térmicos, as diferenças foram altamente significativas, bem como a interação produtor/tratamento térmico.

4.2. Composição em EST e % de gordura do leite caprino

Os valores médios de extrato seco total e % de gordura do leite de cabra e vaca foram registrados na TABELA II.

Os valores médios de EST encontrados para o leite de cabra (14,48; 14,09; 14,14) apresentaram níveis mais elevados que os do leite de vaca (12,52).

A porcentagem de EST foi estatisticamente diferente entre os tipos de leite analisados, ao nível de 5% de probabilidade. Pelo teste de Tuckey, observou-se a significância da diferença ($P \leq 0,05$) do EST do leite de vaca (12,52), em relação ao leite de cabra (14,48; 14,09; 14,14). Entre as amostras de leite de cabra (A, B e C) não foi detectada diferença significativa.

TABELA II - Variação entre extrato seco total e % de gordura do leite de cabra e de vaca, de rebanhos da bacia leiteira de Juiz de Fora - MG

Produtor	EST				Gordura			
	Média (%)	Amplitude (A)	Coeficiente Variação (CV)		Média (%)	Amplitude (A)	Coeficiente Variação (CV)	
A	14,48	4,31	5,54		5,24	2,2	8,54	
B	14,09	3,85	6,72		4,82	1,6	9,34	
C	14,14	4,69	6,11		4,98	1,1	7,34	
D	12,52	6,34	10,91		4,01	2,2	14,59	

Os valores médios da % de gordura encontrados para o leite de cabra (5,24; 4,82) apresentaram níveis mais elevados que os do leite de vaca (4,01), o mesmo ocorrendo com o leite da amostra composta (4,98).

A magnitude de variação foi maior no produtor A e no produtor D, porém, o coeficiente de variação no leite de cabra foi baixo, indicando uma repetibilidade satisfatória, com boa confiabilidade nos resultados. O coeficiente de variação do leite de vaca foi mais alto (14,59%).

Pela análise de variância registrou-se uma diferença altamente significativa ($P \leq 0,01$) entre os níveis de gordura nos tipos de leite estudados. Pelo teste de Tuckey evidenciou-se que o teor de gordura encontrado no leite de vaca (4,01) foi significativamente menor que o encontrado no leite de cabra ($P \leq 0,05$).

Observou-se uma correlação altamente significativa entre a % de gordura e o EST no leite caprino. Em relação a variável dependente, fosfatase alcalina, houve uma correlação positiva com a % de gordura e o EST, explicada pelo modelo matemático da análise de regressão quadrática que se segue:

$$Y_2 = 30,3919 - 11,2357 (X_2) + 1,086 (X_2)^2$$

Y_2 = níveis de fosfatase alcalina no leite tratado a $59^{\circ}\text{C}/30'$

X_2 = % de gordura

$$Y_5 = -12,14 + 2,1128(X_1) - 0,0845(X_1)^2$$

Y_5 = níveis de fosfatase alcalina no leite tratado a $65^{\circ}\text{C}/30'$

X_1 = EST

Procurou-se, portanto, através desse modelo matemático, quantificar a influência da % de gordura e do EST sobre os níveis de fosfatase alcalina, registrando-se um efeito significativo das duas variáveis estudadas, ao nível de 5%, sobre a variável dependente.

4.3. Acidez

Os valores médios de acidez obtidos para os diferentes

tipos de leite são encontrados na TABELA III.

A análise de variância mostrou uma diferença estatística significativa para a acidez ($P \leq 0,05$) entre as amostras de leite de diferentes produtores (A, B, C e D). Pelo teste de Tukey verificou-se que a acidez no leite dos produtores A e D foi significativamente menor que do produtor B ($P \leq 0,05$).

Pela análise de regressão, procurou-se quantificar a influência da acidez sobre os níveis de fosfatase alcalina, não se registrando, entretanto, uma influência, pela falta de correlação positiva entre as duas variáveis.

4.4. Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas são encontrados nas TABELAS IV e V.

Os valores encontrados em \log_{10} UFC/ml entre as amostras de leite cru (6,31) e as amostras de leite tratadas termicamente registraram, pela análise de variância, uma diferença significativa ($P \leq 0,01$).

