

CRISTIANE ALVES

**EFEITO DE VARIAÇÕES SAZONAIS NA
QUALIDADE DO LEITE CRU
REFRIGERADO DE DUAS
PROPRIEDADES DE MINAS GERAIS**

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

Área de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Prof. Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte
EV-UFMG
2006

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida, é a prova que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

*Dedico este trabalho ao meu querido papai,
a memória de minha amada mamãe e
aos meus queridos irmãos: Branco, Nega, Cristina e Valdir.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todas as conquistas!

Ao Prof. Leorges pela oportunidade, confiança, apoio, amizade, ensinamentos e orientação.

Aos Professores do DTIPOA: Marcelo, Cláudia, Mônica Leite, Mônica Pinho e Prof. Ronon, pela disponibilidade, esclarecimentos técnicos e amizade.

Aos componentes da banca pela fundamental contribuição a este trabalho.

Aos Professores Afonso de Liguori e Denise Oliveira pelos ensinamentos, amizade e apoio técnico.

A Maura, Valéria e Evenilde pelo apoio e amizade.

A todo o setor de transportes da EV-UFMG e aos funcionários das fazendas da EV: José Antônio (Pedro Leopoldo), Ailton (Igarapé) e Renato (Igarapé) pela disponibilidade em ajudar.

Aos amigos Ricardo, Clarice, Cecília, Fátima e Roane pela disponibilidade e ajuda na parte experimental.

Aos colegas e amigos do mestrado: Clarice, Ricardo, Thiago, Líliam, Patrícia, Débora, Regina, Moisa, Liana, Andréia e Cristiana pela convivência e pelo intercâmbio de experiências.

As amigas Fernanda, Fá, Janu, Babi e Simoninha pelo carinho e atenção.

Ao Toninho, Bárbara e família pelo apoio, carinho e atenção.

Aos amigos da Academia Sport Fitness pelo carinho.

Aos colegas do IMA: Beatriz Leão, Paulo Rogério, José Antônio, Márcio Viegas, Robson Rocha, Dr. Sérgio Gomide e Dr Altino pela compreensão na reta final.

A CAPES pelo auxílio financeiro e a FAPEMIG pelo financiamento do material experimental.

Ao LabUFMG e toda a sua equipe, por tudo!!!

Mazon, Gebara, Souza, Leite, Penna, Salaberga e Viegas: a amizade, o apoio e o carinho de vocês foram fundamentais para que conseguisse conduzir este trabalho.

A todos que cruzaram meu caminho e acrescentaram algo à minha vida contribuindo para que meu sonho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A PRODUÇÃO E O PROCESSAMENTO DE LEITE NO BRASIL.....	14
2.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DO LEITE.....	15
2.2.1 LEGISLAÇÃO.....	15
2.2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.....	16
2.2.3 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE.....	17
2.2.3.1 pH e acidez.....	18
2.2.3.2 Minerais e Equilíbrio salino.....	18
2.2.3.3 Citrato.....	19
2.2.3.4 Uréia.....	20
2.2.3.5 Proteínas.....	21
2.2.3.6 Prova do Alizarol.....	22
2.2.3.7 Tempo e temperatura de processamento do leite.....	23
2.2.3.8 Mastite.....	24
2.2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	24
2.2.5 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	25
2.2.5.1 Microrganismos Mesófilos.....	26
2.2.5.2 Microrganismos Psicotróficos.....	26
2.2.5.3 Contagem Bacteriana do Leite.....	26
2.2.6 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 DADOS METEOROLÓGICOS.....	28
3.2 DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FAZENDAS.....	28
3.2.1 FAZENDA 1.....	28
3.2.2 FAZENDA 2.....	29
3.3 ORIGEM E PERÍODO DE AMOSTRAGEM.....	30
3.4 COLETA DE AMOSTRAS E ACONDICIONAMENTO.....	30
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	31
3.5.1 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	31
3.5.2 Acidez Titulável.....	31
3.5.3 Prova do Alizarol.....	31
3.5.4 Índice Crioscópico.....	32
3.5.5 Teor de Citrato.....	32
3.5.5.1 Método enzimático.....	32
3.5.5.1.1 Preparo das amostras para análises com Kit Boehringer Mannheim.....	32
3.5.5.2 Método piridina acética.....	32
3.5.6 Teor de Uréia.....	33
3.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	33
3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	33
3.8 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL.....	33
3.9 CONTAGEM PRADRÃO EM PLACAS.....	33
3.9.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos.....	33
3.9.2 Contagem de Microrganismos Psicotróficos.....	34
3.10 PESQUISA DE RESÍDUOS DE INIBIDORES.....	34
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

4.1 DADOS METEOROLÓGICOS.....	35
4.2 DADOS DE PRODUÇÃO DE LEITE E OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA NAS FAZENDAS AVALIADAS.....	35
4.2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NA FAZENDA 1.....	35
4.2.2 PRODUÇÃO DE LEITE NA FAZENDA 2.....	37
4.2.3 PRODUÇÃO DE LEITE POR ESTAÇÃO.....	38
4.2.4 OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA.....	39
4.2.5 OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA POR ESTAÇÃO.....	40
4.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU REFRIGERADO.....	41
4.3.1 pH E ACIDEZ.....	42
4.3.2 ÍNDICE CRIOSCÓPICO.....	42
4.3.3 PROVA DO ALIZAROL.....	42
4.3.4 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	45
4.3.4.1 VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DE ACORDO COM O NÚMERO DE ORDENHAS NO TANQUE.....	47
4.3.4.2 VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO POR FAZENDA.....	48
4.3.4.3 VARIAÇÕES DA COMPOSIÇÃO DE ACORDO COM A ESTAÇÃO.....	48
4.4 AVALIAÇÃO DAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	49
4.5 DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	51
4.5.1 COMPARAÇÃO ENTRE CBT E CONTAGENS MICROBIANAS POR MÉTODOS TRADICIONAIS.....	54
4.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS.....	54
4.7 CORRELAÇÕES.....	57
5. CONCLUSÕES.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intensidade de floculação apresentada pelo leite cru na prova do alizarol.....	32
Tabela 2. Médias por estação das temperaturas média, mínima média e máxima média, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, registradas na estação meteorológica SE-Barreiro da CEMIG, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	36
Tabela 3. Volume médio diário de leite produzido e produção média por animal na Fazenda 1, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	37
Tabela 4. Volume médio diário de leite produzido e produção média por animal na Fazenda 2, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	38
Tabela 5. Resultados médios das análises de pH, acidez titulável e índice crioscópico, de 41 amostras de leite cru, obtido em duas fazendas próximas a Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	42
Tabela 6. Ocorrência de floculação na prova do alizarol nas concentrações de 72, 75, 80, 85 e 90% em duas fazendas próximas a Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	43

Tabela 7. Dados médios obtidos nas análises de composição centesimal de 41 amostras de leite cru refrigerado obtido em tanques de expansão, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	45
Tabela 8. Teores médios de gordura, sólidos totais e CCS de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	47
Tabela 9. Teores médios de proteína, SNG e citrato do leite cru obtido em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	48
Tabela 10. Teores médios de gordura, sólidos totais, lactose, citrato e uréia de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005, de acordo com a estação do ano.....	49
Tabela 11. Contagem de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	50
Tabela 12. Contagem de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	50
Tabela 13. Dados médios das análises microbiológicas de 41 amostras de leite cru refrigerado obtido em duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	52
Tabela 14. Limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos no leite estabelecidos pela legislação brasileira e limites de detecção dos kits utilizados neste experimento (partes por bilhão - ppb).....	55
Tabela 15. Resultados positivos nos testes de resíduos de inibidores, utilizando-se os kits Copan e Delvotest, em 41 amostras de leite cru provenientes de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Industrialização do Leite no Brasil em 2002 (mercado formal – 2002).....	14
Figura 2. Médias mensais das temperaturas média, mínima média e máxima média e umidade relativa do ar registradas na estação meteorológica do Barreiro-Belo Horizonte.....	36
Figura 3. Médias mensais da precipitação pluviométrica registradas na estação meteorológica SE-Barreiro da CEMIG no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	37
Figura 4. Produção média de leite por animal/dia de acordo com a estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	38

Figura 5. Produção média de leite por animal/dia por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	39
Figura 6. Dados médios da ocorrência mensal de mastite clínica, nos rebanhos em lactação das fazendas 1 e 2 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	40
Figura 7. Dados médios da ocorrência de mastite clínica, por estação, nos rebanhos em lactação das fazendas 1 e 2, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	40
Figura 8. Dados médios da ocorrência de mastite clínica, por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	41
Figura 9. Frequência de floculação na prova do alizarol nas concentrações de 72, 75, 80, 85 e 90% por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	44
Figura 10. Frequência da intensidade de floculação medida em escore 1, 2 e 3, referente à prova do alizarol nas concentrações de álcool a 72, 75, 80, 85 e 90%, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	45
Figura 11. Variação média mensal das contagens de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	48
Figura 12. Médias geométricas das contagens de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e CBT do leite cru refrigerado, em UFC/mL, obtido em duas fazendas, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	53
Figura 13. Distribuição por estação das contagens médias de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em duas fazendas no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	54
Figura 14. Frequência da detecção de resíduos de inibidores microbianos, distribuída por estação, em 41 amostras de leite cru provenientes de duas fazendas, utilizando-se os testes Copan® e Delvotest®, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Requisitos estabelecidos para leite cru, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado.....	16
Quadro 2. Concentração e distribuição entre as fases solúvel e coloidal dos principais sais do leite.....	17
Quadro 3. Variações na composição do leite individual em função da floculação à prova do álcool.....	23
Quadro 4. Dietas fornecidas aos animais na fazenda 1 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	29
Quadro 5. Dietas fornecidas aos animais na fazenda 2 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.....	29

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar influências sazonais na qualidade do leite cru refrigerado, por meio das análises de composição centesimal, índice crioscópico, pH, acidez titulável, CCS, contagem bacteriana, pesquisa de inibidores microbianos e estabilidade à prova do alizarol. De outubro/2004 a setembro/2005 foram coletadas 41 amostras de leite cru refrigerado em duas fazendas na região Metropolitana de Belo Horizonte. As médias aritméticas obtidas foram: pH (6,75), acidez titulável (14,84°D), IC (-0,536°H), gordura (3,68 g/100g), proteína (3,04 g/100g), lactose (4,42 g/100g), ST (12,08 g/100g), SNG (8,4 g/100g), citrato (165 mg/100mL), uréia (14,53 mg/100mL), CCS (285.000 cél./mL), CBT (179.000 UFC/mL), contagem de mesófilos (544.000 UFC/mL) e de psicotróficos (446.000 UFC/mL). Médias geométricas: CCS (262.000 cél./mL), CBT (36.000 UFC/mL), mesófilos (49.000 UFC/mL) e psicotróficos (13.000 UFC/mL). Houve diferença significativa entre as duas fazendas com relação aos teores de proteína, SNG, citrato, CCS, CBT, mesófilos e psicotróficos. Na comparação de médias por estação os teores de gordura e ST foram mais elevados no inverno (3,92 e 12,38 g/100g) e menores na primavera (3,31 e 11,78 g/100g). Menores CCS e maior teores de citrato, nas estações inverno e primavera, foram relacionados ao aumento na estabilidade à floculação na prova do alizarol. Menores CBT ocorreram no inverno. A presença de resíduos de inibidores no leite ocorreu na primavera e verão.

Palavras-chave: leite cru, qualidade do leite, variações sazonais, estabilidade térmica

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the seasonal influence over the milk quality, based on composition, somatic cell counting (SCC), bacterial counting, detection of microbial inhibitors, and stability to alcohol-alizarol of the raw milk. From October 2004 to September 2005, 41 samples of raw refrigerated milk were collected from two farms. The arithmetic means were: pH (6.75), titratable acidity (14.84°D), freezing point (-0.536°H), fat (3.68 g/100g), protein (3.04 g/100g), lactose (4.42 g/100g), total solids (12.08 g/100g), solids non-fat (8.4 g/100g), citrate (165 mg/100mL), urea (14.53 mg/100mL), SCC (285,000 cells/mL), total bacterial counting (TBC) (179,000 CFU/mL), mesophilic bacteria count (MBC) (544,000 CFU/mL) and psychrotrophic bacteria count (PBC) (446,000 CFU/mL). The geometric means were: SCC (262,000 cells/mL), TBC (36,000 CFU/mL), MBC (49,000 CFU/mL) and PBC (13,000 CFU/mL). Seasonal results for fat and TS were highest during winter (3.92 and 12.38 g/100g) and lowest during spring (3.31 and 11.78 g/100g). SCC was lower and citrate levels were higher during winter and spring, and this fact was related to the increase of milk stability to the alcohol-alizarol test. Lower TBC was observed during winter. Microbial inhibitors were detected on milk collected on spring and summer.

Keywords: bulk milk, milk quality, seasonal variation, milk stability.

1. INTRODUÇÃO

A composição e a qualidade microbiológica do leite são dois itens de grande importância para bons resultados econômicos, tanto nas propriedades leiteiras quanto nas indústrias de laticínios. A inserção do setor produtivo brasileiro de leite e derivados na economia internacional globalizada tem levado à necessidade de modernização e de aumento de competitividade por parte do setor. Neste sentido, a qualidade higiênico-sanitária do leite cru assume importância primordial neste processo de modernização (Souza et al., 1999). Visando contribuir neste processo, foi proposto um programa de melhoria da qualidade do leite que tem como suporte padrões e normas estabelecidas e publicadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na forma da Instrução Normativa número 51, de 18 de setembro de 2002.

A melhoria da qualidade do leite no Brasil tem sido impulsionada pela crescente demanda por produtos de melhor qualidade pelos estabelecimentos de laticínios e, principalmente, pelos consumidores. Isto resulta na necessidade de implantação de medidas que visem o aumento na qualidade da matéria-prima. Para que o produto final apresente qualidade é necessário que se tenha um leite cru com boas características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas e que seja livre de resíduos de antimicrobianos. Parâmetros da qualidade do leite são cada vez mais usados para detectar problemas com as práticas de produção e para determinar o valor do leite. Países que desejam competir no mercado internacional de produtos lácteos devem garantir a qualidade dos produtos que estão sendo vendidos para conquistar e manter mercados. A mesma qualidade deverá ser garantida também nos produtos destinados ao mercado interno (Godkin, 2000). As atuais mudanças na legislação e na forma de pagamento visam priorizar esta qualidade.

Na indústria de laticínios, o leite cru é submetido aos mais diversos tipos de tratamentos térmicos, visando não somente a tecnologia do produto derivado, mas também proporcionar segurança aos seus consumidores. A ocorrência de leite com instabilidade protéica, diagnosticada pela prova do álcool, é um problema atualmente encontrado em várias regiões do Brasil. Esta situação tem sido encontrada mesmo em leite com acidez normal ou proveniente de animais sadios. Esta instabilidade resulta em matéria-prima com características inadequadas para a produção de derivados lácteos, representando prejuízos para todo o setor.

A estabilidade térmica reduzida gera transtornos, podendo resultar na coagulação do mesmo durante o processamento do leite, além de prejuízos econômicos consideráveis devido ao descarte. Desta forma, é importante para a indústria de laticínios selecionar leite com elevada estabilidade térmica quando o destino da matéria-prima for a elaboração de produtos que serão submetidos a tratamentos térmicos intensos ou com vida de prateleira longa, tais quais leite em pó e leite UHT. Este último, segundo dados da Associação Brasileira de Leite Longa Vida, representa 75% do mercado de leite fluido no Brasil. Ressalta-se ainda a importância da segurança e satisfação dos consumidores.