Pelo teste de Scheffé, a nível de 5% de probabilidade, evidenciou-se para a contagem global de microrganismos que o número de UFC/ml foi similar entre as amostras tratadas termicamente, independente da temperatura e tempo de tratamento, porém, foi maior nas amostras de leite cru.

Pelo teste de Scheffé, ao nível de 5% de probabilidade, evidenciou-se para a contagem de coliformes, que o número de UFC/ml foi maior nas amostras de leite cru, não havendo, porém, crescimento de colônias entre as amostras de leite tratadas termicamente, independente da temperatura ou do tempo de tratamento.

4.5. Reativação da fosfatase alcalina

A TABELA VI apresenta os resultados da fosfatase alcalina (μg de fenol liberado/ml), das amostras de leite caprino e bovino, após os períodos de incubação estabelecidos no deli-

TABELA III - Variação da acidez do leite de cabra e de vaca de rebanhos da bacia leiteira de Juiz de Fora - MG

Produtor	Média \bar{x}	Amplitude (A)	Desvio padrão (S)
A	16,75	6	1,29
B	18,12	6	1,41
C	17,19	6	4,31
D	16,86	4	0,96

TABELA IV - Comparação entre a contagem global de microrganismos, no leite submetido aos diferentes tratamentos térmicos

Tratamentos térmicos (1)	Nº de repetições (n)	Médias UFC/ml (\log_{10})
Cru	39	6,31
59°C/30'	10	3,25
63°C/30'	10	3,06
65°C/15'	10	2,75
65°C/30'	10	2,39

(1) Leite cru - foram analisadas amostras de todos os produtores (A, B, C e D).

Leite tratado - foi escolhida, ao acaso, amostra de leite de cabra de um dos produtores A ou B, submetida aos quatro tratamentos térmicos descritos.

TABELA V - Comparação entre a contagem de coliformes no leite caprino e bovino, submetidos aos tratamentos térmicos distintos

Tratamentos térmicos (1)	Nº de repetições (n)	Médias UFC/ml (\log_{10})
Cru	39	3,68
59 ^o C/30'	10	NC(2)
63 ^o C/30'	10	NC
65 ^o C/15'	10	NC
65 ^o C/30'	10	NC

(1) Leite cru - foram analisadas amostras de todos os produtores A, B, C e D.

Leite tratado - foi escolhida, ao acaso, amostra de leite de cabra de um dos produtores A ou B, submetida aos quatro tratamentos térmicos descritos.

(2) Não houve crescimento de coliformes.

TABELA VI - Reativação da fosfatase alcalina no leite caprino e bovino

Período	Amostras		
	(valores médios $\mu\text{g fenol/ml}$)		
	A	B	D
65°C/30' (T=0)	0,79	0,87	2,17
5°C/24h	0,80	0,82	2,04
5°C/72h	0,98	0,86	2,38

neamento estatístico, para pesquisa da fosfatase reativada.

Para demonstrar o efeito da temperatura/tempo na reativação da fosfatase alcalina no leite de cabra e de vaca, determinou-se, pela análise de regressão múltipla, o modelo matemático pela equação:

$$Y(65^{\circ}\text{C}/30') = 0,110075 + 0,641305 (5^{\circ}\text{C}/24\text{h}) + 0,23799(5^{\circ}\text{C}/72\text{h})$$

Encontrou-se uma influência altamente significativa para a variável X (24h), ao nível de $P \leq 0,01$, neste modelo; e uma significância estatística, ao nível de $P \leq 0,05$, para o tempo de X (72h). O coeficiente de determinação do modelo foi igual a 69,08%.

Em relação ao tratamento térmico, identificado por $Y = 65^{\circ}\text{C}/30'$, e os tempos indicados no delineamento para observar a reativação da fosfatase alcalina, no período de 24 e 72h, houve uma correlação estatística registrada para a fosfatase alcalina nos tempos de 24h e 72h, igual a 0,81 e 0,75, respectivamente.