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado proveniente de duas propriedades no Estado de Minas Gerais.

Os objetivos específicos foram verificar as variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado por meio dos parâmetros de composição centesimal, contagem bacteriana, contagem de células somáticas, pesquisa de resíduos de inibidores

microbianos e estabilidade térmica. A prova do alizarol foi utilizada como forma indireta de estimar a estabilidade térmica do leite cru.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PRODUÇÃO E O PROCESSAMENTO DE LEITE NO BRASIL

O setor laticinista no Brasil apresenta elevados índices de expansão, quando comparado a outros setores, exercendo papel fundamental na economia do país. Segundo dados da EMBRAPA Gado de Leite, no ano de 2004, o Brasil foi o 6º maior produtor mundial de leite, respondendo por 4,5% da produção global. A produção nacional em 2004 foi de 22,6 bilhões de litros de leite, sendo que somente 13,8 bilhões de litros foram recebidos em estabelecimentos sob inspeção. Ou seja, 39% do leite produzido no Brasil ainda continuam no mercado informal (Estatísticas..., 2005).

No ano de 2002, do total de leite fluido industrializado no Brasil, referente ao

mercado formal, 33% foram destinados à produção de queijos, 19,3%, à produção de leite longa vida (UHT), 16,4%, à produção de leite em pó, 9,5% foram comercializados como leite cru, 6,8%, como leite pasteurizado e os demais produtos lácteos, como os leites fermentados, manteiga, dentre outros, representaram 15% do total (Fig. 1). Alguns produtos como o leite UHT, o leite em pó e o leite evaporado, por serem submetidos a processamento em temperaturas elevadas, requerem como matéria-prima o leite cru com elevada estabilidade térmica. A soma da produção do leite UHT e do leite em pó resulta num total de 35,7% do mercado de leite fluido no Brasil (Fig. 1), justificando, portanto, a preocupação com a qualidade e a estabilidade do leite cru destinado à produção destes (Estatísticas..., 2005).

Minas Gerais destaca-se no cenário nacional como o estado brasileiro que mais produz leite, com produção de 6,32 bilhões de litros por ano e respondendo por 30% do total da produção nacional de leite fluido e 50% da produção de queijos (Estatísticas..., 2005).

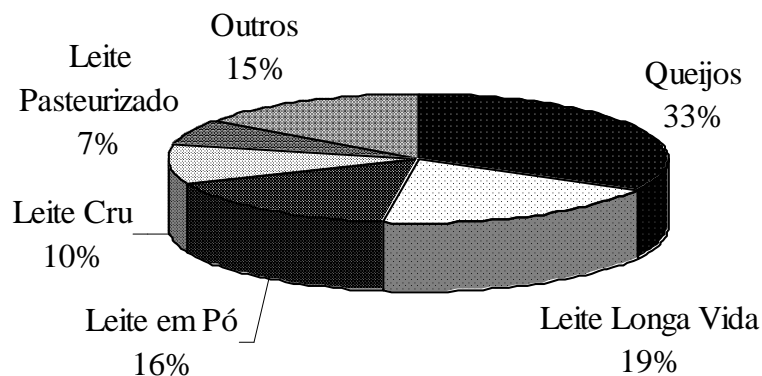


Figura 1. Industrialização do Leite no Brasil em 2002 (mercado formal – 2002).

Fonte: Embrapa Gado de Leite (2005)

2.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DO LEITE

Os parâmetros de qualidade do leite são cada vez mais usados para detectarem falhas nas práticas de manejo e de obtenção do leite, servindo como referência na valorização da matéria-prima. Os principais parâmetros utilizados pela maioria dos programas de qualidade do leite estão fundamentados nos conteúdos de gordura e proteína, nas contagens de células somáticas (CCS) e bacteriana total (CBT), na adulteração por água, resíduos de antibióticos, qualidade sensorial e temperatura da matéria prima (Monardes, 1998).

A qualidade da composição é determinada pelos teores de proteínas, gordura, lactose, minerais e vitaminas. Adicionalmente, esta qualidade é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal, além do

período de lactação e escore corporal de cada animal (Brito e Dias, 1998).

O leite de alta qualidade pode ser caracterizado como um alimento livre de agentes patogênicos e outros contaminantes como resíduos de antibióticos e pesticidas. Além disto, deve apresentar contaminação microbiana reduzida, sabor agradável, adequada composição físico-química e baixa contagem de células somáticas (Santos, 2004).

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que alguns cuidados sejam tomados na fonte de produção. A qualidade deve ser vista como um somatório de esforços que inclui melhoramento genético, bom manejo nutricional, controle sanitário, práticas higiênicas de ordenha, resfriamento do leite, nas propriedades, em baixas temperaturas e transporte rápido e em

condições apropriadas até as indústrias (Cerqueira et al., 1999b).

2.2.1 LEGISLAÇÃO

Visando a melhoria da qualidade do leite no Brasil, em 2002, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa nº51 (Brasil, 2002), que estabeleceu padrões e normas para a produção de leite no país. A criação destes regulamentos tem sido fator primordial para a produção de leite de melhor qualidade. Qualidade esta, essencial para a manutenção e crescimento do setor laticinista.

O armazenamento e o transporte sob refrigeração até a indústria propiciaram redução significativa do problema de proliferação de microrganismos mesófilos, responsáveis pelo aumento da acidez, contribuindo para a manutenção da

qualidade microbiológica inicial do leite cru.

Os limites de alguns parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de qualidade do leite cru que foram estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado são descritos no Quadro 1, de acordo com Brasil (2002). Estes parâmetros serão aceitos na Região Sudeste até 01/07/2008. No período que compreende 01/07/2008 a 01/07/2011, nesta Região, os parâmetros de contagem padrão em placas e contagem de células somáticas exigidos serão respectivamente, máximo de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e máximo de $7,5 \times 10^5$ células/mL. A partir de 01/07/2011, na Região Sudeste estes parâmetros serão: máximo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL (leite individual) $3,0 \times 10^5$ UFC/mL (leite de conjunto) para contagem bacteriana total e máximo de $4,0 \times 10^5$ células/mL para contagem de células somáticas.

Quadro 1. Requisitos estabelecidos para leite cru, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado.

REQUISITOS	LIMITES
Gordura (g/100g)	mín. 3,0
Proteína (g/100g)	mín. 2,9
Sólidos Não Gordurosos (g/100g)	mín. 8,4
Acidez titulável (°Dornic)	14 a 18
Índice Crioscópico (°Hortvet)	máx. - 0,530
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL) até 01/07/2008	máx. 1×10^6
Contagem de Células Somáticas (células/mL) até 01/07/2008	máx. 1×10^6
Temperatura de conservação do leite na propriedade/tanque (°Celsius)	máx. 7
Pesquisa de resíduos de antibióticos	PNCR IN42 1999

PNCR IN 42: Programa Nacional de Controle de Resíduos, Instrução Normativa nº42

máx.= máximo, mín.=mínimo

Fonte: Adaptado de Brasil (2002)

2.2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável, de gordura, proteínas, carboidratos e outros componentes. Os glóbulos de gordura e as vitaminas lipossolúveis encontram-se

em forma de emulsão, enquanto a lactose, as proteínas do soro, os minerais, as vitaminas hidrossolúveis e as substâncias nitrogenadas não-protéicas encontram-se dissolvidas na água do leite, formando uma solução. As proteínas, em forma de micelas de caseínas, apresentam-se em dispersão coloidal

(Walstra e Jenness, 1984; Singh et al., 1997).

A composição química do leite individual ou de conjunto varia devido a fatores associados com o estágio de lactação, raça, alimentação, frequência de ordenha, idade da vaca, saúde, estação do ano e clima (McCrae e Muir, 1995). Fonseca (2005) analisou 53.598 amostras de leite cru refrigerado no estado de Minas Gerais e encontrou teores médios de gordura de 3,63g/100g, proteína 3,19g/100g, lactose 4,51g/100g, sólidos totais 12,32g/100g e sólidos não gordurosos de 8,69g/100g.