Pode-se afirmar, pela observação dos dados contidos na TABELA VI, que a fosfatase alcalina residual (após o tratamento térmico a $65^{\circ}\text{C}/30'$) é similar para as amostras de leite de cabra (0,79 e 0,87) e apresentou valor de $2,17\mu\text{g}$ de fenol/ml para o leite bovino. Para a reativação, contudo, os tempos de 24h e 72h foram suficientes para demonstrar este efeito.

5. DISCUSSÃO

5.1. Níveis de fosfatase alcalina nos leites de cabra e de vaca

Os dados observados, de níveis médios de fosfatase alcalina de leite de cabra e vaca, estão em conformidade com os achados de SANDERS & SAGER (1947); PARKASH & JENNESS (1968); BUSHNELL (1980); ANIFANTAKIS & ROSAKIS (1983); ATHERTON (1983); ATHERTON (1984); WILLIAMS (1986). Ainda foi identificada pelas análises estatísticas uma diferença significativa entre as médias de fosfatase alcalina nas amostras de leite cru de cabra (7,58; 6,41; 7,56 μ g de fenol) e de vaca (10,95), também confirmadas pelos mesmos autores.

As amostras de leite de cabra e de vaca, tratadas termicamente, demonstraram uma inativação proporcional da fosfatase alcalina, estando de acordo com as citações da literatura. SANDERS & SAGER (1948); HETRICK & TRACY (1948); MCGUGAN & HOWSAM (1964); PARKASH & JENNESS (1968); ROSAKIS & ANIFANTAKIS (1982); ATHERTON (1983); WILLIAMS (1986).

Com relação aos tratamentos térmicos empregados, observou-se que as amostras tratadas a 59^oC/30'. foram estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$) das amostras tratadas a 63^oC/30', 65^oC/15' e 65^oC/30', distinguindo-se dos experimentos anteriores que delinearão um tratamento térmico, equivalente à pasteurização do leite, BURGWARD (1939); BARBER & FRAZIER (1943).

As amostras tratadas a 59°C/30' obtiveram valores médios de fosfatase alcalina para leite de cabra e de vaca de 1,69; 1,61; 1,88 e 8,47µg fenol/ml, respectivamente, demonstrando uma maior inativação da fosfatase alcalina no leite de cabra. Os valores encontrados para o leite de cabra (1,69; 1,61 e 1,88) são inferiores ao estabelecido pelas normas da IDF (1971), que determina como sendo superiores a 2,2µg fenol/ml os resultados para o leite cru ou leite indevidamente pasteurizado. Não há, portanto, no leite de cabra, devido a estes valores encontrados, como fazer a distinção entre o leite pasteurizado e o leite cru ou leite indevidamente pasteurizado. Estes dados são reforçados pelos estudos de SANDERS & SAGER (1947); HETRICK & TRACY (1948); PARKASH & JENNESS (1968); ROSAKIS & ANIFANTAKIS (1982); ANIFANTAKIS & ROSAKIS (1983); ATHERTON (1983); ATHERTON (1984); WILLIAMS (1986); BONASSI (1987) que concluíram não ser o teste da fosfatase alcalina, segundo os parâmetros de leite bovino, adequado para avaliar a eficiência da pasteurização no leite de cabra.

Isto se deve à falta de pesquisa para determinar os níveis de µg fenol/ml de leite de cabra devidamente pasteurizado. Sugere-se, para a sua possível utilização uma revisão dos padrões determinados para o leite, adaptando-os para o leite caprino.

5.2. Influência do EST e % de gordura

Os valores médios relativos à composição do leite caprino e bovino foram comparados com os dados da literatura compilada, conforme descrito no QUADRO I.

Todos os valores médios de EST para o leite de cabra (14,48%; 14,09% e 14,14%) apresentaram níveis mais elevados que os do leite de vaca (12,52%). Estes resultados estão em concordância com os achados dos autores FURTADO (1978); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978); DEVENDRA & McLEROY (1982).

Segundo a literatura, PARKASH & JENNESS (1968); FURTA-

DO (1978); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978); DEVENDRA & McCLEROY (1982), o EST das amostras de leite de cabra (A, B e C) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (14,48%; 14,09%; 14,14%). Pelo teste de Tuckey, observou-se uma diferença significativa do EST do leite de cabra em relação ao leite de vaca (12,52%), também previsto nas pesquisas citadas anteriormente.

Os valores médios da % de gordura encontrados para o leite de cabra (5,24%; 4,82%; 4,98%) estão compatíveis com os dados de PARKASH & JENNESS (1968); JENNESS & SLOAN (1970); FURTADO (1978); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); SÁ (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978); JENNESS (1980); QURESHI et alii (1981); DEVENDRA & McCLEROY (1982). Estes valores apresentaram níveis mais elevados que os do leite de vaca (4,01%), conforme os achados de pesquisadores como JENNESS & SLOAN (1970); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); SÁ (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978); JENNESS (1980); QURESHI et alii (1981); DEVENDRA & McCLEROY (1982).

Pela análise de variância registrou-se uma diferença altamente significativa ($P < 0,01$) entre os níveis de gordura nos tipos de leite estudados. Pelo teste de Tuckey evidenciou-se que o teor de gordura encontrado no leite de vaca (4,01 %) foi significativamente menor que os níveis encontrados no leite de cabra (5,24%; 4,82%; 4,98%) confirmando os achados de JENNESS & SLOAN (1970); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); SÁ (1978).

Observou-se uma correlação altamente significativa entre a % de gordura e o EST, conforme relatos da literatura PARKASH & JENNESS (1968); JENNESS & SLOAN (1970); FURTADO (1978); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978); JENNESS, (1980); IDF (1981); MIDDLETON & FITZ-GERALD (1981); QURESHI et alii (1981); DEVENDRA & McCLEROY (1982). Em relação à variável dependente, fosfatase alcalina, houve uma correlação positiva com a % de gordura e com o EST, explicada pelo modelo matemático da análise de regressão quadrática, onde se procurou quantificar a influência destas duas variáveis

sobre os níveis de fosfatase alcalina, registrando-se um efeito significativo ($P \leq 0,05$), dados estes em conformidade com os achados de LINDEN & GED (1976); ANIFANTAKIS & ROSAKIS (1983) e em desacordo com BURGWALD (1939); HAAB & SMITH (1956) que afirmam não haver relação entre estas variáveis e os níveis de fosfatase alcalina no leite cru.

5.3. Acidez no leite de cabra e vaca

Os valores médios de acidez foram comparados com os dados da literatura consultada e registrados no QUADRO I.

Pela análise de variância registrou-se uma significância estatística da acidez ($P \leq 0,05$) entre as amostras de leite de diferentes produtores (A, B, C e D). Pelo teste de Tukey, verificou-se que a acidez no leite dos produtores A ($16,75^{\circ}\text{D}$) e D ($16,86^{\circ}\text{D}$) foi significativamente menor que do produtor B ($18,12^{\circ}\text{D}$). Na literatura consultada o que se observa são valores de acidez mais próximos dos encontrados para o produtor B ($18,12^{\circ}\text{D}$); C ($17,19^{\circ}\text{D}$) e D ($16,86^{\circ}\text{D}$) do que para o produtor A ($16,75^{\circ}\text{D}$); FURTADO (1978); FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1978); WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO (1978). Porém, FURTADO (1978) afirma que a acidez no leite caprino (15°D) é inferior à do leite bovino (17°D) devido à diferença entre os grupos carboxílicos das proteínas dos dois tipos de leite; também a acidez sofre grande variação por ser muito influenciada pela ação da temperatura, condições de transporte, higiene de ordenha, entre outros fatores, o que se confirmou nas amostras de leite pesquisado.

5.4. Análises microbiológicas

As análises estatísticas, para a contagem global de microrganismo e contagem de coliformes, indicaram que os tratamentos térmicos empregados foram altamente eficientes para reduzir a flora microbiana das amostras em estudo. Estes dados estão de acordo com os achados de SÁ (1978); BUSHNELL (1980);

VEISSEYRE (1980).

As amostras tratadas termicamente ($59^{\circ}\text{C}/30'$; $63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$ e $65^{\circ}\text{C}/30'$) apresentaram médias para a contagem global de microrganismos de 3,25; 3,06; 2,75 e 2,39 UFC/ml, respectivamente, e não houve crescimento de coliformes em nenhuma destas amostras, resultado este similar ao encontrado na Austrália, por BUSHNELL (1980). Independente da temperatura e tempo de tratamento os resultados foram similares entre si e estatisticamente diferentes das amostras de leite cru, cuja contagem global de microrganismos foi de 6,31 UFC/ml e de coliformes foi de 3,58 UFC/ml, dados em conformidade com os achados de BUSHNELL (1980); PARK & HUMPHREY (1984).