A gordura do leite se encontra principalmente na forma de triacilglicerol (98%), molécula constituída por três moléculas de ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol. Na síntese dos ácidos graxos, a fonte imediata de carbono é o acetil CoA. Este é formado no rúmen, principalmente a partir dos ácidos graxos voláteis acetato e butirato, que são produtos da fermentação ruminal de carboidratos (Swaisgood, 1996; Block, 2000; Reis et al., 2004). A gordura é o componente do leite cujo teor sofre maiores variações, influenciadas pela época do ano, região geográfica, raça, nutrição e manejo geral (Walstra e Jenness, 1984). O teor de gordura é um dos itens avaliados em programas de pagamento por qualidade.

O leite normal é constituído basicamente por dois tipos de proteínas, as caseínas que representam 80% da proteína total e as proteínas solúveis. O estágio de lactação é fator determinante na proporção relativa entre caseínas e proteínas do soro. Nos primeiros dias pós-parto e no final do período de lactação a concentração das proteínas do soro é proporcionalmente maior. Outro fator importante é o manejo nutricional. As fontes de energia da dieta associadas ao suprimento protéico determinam a síntese das proteínas do leite. O teor de proteína do leite é um dos fatores

que tem sido utilizado nos programas de pagamento por qualidade, por ser determinante no rendimento industrial. A inclusão deste item nestes programas só foi possível devido à determinação analítica em equipamentos eletrônicos com alta capacidade a um baixo custo (Swaisgood, 1996; Brito e Dias, 1998; Block, 2000).

A lactose é o principal carboidrato do leite, sendo um de seus componentes mais constantes. Juntamente com os sais minerais, está relacionada à manutenção da osmolaridade da glândula mamária, e ao processo de produção e secreção do leite. É determinante no volume de leite produzido, por regular a entrada de água no lúmen alveolar (Walstra e Jenness, 1984; Harding, 1995). O ácido propiônico é um dos principais produtos da fermentação ruminal de carboidratos não estruturais como o amido e açúcares simples. Este produto, através do processo de gliconeogênese no fígado, é convertido em glicose, um dos precursores da lactose. Desta forma, a proporção de ácido propiônico formada no rúmen e convertida em glicose no fígado é determinante na produção diária de leite (Wattiaux, 1998; Mühlbach, 2003).

Os minerais e as vitaminas constituem em torno de 0,9% dos sólidos do leite (Harding, 1995). Apesar dos minerais representarem pequeno percentual na composição total do leite, eles exercem papel fundamental, principalmente com relação ao tamponamento e à estabilidade térmica do mesmo (Swaisgood, 1996). Os minerais considerados de maior importância são os bicarbonatos, os cloretos e os citratos de cálcio, magnésio, potássio e sódio. O sódio, potássio e cloro apresentam-se, em sua totalidade, sob a forma de íons livres. O cálcio, magnésio, fosfato inorgânico e o citrato encontram-se nas fases solúvel e coloidal, sendo que esta distribuição entre as fases (Quadro 2) e suas interações com as proteínas do leite exercem grande influência sobre a estabilidade térmica do leite e seus

derivados (Walstra e Jenness, 1984; Varnam e Sutherland, 1994; Swaisgood, 1996).

Quadro 2. Concentração e distribuição entre as fases solúvel e coloidal dos principais sais do leite.

Componente	Concentração média (mg/100mL)	Faixa de Variação (mg/100mL)	Solúvel (%)	Coloidal (%)
Sódio	60	48-79	96	4
Potássio	144	116-176	94	6
Cloreto	108	92-131	100	0
Cálcio total	121	114-124	33	67
Íon cálcio (Cálcio ionizado)	8	6-16	100	0
Magnésio	12,5	11,7-13,4	64	36
Citrato	181	171-198	94	6
Fósforo Inorgânico	65	53-72	55	45

Fonte: Swaisgood (1996)

2.2.3 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE

A estabilidade térmica do leite reflete a sua capacidade de não flocular quando submetido ao aquecimento. Esta representa fator crucial no processamento térmico do leite por permitir que temperaturas elevadas sejam atingidas sem maiores prejuízos às características físico-químicas, nutricionais e sensoriais do produto, além de ser fator determinante na vida de prateleira dos produtos lácteos.

Os principais fatores que podem levar a alterações importantes na estabilidade térmica do leite podem ocorrer devido a pequenas variações no pH, conteúdo de minerais, equilíbrio salino, lactose, nitrogênio-não-protéico (uréia) e proteínas (McCrae e Muir, 1995). Outros fatores podem influenciar a estabilidade térmica do leite como, por exemplo, o binômio tempo/temperatura aplicado, o estágio de lactação, alimentação e ocorrência de mastite nos rebanhos (Silva e Almeida, 1998).

2.2.3.1 pH e acidez

O pH é a medida da concentração de íons hidrogênio (H^+) da amostra (Brasil, 2003). Esta medida normalmente pode variar de 6,6

a 6,8 no leite. O leite é um fluido que apresenta elevada capacidade tamponante, especialmente na faixa de pH entre cinco e seis, devido à presença de dióxido de carbono, proteínas, fosfato, citrato e lactato (Santos, 2004).

A redução do pH do leite pode ocorrer por acidificação ou concentração ou adição de sais solúveis, contribuindo para a redução da estabilidade térmica do mesmo (Silva e Almeida, 1998). O processo de acidificação desloca parte do fosfato de cálcio coloidal $3Ca^{+2} + 2HPO_4^{-2} \longrightarrow Ca_3(PO_4)_2 + 2H^+$ para a fração solúvel, ou seja, leva à remoção de fosfato de cálcio das caseínas. Esta remoção será tanto maior quanto menor for o pH do meio (Ernstram e Anis, 1985).

A acidez adquirida é atribuída ao aumento da concentração de ácido láctico resultante da fermentação da lactose por microrganismos acidificantes. A acidez natural ocorre devido à presença de citratos, fosfatos, proteínas e outros componentes ácidos menores. Desta forma, a acidez titulável é uma medida da presença de ácido láctico (acidez adquirida), e também da acidez natural do leite (Santos, 2004). A acidez titulável consiste na medida da neutralização das moléculas ácidas do leite, utilizando-se solução alcalina para titulação. O leite dentro dos padrões de normalidade deve apresentar acidez titulável de 0,14 a 0,18g de ácido láctico por 100mL

(Brasil, 2002). Valores elevados da acidez do leite podem indicar elevadas contaminações microbiológicas, tornando, muitas vezes, a matéria-prima inadequada para o processamento.

O tratamento térmico induz a ocorrência de alterações no pH, podendo levar a coagulação ácida induzida pelo calor (Fox, 1981). De acordo com Pyne e McHenry (1955), existem três reações que podem levar a este tipo de acidez, sendo que estas contribuem com 50%, 30% e 20% da acidez formada durante o aquecimento, respectivamente:

- a) decomposição térmica da lactose com a formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido fórmico;
- b) hidrólise do fosfato orgânico (das fosfoserinas, das caseínas) seguida pela precipitação do fosfato liberado como fosfato tricálcico (com a liberação de íons H^+);
- c) precipitação, induzida pelo calor, dos fosfatos de cálcio primário e secundário como fosfato de cálcio terciário com a liberação simultânea de íons H^+ .

2.2.3.2 Minerais e Equilíbrio salino

Os sais podem estar em solução verdadeira (dissolvidos em meio aquoso), solução coloidal (associados às proteínas) ou ligados a proteínas, e os diferentes tipos de íons estão em equilíbrio com as moléculas não dissociadas. O conteúdo de sais depende da raça, fase de lactação, alimentação e estado de saúde dos animais. Os processos infecciosos que afetam o úbere produzem alterações evidentes no conteúdo de sais do leite (Spreer, 1991).

Os sais são os responsáveis pelo estado físico-químico do soro, que por sua vez influenciam muito na conformação e estabilidade das proteínas (Walstra e Jenness, 1984). O balanço de sais é de

grande importância para a estabilidade térmica do leite. O efeito do cálcio e do magnésio é oposto ao dos fosfatos e citratos, e o excesso de qualquer um deles pode levar a redução na estabilidade térmica do leite (Sommer e Hart, 1922).

A extensiva dissolução do fosfato de cálcio coloidal, ou a passagem do estado coloidal para o solúvel, que ocorre com o abaixamento do pH, poderia levar ao rompimento da estrutura micelar da caseína nativa, conduzindo à redução da estabilidade térmica do leite, devido ao aumento da atividade do cálcio (Rose, 1962). O cálcio distribui-se no leite em dois compartimentos, solúvel (iônico e ligado ao citrato e fosfato) e coloidal (ligado às proteínas) (Santos, 2004). Segundo Horne e Parker (1981), na faixa de pH normal do leite, as micelas de caseína apresentam cargas negativas, que são parcialmente neutralizadas pelo cálcio ligado à proteína. Quando há aumento do nível de cálcio solúvel, aumenta-se o cálcio ligado e ocorre redução da carga negativa total das micelas, resultando em maior susceptibilidade à coagulação.

O tratamento térmico pode resultar em deslocamento de cálcio e fosfato solúveis para a fase coloidal (precipitação de fosfato tricálcico), redução da solubilidade das proteínas do soro e reações de hidrólise da lactose em ácidos orgânicos (Walstra e Jenness, 1984).

O equilíbrio salino influencia a estabilidade térmica do leite, destacando-se entre os seus componentes principais as concentrações de cálcio, fosfato e citrato. Devido ao importante papel do fosfato de cálcio na estabilidade das micelas de caseína, alterações no equilíbrio entre cálcio solúvel e coloidal afetam a estabilidade à prova do álcool (Santos, 2004). O leite pode flocular ao teste do álcool ou do alizarol, sem, no entanto, estar ácido, devido ao desequilíbrio salino. Segundo Fox (1991), o aquecimento

Formatados: Marcadores e numeração

do leite leva ao deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal, o que leva à precipitação do fosfato tricálcico por sua baixa solubilidade a altas temperaturas. A formação de fosfato de cálcio coloidal eleva a concentração de H_3O^+ na fase aquosa, diminuindo o pH e fazendo com que se tenha menor estabilidade ao álcool (Silva e Almeida, 1998).

2.2.3.3 Citrato

O citrato presente no leite é formado dentro das mitocôndrias das células secretoras do tecido mamário, pela junção de uma molécula de acetil CoA com uma molécula de oxalacetato. O acetil CoA usado na reação pode se originar de diversas fontes, dentre as quais as duas principais são a oxidação dos ácidos graxos ou triglicerídeos e a ativação do acetato. As concentrações de citrato no plasma são menores que as encontradas no tecido mamário, que por sua vez, são menores que as do leite. Nos ruminantes, a concentração de citrato no leite é aproximadamente 16 vezes maior que no citosol (Faulkner e Peaker, 1982).

O citrato constitui molécula intermediária na síntese de gordura dentro das células, através da clivagem enzimática pela citrato liase, sendo rapidamente removido do citosol devido à atuação desta enzima. Porém os ruminantes praticamente não possuem esta enzima, condição que implica em acúmulo de citrato nas células epiteliais da glândula mamária, determinando a presença do citrato em concentrações significativas no leite (Faulkner e Peaker, 1982).

Os teores normais de citrato no leite cru, de acordo com Jenness e Patton (1959), Walstra e Jenness (1984), e Fox (1991), é de 175mg/100mL. A concentração média de 181mg/100mL, com variação entre 171 e 198mg/100mL, é relatada por Swaisgood (1996). Silva (2004), em trabalho realizado nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, verificou os teores médios de

citrato em leite cru na estação seca de, respectivamente, 163, 160 e 193mg/100mL, e na estação chuvosa de, respectivamente, 157, 154 e 168mg/100mL.

A adição de citrato para aumentar a estabilidade térmica do leite é eficaz por propiciar maior equilíbrio entre as fases, já que reduz o fosfato de cálcio coloidal por meio da conversão em citrato solúvel não-ionizado. Fox (1991) esclarece ainda que o citrato seja uma substância que apresenta alta capacidade de se ligar ao cálcio, o que colabora com a redução dos íons cálcio livres.

A adição de citratos e fosfatos, até certo ponto, aumenta a estabilidade do leite pelo efeito seqüestrador sobre o cálcio iônico, como ocorre na adição de fosfatos ou citratos aos leites UHT e evaporado. Esta prática confere maior estabilidade térmica ao leite permitindo que este atinja elevadas temperaturas de processamento sem flocular. A legislação brasileira permite a adição de citrato ao leite fluido destinado ao tratamento UHT, em concentrações de até 100mg/100mL expressos como P_2O_5 (Brasil, 1997). Silva (2004) relata que as indústrias processadoras de leite UHT, de modo geral, buscam adicionar citrato ao leite em concentrações de até 40mg/100mL.

Uma alimentação pobre em forrageiras pode levar à ocorrência de teores reduzidos de citratos, situação que pode ocasionar desequilíbrio salino, com conseqüente redução da estabilidade térmica do leite (Silva, 2004). Tanto o citrato como a gordura do leite tem seus teores aumentados quando o rebanho é alimentado com dieta rica em gordura, ocorrendo redução destes componentes quando os animais recebem dieta rica em concentrado (Faulkner e Peaker, 1982).

Variações sazonais nas concentrações de citrato no leite de vaca podem ocorrer, e provavelmente estão relacionadas a

mudanças na dieta, embora as condições climáticas também possam influenciar. No sudoeste da Escócia, o leite apresenta os menores teores de citrato entre maio e agosto, enquanto que, na Austrália e no Japão, os menores teores ocorrem entre julho e outubro (Faulkner e Peaker, 1982).

Há redução nos teores de citrato no leite de vacas com mastite (Faulkner e Peaker, 1982). Estes autores ressaltam ainda que o estágio de lactação, a nutrição e as condições climáticas podem afetar as concentrações de citrato no leite.

2.2.3.4 Uréia

O nitrogênio não-protéico representa entre 5 e 6% do total de nitrogênio do leite, enquanto o nitrogênio protéico representa 95% desse total. O nitrogênio não-protéico é composto de 30 a 50% de uréia, sendo o restante formado, principalmente, pela creatinina, ácido úrico, aminoácidos e amônia (Roseler et al., 1993).

A uréia é uma pequena molécula neutra que se difunde facilmente pelas membranas. Esta molécula se difunde para dentro ou para fora das células alveolares secretoras de leite, entrando em equilíbrio com a uréia plasmática. A principal fonte da uréia plasmática é o nitrogênio proveniente da degradação protéica no rúmen. Quando a concentração de amônia no rúmen excede a capacidade de captura e utilização pela microbiota rumenal, a mesma é absorvida pela parede do rúmen, transportada ao fígado e convertida em uréia (Roseler et al., 1993).

Walstra e Jenness (1984) consideraram normais teores de uréia numa faixa de variação de 8,4 a 28,0mg/100mL. Wolfschoon-Pombo e Lima (1983), a partir de 185 amostras de leite provenientes da região de Juiz de Fora, Minas Gerais, obtiveram valores da concentração de uréia variando entre 18 e 28mg/100mL. Estes

valores foram considerados normais por estes autores. Godden et al. (2001) analisaram o teor de uréia do leite proveniente de 45 rebanhos em Ontário, Canadá, com média de produção de 30 litros/vaca/dia. Obtiveram teor médio de uréia de 29,4mg/100mL \pm 5,4mg/100mL, com valores variando entre 16,2 e 46,2mg/100mL. Estes são valores relativamente altos quando se considera o rebanho brasileiro. Torrent (2000) considera que os valores da uréia no leite de vacas com uma ingestão ótima de matéria seca enquadram-se tipicamente na faixa de 12 a 18mg/100mL. Silva (2004) encontrou teor de uréia variando entre 16,8 e 26,8mg/100mL nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás.