5.5. Reativação da fosfatase alcalina

A reativação da fosfatase alcalina reportada pelos pesquisadores BURGWALD (1939); BARBER & FRAZIER (1943); FRAM (1957); CAMPBELL & McFARREN (1961); SHARMA & GANGULI (1974); VEISSEYRE (1980); LINDEN (1982) foi confirmada nos resultados encontrados nesta pesquisa, que ainda estimou a quantidade (μg de fenol liberado) em função dos tempos de estocagem (24 e 72 horas), à temperatura de 5°C . LINDEN (1982) observou uma ligeira reativação registrada quando se estocava o leite à baixa temperatura (4°C), por períodos prolongados.

Pela evidência das publicações revisadas WRIGHT & TRAMER (1956); RICHARDSON et alii (1964); KRESHECK & HARPER (1966); SHARMA & GANGULI (1974); MURTHY et alii (1976); LINDEN (1982) há exigências específicas de pH, minerais, tempo, temperatura, concentração de gordura, microrganismos, entre outras, para a reativação da fosfatase alcalina, porém, no presente trabalho estes fatores não foram objeto de estudo.

Sugere-se, para melhor avaliação da reativação da fosfatase alcalina em leite caprino, que seja aumentado o período de estocagem.

6. CONCLUSÕES

Com base nos achados desta pesquisa, as seguintes conclusões foram obtidas:

- o teste da fosfatase alcalina, segundo os parâmetros de leite bovino, não é adequado para avaliar a eficiência da pasteurização no leite de cabra;

- a média da fosfatase alcalina (μg de fenol) no leite cru de cabra é inferior à do leite de vaca, nas mesmas condições:

- houve uma inativação proporcional da fosfatase alcalina inicial nas amostras de leite caprino e bovino, tratadas termicamente;

- as amostras tratadas a $59^{\circ}\text{C}/30'$ apresentaram níveis diferentes de inativação da fosfatase alcalina dos encontrados nos tratamentos $63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$ e $65^{\circ}\text{C}/30'$;

- as amostras tratadas a $59^{\circ}\text{C}/30'$ obtiveram valores médios de fosfatase alcalina para leite de cabra e de vaca de, respectivamente, 1,69; 1,61; 1,88 e 8,47 μg fenol/ml;

- o leite de cabra tratado a $59^{\circ}\text{C}/30'$ apresentou valores (1,69; 1,61; 1,88 μg fenol/ml) inferiores aos determinados para o leite corretamente pasteurizado, segundo os padrões estabelecidos pelas normas internacionais, para o controle da pasteurização do leite, pela técnica da inativação térmica da fosfatase alcalina;

- o leite de cabra tratado termicamente ($63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$; $65^{\circ}\text{C}/30'$) apresentou valores inferiores a $1\mu\text{g}$ de fenol liberado por mililitro;

- houve uma correlação ente a % de gordura e o EST, em relação à fosfatase alcalina, porém, não foi observada a mesma correlação com a acidez;