A capacidade da uréia em aumentar a estabilidade térmica do leite normal, em adições de 5, 10 e 20 mM de uréia, foi verificada por Fox et al. (1980), que sugeriram que as oscilações naturais na concentração de uréia seriam o principal fator responsável pela variação na estabilidade térmica do leite. Silva e Abreu (2004), trabalhando com leite cru contendo teores de 16,8 a 26,8mg/100mL de uréia, perceberam que a estabilidade do leite cru e a do leite UHT ao etanol podem ser melhoradas em presença de teores mais elevados de uréia. De acordo com Walstra e Jenness (1984), o aumento da estabilidade pode ser atribuído à ação da uréia inibindo a formação de ácido, podendo também ser parcialmente convertida em cianureto de amônio e atuando sobre os grupos tiol das proteínas.

Teores elevados de uréia no leite indicam ineficiência na suplementação protéica dentro do rebanho, sugerindo fornecimento de proteína maior que o necessário ou ingestão irregular de matéria seca ao longo do dia (Torrent, 2000). Este autor resalta ainda que forragens com altos níveis de proteína degradável usadas na alimentação resultarão, normalmente, em teores maiores

de uréia no leite. Segundo Jonker et al. (1998), altas concentrações de uréia no leite são resultantes de vários fatores nutricionais, incluindo não somente excesso de proteína degradável no rúmen, mas também a quantidade inadequada de energia, que podem diminuir a produção de leite e a eficiência de utilização de nitrogênio.

Carlsson e Pehrson (1993) observaram que a média de concentração de uréia no leite foi maior durante a estação de pastejo do que durante o período em que os animais foram confinados. Godden et al. (2001) verificaram, em vacas confinadas no Canadá, que a concentração de uréia no leite foi maior no verão (julho a setembro). Estes sugeriram que a associação entre uréia no leite e estação do ano pode ser confundida com estágio de lactação e efeitos nutricionais. Moller et al. (1993) atribuíram a variação da uréia no leite às mudanças sazonais na proteína do pasto e nos componentes energéticos, ressaltando que uma alta relação proteína/energia pode resultar em elevada concentração de uréia no leite.

2.2.3.5 Proteínas

Diversos fatores podem alterar o teor de proteína do leite. Dentre estes se destacam a nutrição, a estação do ano, a composição racial, o estágio de lactação e a ocorrência de doenças. Os resultados da alteração no teor de proteína do leite por meio da manipulação da dieta podem ser atingidos com o fornecimento de maior suprimento de aminoácidos e energia (glicose) para a glândula mamária, podendo chegar ao incremento de até 0,6 unidades percentuais (sendo mais prováveis de 0,1 a 0,2 unidades). A sazonalidade relaciona-se com a temperatura ambiente e a disponibilidade de alimentos. Altas temperatura e umidade relativa do ar normalmente reduzem a ingestão de alimentos pelos animais nas horas mais quentes do dia, fato que pode se refletir em queda da produção de leite. Entre

as raças leiteiras, a holandesa possui a menor porcentagem de proteína no leite, enquanto que a Jersey é a que possui a maior. O conteúdo total de nitrogênio, de caseína e de NNP é maior no início e no final da lactação, enquanto que, durante o pico de produção e o meio da lactação, a porcentagem de proteína pode diminuir ou permanecer estável. Entre as doenças que podem alterar o teor de proteína no leite, a mastite tem sido a mais estudada, causando decréscimo na quantidade de caseína e aumento na quantidade de proteínas do soro (Reis et al., 2004; Waldner et al., 2004).

As caseínas são um grupo de proteínas específicas do leite representadas por micelas de 30 a 300 nm de diâmetro, com ponto isoelétrico em pH 4,6. Estas micelas são formadas por submicelas, constituindo agregados de várias moléculas de caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas (Walstra e Jenness, 1984; Swaisgood, 1996). O fosfato de cálcio amorfo liga as submicelas entre si, restringindo a mobilidade das moléculas de caseínas (Silva e Abreu, 2004). As proteínas do leite, β -lactoglobulina e κ -caseína são conhecidas por suas propriedades de maior influência na estabilidade térmica do leite (Horne, 1992). Durante o aquecimento a β -lactoglobulina desnaturada associa-se a κ -caseína presente na superfície das micelas de caseína. Esta complexação leva a alterações na conformação tridimensional e nas propriedades funcionais das mesmas, resultando na redução da estabilidade térmica (Fox, 1991).

O efeito das proteínas do leite na estabilidade térmica está relacionado tanto às caseínas quanto às proteínas do soro. O grau de desnaturação térmica das proteínas do soro varia em função da intensidade do binômio temperatura/tempo aplicado ao leite durante o processamento. As proteínas do soro, após a desnaturação, podem formar complexos com as caseínas por meio de ligações dissulfídicas intermoleculares

(Singh e Latham, 1993). A κ -caseína, em especial, tem a capacidade de reagir com o grupamento sulfidrila das proteínas desnaturadas do soro. Esta proteína possui, em sua molécula, regiões hidrofílicas que se orientam para o exterior, enquanto os demais tipos de caseína estão concentrados no interior. A κ -caseína atua como estabilizadora da micela por sua solubilidade ao cálcio, independente da temperatura (Fox, 1991). A distribuição dos sais do leite entre as fases solúvel e coloidal tem efeito determinante no processo de coagulação das caseínas (Faulkner e Peaker, 1982).

2.2.3.6 Prova do Alizarol

O teste do alizarol é utilizado em fazendas e plataformas de recepção como critério de aceitação do leite pela indústria. Segundo Sommer e Binney (1923) existe correlação entre a resistência ao aquecimento e a estabilidade em presença do álcool. O álcool promove a desidratação das caseínas e redução da constante dielétrica em níveis que induzem sua desestabilização e coagulação (Horne, 1992), podendo estar ou não associada ao efeito da elevada acidez ou do desequilíbrio salino (Silva, 2004).

A alizarina no alizarol atua como indicador de pH, auxiliando na diferenciação entre problemas de coagulação por desequilíbrio salino (coloração vermelho-tijolo é normal) e acidez (coloração tende a amarelo com a intensificação da acidez) ou, ainda, servindo como indicador de mastite, diluição ou fraude por adição de alcalinos ao leite (coloração tende a lilás com a intensificação do problema) (Rodrigues et al., 1995; Brasil, 2003).

Segundo Horne (1992), o mecanismo de desestabilização das caseínas por ação do etanol está vinculado ao efeito desnaturante do álcool, que promove redução na constante dielétrica da mistura, até atingir o limite crítico que desencadeia a precipitação. Vários fatores desempenham papéis relevantes neste processo, como as cargas e as interações entre as micelas, pH, concentração do álcool e composição do leite.

A estimativa da estabilidade térmica do leite por meio do teste do álcool ou do alizarol é um procedimento útil para a verificação da aptidão do leite para processamento, sendo essencial para a indústria prever a resistência do leite ao tratamento térmico. Quanto maior a concentração do álcool a que o leite resistir sem que ocorra floculação das proteínas, maior será a sua estabilidade em processamentos térmicos rigorosos. Entretanto, elevadas concentrações do álcool resultam na coagulação de leite de boa qualidade. Desta forma, por meio desta prova é possível direcionar o tipo de beneficiamento a que o leite poderá ser submetido (Silva e Almeida, 1998; Santos, 2004). Barros et al. (2000) analisaram as variações na composição em função da positividade à prova do álcool a 70% v/v, a partir de 206 amostras individuais de leite cru de rebanhos do Uruguai. Foi verificado por estes autores que as amostras positivas à prova do álcool apresentavam parâmetros mais elevados de gordura, proteína, sólidos não gordurosos, sólidos totais, cálcio, pH e contagem de células somáticas, em relação às amostras negativas. Também em relação às amostras negativas, as amostras positivas à prova do álcool apresentaram menores teores de lactose, menor índice crioscópico e menor contagem bacteriana total. (Quadro 3).