- todos os tratamentos térmicos empregados ($59^{\circ}\text{C}/30'$; $63^{\circ}\text{C}/30'$; $65^{\circ}\text{C}/15'$; $65^{\circ}\text{C}/30'$) foram altamente eficientes para reduzir a flora microbiana das amostras estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMYAN, E.G. & BUNIATYAN, L.O. Changes in activities of alkaline and acid phosphatases in milk of cows with experimental mastitis. Biol. Zh. Arm. URSS, 21(9):103-6, 1968 apud Dairy Sci. Abst., Farnham Royal, 32(5):315, 1970.
2. AMIRA, H.; MOHAMED, M.I., DESSOUKY, M.; ABDEL-GHANI; BAKEER, A.M. Contributors of alkaline phosphatase in milk of mastitic goats. Egypt. J. Dairy Sci., Egypt, 9:105-12, 1981.
3. ANIFANTAKIS, E.M. & ROSAKIS, P.S. Alkaline phosphatase activity of sheep's milk and some factors affecting it. Egypt. J. Dairy Sci., Egypt, 11:173-82, 1983.
4. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, Rio de Janeiro, v.45, 1984. 1104p.
5. ATHERTON, H.V. Goat milk task force. Dairy Food Sanit., Ames, 3(12):472-6, 1983.
6. ATHERTON, H.V. Regulation of goat milk production and processing. Dairy Food Sanit., Ames, 4(4):128-30, 1984.
7. BARBER, F.W. & FRAZIER, W.C. The development of a positive phosphatase test in refrigerated, pasteurized cream. J. Dairy Sci., Champaign, 26(4):343-52, 1943.
8. BIANCO, L.J.; MANNING, P.B.; MYKLEBY, R.W.; ROTH, W.; BURKE J.A. Dialysis phosphatase test. In: HAUSLER JR., W.J. ,

- ed. Standard methods for the examination of dairy products. 13 ed. Washington, A.P.H.A., 1972. p.308-13.
9. BOGIN, E. & ZIV, G. Enzymes and minerals in normal and mastitic milk. Cornell Vet., Ithaca, 63(4):666-75, 1973.
 10. BONASSI, I.A. Leite de cabra: característica e tecnologia. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, 42(251):17-21, 1987.
 11. BRASIL. Leis, decretos, etc. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, Ministério da Agricultura, 1980. 166p.
 12. BURGWALD, L.H. The phosphatase test. A review of the literature on its application for detecting irregularities in the pasteurization of milk and dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 22(10):853-73, 1939.
 13. BUSHNELL, A.C. A further note on goats milk. J. Assoc. Public Analysis, Preston, 18(4):141-4, 1980.
 14. CAMPBELL, J.E. & McFARREN, E.F. Collaborative study of a differential test for reactivated and residual phosphatase in dairy products. J. Assoc. Off. Agric. Chem., Washington, 44(3):444-8, 1961.
 15. DEVENDRA, C. & McCLEROY, G.B. Goat and sheep production in the tropics. London, Longman, 1982. 264p.
 16. FRAM, H. Phosphatase reactivation in high-temperature, short time pasteurized cream. J. Dairy Sci., Champaign, 40(12):1649, 1957.
 17. FRAM, H. The reactivation of phosphatase H.T.S.T. pasteurized dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 40(1):19-27, 1957.
 18. FUQUAY, J.W.; ZOOK, A.B.; POE, W.E.; BROWN, W.H.; CUSTER, E.W. Metabolic and physiologic response of dairy cattle to coliform mastitis. J. Dairy Sci., Champaign, 58(5):751-2, 1975.

19. FURTADO, M.M. Desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de queijos de cabra no Brasil. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, 33(197):3-19, 1978.
20. FURTADO, M.M. & WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Leite de cabra: composição e industrialização. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, 33(198):15-7, 1978.
21. GRAPPIN, R.; JEUNET, R.; PILLET, R.; LETOQUIN, A., Etude des laits de chèvre. I. Teneur du lait de chèvre en matière grasse, matière azotée et fractions azotées. Lait Paris, 61(603/604):117-33, 1981.
22. HAAB, W. & SMITH, L.M. Variation in alkaline phosphatase activity of milk. J. Dairy Sci., Champaign, 39(2):1644-50, 1956.
23. HAMMER, B.W. & OLSON, H.C. Phosphatase production in dairy products by micro-organisms. J. Milk Technol., Ames, 4(2):83-5, 1941.
24. HETRICK, J.H. & TRACY, P.H. Effect of high-temperature short-time heat treatments on some properties of milk. I. Inactivation of the phosphatase enzyme. J. Dairy Sci. Champaign, 31(10):867-79, 1948.
25. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The composition of ewe's and goats milk. Brussels, 1981 (Document, 140).
26. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of fat content butyrometers. Brussels, 1981. (Provisional Standard, 105).
27. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total solids content of milk. Brussels, 1962. (International Standard, 21).
28. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Dried milk and dried whey : count of coliforms. (Reference method). Brussels, 1971. (International Standard, 64).
29. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Method for enumeration of