Quadro 3. Variações na composição do leite individual em função da floculação à prova do álcool.

Componente	Álcool negativo (n=146)		Álcool positivo (n=70)		Teste t (p<0,05)
	Média	DP	Média	DP	
Gordura (%)	3,40	0,89	3,95	0,96	0,0001

Proteína (%)	3,23	0,38	3,49	0,64	0,0002
Lactose (%)	4,84	0,28	4,65	0,28	0,0000
SNG (%)	8,68	0,47	8,75	0,71	n.s.
ST (%)	12,16	1,18	13,04	1,76	0,0001
cels/mL	210.152	323.636	319.175	707.681	n.s.
Crioscopia (°C)	-0,52	0,01	-0,53	0,02	0,016
Bactérias/mL	563.079	1.196.334	119.500	141.794	n.s.
Ca ⁺⁺ (g/L)	0,098	0,04	0,117	0,03	0,011
pH	6,59	0,61	6,67	0,14	n.s.

SNG (%) = sólidos não gordurosos, ST (%) = sólidos totais, cels/mL = células somáticas/mL, DP = desvio padrão, Teste t = Teste de Student, n.s. = não significativo.

Fonte: Barros et al. (2000)

A legislação brasileira preconiza que a estabilidade do leite deve ser testada por meio da prova do alizarol com solução alcoólica em concentração mínima de 68% v/v, de acordo com Regulamento... (1980), e 72% v/v, segundo Brasil (2002). A concentração da solução alcoólica a ser utilizada deve ser proporcional ao rigor do tratamento térmico a que se deseja submeter o leite, com variações de 68 a 80%. Entretanto, Molina et al. (2001) demonstraram que ao se utilizar concentrações de álcool superiores a 75% (v/v), como prova de recepção do leite, existe a possibilidade de se recusar amostras com características físico-químicas e higiênicas-sanitárias aceitáveis e com estabilidade térmica adequada. Pien (1972), citado por Silva (2004), sugeriu que, para fins de produção de leite UHT, o leite cru deverá resistir, no mínimo, ao etanol a 74% (v/v).

2.2.3.7 Tempo e temperatura de processamento do leite

As reações químicas são dependentes da temperatura, que, quando é elevada em 10 °C, acelera a ocorrência destas em até três vezes, podendo aumentar a velocidade de desnaturação de uma proteína globular em 100 vezes. Desta forma, o estudo do binômio tempo e temperatura é relevante para que o tratamento térmico aplicado cause mínimas modificações nas características físico-químicas e nutricionais

do produto, devendo ser, no entanto, efetivo na destruição dos microrganismos patogênicos e na inativação de enzimas (Silva e Almeida, 1998).

2.2.3.8 Mastite

Mastite é a inflamação da glândula mamária que tem como principal agente etiológico as bactérias. De acordo o Conselho Nacional de Mastite dos EUA (National Mastitis Council), rebanhos que não adotam medidas de controle da mastite apresentam em média 50% das vacas infectadas em pelo menos dois quartos mamários (Current..., 1996). No Brasil, existem trabalhos que mostram uma variação de 20% a 38% na prevalência desta doença (Fonseca e Santos, 2000). A mastite, particularmente a forma subclínica, é considerada a mais importante entre as doenças que afetam a qualidade do leite. O leite de vacas com mastite apresenta maiores teores de sódio e cloro e menores concentrações de potássio, cálcio e fósforo. O pH torna-se mais elevado, aproximando-se do pH sanguíneo, que apresenta valores que variam de 7,3 a 7,5. Quando os microrganismos envolvidos no processo de mastite são produtores de ácido, como os coliformes, o leite pode apresentar um pH menor (Brito e Dias, 1998).

O leite obtido de vacas com mastite pode não suportar as provas de resistência térmica (provas da fervura e do álcool), sendo, neste caso, erroneamente condenado como leite

ácido, pois normalmente ocorre um pH alcalino. Um dos fatores determinantes nesta floculação é a presença de vários tipos de proteases, dentre as quais se destacam a plasmina, o plasminogênio, os ativadores de plasminogênio, a trombina, a catepsina D, as proteases ácidas do leite, as aminopeptidases e as proteases derivadas dos leucócitos (células somáticas). A plasmina é a forma ativa que é produzida a partir do zimógeno denominado plasminogênio. O resultado da ativação da plasmina é a quebra de cadeias de algumas proteínas lácteas, especialmente a caseína, podendo desencadear coagulação do leite (Fonseca e Santos, 2000; Silva, 2004).

2.2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A presença de infecção na glândula mamária é um dos fatores mais importantes que ocasionam o aumento da quantidade de células somáticas no leite. As células somáticas são constituídas por células de defesa do organismo (glóbulos brancos, 98 a 99%), que migram do sangue para a glândula mamária para combater agentes agressores, além de células epiteliais de descamação. Desta forma, a contagem de células somáticas (CCS) é um indicativo do grau de infecção da glândula mamária, sendo fator diagnóstico de mastite subclínica e aceita internacionalmente como uma das medidas para determinar a qualidade do leite (Brito e Dias, 1998; Machado et al., 1999; Silveira, 2002).

A mastite causa alteração na composição do leite por alterar a permeabilidade dos vasos sanguíneos e a habilidade de síntese de tecido secretor (Philpot e Nickerson, 1992). Além da ocorrência de infecção, outros fatores podem alterar a CCS. Dentre estes estão as diferenças entre rebanhos e raças, ordem de parto, estações do ano, estresse térmico e estágio de lactação. Estima-se que ocorra uma redução de 2 a 2,5% na produção de leite para cada 100.000

células/mL acima de 200.000 células/mL. O leite proveniente de úberes saudáveis apresenta, normalmente, CCS menor que 50.000 células/mL, podendo ocorrer contagens de até 200.000 células/mL (Eberhart et al., 1982).

Segundo Machado et al. (1999), o teor de gordura reduz com o aumento da CCS, porém, se a redução da produção de leite for mais acentuada que a redução da produção de gordura, ocorre concentração, aumentando-se o teor deste componente. A composição da gordura também pode ser alterada, ocorrendo queda na concentração de ácidos graxos de cadeia longa e aumento de ácidos graxos livres e de cadeia curta. Entretanto, Kitchen (1981) afirma que as alterações no teor e composição da gordura seriam pequenas e só se mostrariam de modo significativo quando a infecção se tornasse severa, apresentando contagens maiores que 2.000.000 células/mL.

Elevadas CCS estão correlacionadas com maiores teores de gordura e proteínas do soro, menor porcentagem de caseínas e lactose e manutenção da concentração de sólidos totais. As mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorrem a partir de 1.000.000 células/mL para a gordura, e 500.000 células/mL para proteína e lactose (Machado et al., 1999). Estes autores ressaltam ainda que, quanto maior a CCS, maior a probabilidade de existência de resíduos de antibióticos no leite. Esta probabilidade é cinco vezes maior nos rebanhos com CCS maior que 750.000 células/mL que nos rebanhos com baixa CCS. Este fato pode ser relacionado ao tratamento de maior número de animais com mastite e maior utilização de antibióticos, sem respeitar o período de descarte do leite (Santos, 2004).

O processamento industrial é afetado pela CCS. Em altas contagens verifica-se queda no rendimento industrial, encurtamento da vida de prateleira dos produtos, bem como a

redução da qualidade do produto final. Esta redução na qualidade ocorre devido ao aumento de ácidos graxos de cadeia curta, fato que leva a alterações sensoriais marcantes nos produtos (Machado et al., 1999).