- micro-organisms in liquid milk. Colony count technique at 30°C. Brussels, 1958 (Draft Standard, 3A).
30. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk powder, buttermilk powder, whey and whey powder: determination of phosphatase activity (Reference method). Brussels, 1971. (International Standard, 63).
 31. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk powder, buttermilk and buttermilk powder, whey and powder: determination of phosphatase activity (Routine method). Brussels, 1978. (Provisional Standard, 82).
 32. JENNESS, R. Composition and characteristic of goat milk: review 1968-1979. J. Dairy Sci., Champaign, 63(10):1605-30, 1980.
 33. JENNESS, R. & SLOAN, R.E. The composition of milk of various species: a review. Dairy Sci. Abst., Farnham Royal, 32(10):599-612, 1970.
 34. KAY, H.D. & GRAHAM Jr., W.R. The phosphatase test for pasteurized milk. J. Dairy Res., London, 6(3):191-203, 1935.
 35. KAY, H.D. & GRAHAM, Jr., W.R. Phosphorus compounds of milk. J. Dairy Res., London, 5(1):63-74, 1933.
 36. KLEYN, D.H. & LIN, S.H.C. Collaborative study of a new alkaline phosphatase assay system for milk. J. Assoc. Off. Agric. Chem., Washington, 51(4):802-7, 1968.
 37. KLEYN, D.H. & YEN, W. Spectrophotometric determination of phosphatase activity in milk utilizing a new alkaline phosphatase assay system. J. Assoc. Off. Agric. Chem., Washington, 53(4):869-71, 1970.
 38. KOSIKOWSKI, F.V. Cheese and fermented milk foods. 3. ed. Ann Arbor, Edwards Brothers, 1970. 429p.
 39. KOSIKOWSKI, F.V. Dialysis phosphatase method for milk and all dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 47(7):748-53, 1964.

40. KOSIKOWSKI, F.V. The effectiveness of the Cornell phosphatase test for dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 34(12):11-51, 1951.
41. KOSIKOWSKI, F.V. Innovations and biological applications of the dialysis phosphatase test. Separata de INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 17. München, 1966. p.269-75.
42. KOSIKOWSKI, F.V. A simple universal dairy products phosphatase test. Science, Washington, 110(4):480-1, 1949.
43. KRESHECK, G.C. & HARPER, W.J. Factors affecting the reactivation of milk alkaline phosphatase. Separata de INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 17, München, 1966. p.278-82.
44. KUZUYA, Y.; KANAMARU, Y.; TANAHASHI, T. Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from goat milk. Jpn. J. Zootech. Sci., Gifu, 52(9):659-64, 1981.
45. LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERÊNCIA ANIMAL. Brasília. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, 1981. 2v.
46. LINDEN, G. Biochemical study of some aspects of milk alkaline phosphatase reactivation. Milchwissenschaft, Munich, 34(6):329-32, 1979.
47. LINDEN, G. Propriétés biochimiques de la phosphatase alcaline du lait et problèmes liés à son épreuve en industrie laitière. Tech. Laitière, Nancy (970):15-9, 1982.
48. LINDEN, G. & GED. J. Activité polymorphisme et origine de la phosphatase alcaline dans le lait. Milchwissenschaft Munich, 31(12):724-8, 1976.
49. LINDEN, G. & PAQUET, D. Alkaline phosphatase activity in transparent milk and cream. J. Dairy Sci., Champaign, 64(4):568-71, 1981.
50. LOEWENSTEIN, M.; SPECK, S.J.; BARNHART, H.M.; FRANK, J.F. Research on goat milk products: a review. J. Dairy Sci. Champaign, 63(10):1631-48, 1980.

51. McFARREN, C.F.; BLACK, L.A.; CAMPBELL, J.E. Modified spectrophotometric phosphatase method. J. Milk Food Technol., Ames, 26(12):395-6, 1963.
52. McGUGAN, W.A. & HOWSAM, S.G. Alkaline phosphatase in cheddar cheese from raw and heat treated milk. J. Dairy Sci., Champaign, 47(2):139-46, 1964.
53. MIDDLETON, G. & FITZ-GERALD, C.H. Chemical analysis of goat's milk produced in South East Queensland. Aust. J. Dairy Technol., Victoria, 36(3):115-7, 1981.
54. MONGET, D. & LAVIOLETTE, P. Mise au point de microtests "phosphatase alcaline" et "peroxydase" pour le controle de la pasteurisation du lait de vache. Lait, Paris, 58(579/580):595-605, 1978.
55. MURTHY, G.K.; COX, S.; KAYLOR, L. Reactivation of alkaline phosphatase in ultra-high temperature, short-time processed liquid milk products. J. Dairy Sci., Champaign, 59(10):1699-710, 1976.
56. MURTHY, G.K.; NIELSEN, V.H.; WEIK, R.W. Phosphatase methods to determine pasteurization. In: HAUSLER Jr. W.J. ed. Standard methods for the examination of dairy products. 13. ed. Washington, A.P.H.A., 1972. p.200-18.
57. MURTHY, G.K. & PEELER, J.T. Method for predicting minimum detectable residual alkaline phosphatase in high-temperature, short-time processed dairy products. J. Food. Prot., Ames, 43(1):46-8, 1980.
58. QURESHI, H.A.; DESHPANDE, K.S.; BONDE, H.S. Studies on chemical composition of goat milk. Indian Vet. J., Parbhani, 58(3):212-4, 1981.
59. PARK, Y.W. & HUMPHREY, R.D. Bacterial cell counts of goat milk and their correlation between different type of cells. J. Dairy Sci., Champaign, 67(1):87, 1984 (Abstract).
60. PARKASH, S. & JENNESS, R. The composition and characteris

- tics of goats milk: a review. Dairy Sci. Abst., Farnham Royal, 30(2):67-87, 1968.
61. REMINGTON, R.D. & SCHORK, M.A. Statistics with applications to the biological and health sciences. New Jersey, Prentice-Hall, 1970. 418p.
 62. RICHARDSON, L.A.; McFARREN, E.F.; CAMPBELL, J.E. Phosphatase reactivation. J. Dairy Sci., Champaign, 47(2):205-10, 1964.
 63. ROGER, D.M. The practical application of the phosphatase test. J. Milk Technol., Ames, 2(1):21-5, 1939.
 64. ROSAKIS, P. & ANIFANTAKIS, E. Possibility of controlling sheep's and goat's milk by alkaline phosphatase test. Delt. Hell Kteniatr. Hetair., Athens, 33(2):146-51, 1982.
 65. SÃ, F.V. O leite e os seus produtos. 4. ed. Lisboa, Clásica, 1978. 390p.
 66. SANDERS, G.P. & SAGER, O.S. Heat inactivation of milk phosphatase in dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 31(10):845-57, 1948.
 67. SANDERS, G.P. & SAGER, O.S. Phosphatase test for various dairy products. J. Dairy Sci., Champaign, 30(12):909-20, 1947.
 68. SANDERS, G.P. & SAGER, O.S. Present status of the phosphatase test. J. Milk Food Technol., Ames, 11(2):67-75, 1948.
 69. SAWAYA, W.N.; SAFI, W.J.; AL-SHALHAT, A.F.; AL-MOHAMMAD, M. M. Chemical composition and nutritive value of goat milk. J. Dairy Sci., Champaign, 67(8):1655-9, 1984.
 70. SCHARER, H. A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. J. Dairy Sci., Champaign, 21(1):21-34, 1938.
 71. SHARMA, R.S. & GANGULI, N.C. Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from buffalo milk.

Milchwissenschaft, Munich, 29(2):79-84, 1974.

72. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 6.ed. Ames, Iowa State University, 1973. 593p.
73. VEISSEYRE, R. Lactologia técnica. 2.ed. Zaragoza, Acribia, 1980. 629p.
74. WILLIAMS, D.J. A modification to Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. Aust. J. Dairy Technol., Parkville, 41(1):28-30, 1986.
75. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & FURTADO M.M. Fabricação do queijo tipo Chabichou - algumas características físico-químicas do leite de cabra da Zona da Mata Mineira. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Juiz de Fora, 13(200):3-11, 1978.
76. WRIGHT, R.C. & TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. J. Dairy Res., London, 23(2):248-56, 1956.