Em virtude do aumento da demanda e da importância do monitoramento das CCS, o método tradicional de microscopia direta tem sido pouco utilizado por não atender ao volume de análises requeridas e pelo custo por análise. Atualmente a CCS pode ser realizada em equipamentos analisadores eletrônicos, como o Somacount 300 da Bentley®, com capacidade de análise de até 300 amostras por hora. Este equipamento tem como princípio de funcionamento a citometria de fluxo. O DNA das células da amostra é corado pelo brometo de etídio, que é um corante fluorescente. Após corado o DNA das células chegam ao compartimento denominado citômetro (“flow cell”), por meio de um fluido carreador, onde há a incidência de laser sobre uma alíquota da amostra com DNA corado. Ocorre então a emissão de fluorescência, proporcional à quantidade de brometo de etídio ligado ao DNA, que é transformada em pulso elétrico, amplificado, filtrado e convertido em CCS e o resultado é expresso em células por mL de leite (Somacount..., 1997).

2.2.5 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Devido a seu alto conteúdo de água, pH próximo ao neutro e variedade de nutrientes, o leite constitui excelente meio de crescimento para muitos microrganismos. O leite cru pode ser contaminado a partir de grande variedade de microrganismos provenientes das mais diversas fontes. O número e o tipo de microrganismos presentes no leite cru refletem a saúde da vaca, além das condições higiênicas nas quais o leite foi obtido e armazenado (Broutin, 2004). A qualidade higiênica é

influenciada pelo nível sanitário do rebanho, presença de microrganismos, odores estranhos e resíduos (de antibióticos, desinfetantes, vermífugos, pesticidas, outros químicos), entre outros fatores (Brito e Dias, 1998).

A qualidade microbiológica do leite cru resulta de um conjunto de fatores, como a saúde da glândula mamária, as condições de manejo do rebanho, da higiene na obtenção do leite, da sala e dos equipamentos e utensílios de ordenha, do estado de saúde do ordenhador e das condições de estocagem e transporte do leite enviado à indústria (Cerqueira et al., 1999a).

Existem alguns métodos que podem ser usados para a contagem bacteriana no leite, como a contagem padrão em placas e a contagem eletrônica.

2.2.5.1 Microrganismos Mesófilos

Os microrganismos mesófilos são um grupo de bactérias que fermentam a lactose em ácido láctico e possuem temperatura ótima de crescimento na faixa de 20 a 40 °C. Os principais gêneros de microrganismos mesofílicos são *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp.. A contagem destes microrganismos pode ser utilizada como indicador da qualidade higiênica do leite e derivados, principalmente quando houver suspeita de longa exposição à temperatura ambiente (Harding, 1995). Altas contagens destes microrganismos podem resultar na acidificação do leite, quando as condições de temperatura forem adequadas para a multiplicação bacteriana.

Com a granelização, o leite passou a ser refrigerado na fazenda e o período de estocagem pré-processamento foi aumentado. Com isto, os microrganismos psicrotóxicos, que antes correspondiam ao máximo de 10% da microbiota do leite cru, passaram a predominar no leite.

2.2.5.2 Microrganismos Psicrotróficos

Os psicrotróficos são microrganismos que possuem a habilidade de se multiplicarem também em temperaturas de refrigeração, sendo, em sua maioria, gram-negativo e representando atualmente a principal causa de redução da qualidade do leite cru. Ao se multiplicarem, estas bactérias podem produzir enzimas extracelulares termoresistentes como proteases, lipases e fosfolipases. Além da qualidade higiênica reduzida, a atuação destas enzimas sobre os componentes do leite, reduz a qualidade nutricional e a vida de prateleira do produto (Pereira Júnior, 2002).

Os principais gêneros bacterianos, com cepas psicrotróficas e produtoras de enzimas termoresistentes que causam alterações no leite e derivados são: *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. As fontes primárias de psicrotróficos no leite incluem água, solo e vegetação, podendo estar presentes no ar e serem originários de contaminação fecal e de resíduos em equipamentos mal higienizados (Cox, 1993).

Segundo Cousin (1982), os psicrotróficos representam menos de 10% da microbiota total do leite produzido sob boas condições higiênicas. Quando estas condições são precárias, os microrganismos psicrotróficos podem atingir 75% ou mais da microbiota do leite.

A contagem de microrganismos psicrotróficos ainda não é uma exigência da legislação brasileira. É relevante verificar a presença destes microrganismos no leite cru para avaliar a qualidade higiênica, o período de estocagem e o destino tecnológico do mesmo.

2.2.5.3 Contagem Bacteriana do Leite

A determinação das contagens de microrganismos no leite é importante para a avaliação da higiene de ordenha, da saúde

dos animais e das condições de estocagem e transporte do leite cru, sendo uma importante ferramenta no controle de qualidade do mesmo. Além disto, o leite com elevada contagem bacteriana representa risco para a saúde do consumidor pelo potencial de veicular microrganismos e toxinas microbianas (Fonseca, 2005).

Esta contagem pode ser realizada por meio de equipamento eletrônico, oferecendo a vantagem do tempo reduzido por análise. Atualmente estes equipamentos analisam aproximadamente 150 amostras por hora. Este equipamento tem, como princípio de funcionamento, a citometria de fluxo. Um corante fluorescente, brometo de etídio, se liga ao DNA das células, que são levadas por meio de um fluido carreador a um compartimento de passagem. Neste compartimento há a incidência de um feixe de laser sobre a amostra com DNA corado, que ao incidir no brometo de etídio resulta na emissão de fluorescência, que é captada como pulso eletrônico. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência captados são traduzidos em contagens individuais de bactérias e então transformados estatisticamente em UFC/mL por meio de uma curva de calibração previamente elaborada (Bactocount..., 2002).

Na determinação da contagem bacteriana por citometria de fluxo não há distinção entre células vivas e mortas. A técnica de marcação por imunofluorescência, utilizando corantes que permitem diferenciação da viabilidade celular, pode ser uma alternativa futura para contornar este problema (Fonseca, 2005).

2.2.6 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

O uso de antibióticos para o tratamento de infecções intramamárias é a melhor ferramenta no controle da mastite. Porém, o uso indiscriminado destas substâncias e o

desrespeito ao período de eliminação do leite de animais tratados têm conduzido a problemas de saúde pública e causado prejuízos econômicos à indústria de laticínios. Os grupos de antimicrobianos mais utilizados em todo o mundo para tratamento intramamário de vacas com mastite são os β -lactâmicos (Schäellibaum, 2000).

O consumo freqüente de leite contendo resíduos de antibióticos pode resultar em sérios problemas de resistência microbiana, além de reações alérgicas, choque anafilático, efeitos tóxicos e efeitos colaterais secundários à população humana e animal. Na indústria, a presença de resíduos de antibióticos no leite leva a inibição dos microrganismos utilizados na produção de lácteos fermentados, resultando em perdas econômicas significativas neste setor industrial (Veisseyre, 1988; Lopes et al., 1998).

Segundo o artigo 514 do RIISPOA, é proibido o emprego de substâncias químicas na conservação do leite e, quando um antibiótico for utilizado para tratamento de enfermidades em vacas leiteiras, a comercialização do leite somente poderá ser efetuada transcorridas 72 horas da última aplicação destes produtos (Regulamento..., 1980).

No Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e nos Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado (Instrução Normativa n°51, 2002), consta que a pesquisa de resíduos de antibióticos e outros inibidores do crescimento microbiano deverá seguir os limites máximos de resíduos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos no Leite (PNCR) do MAPA, na forma da Instrução Normativa n°42 de 20 de dezembro de 1999 (Brasil, 1999).

Dentre os métodos de triagem e seleção, vários kits rápidos para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite estão disponíveis no mercado. Os principais testes disponíveis baseiam-se no princípio de inibição microbiana do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Estes testes apresentam alta sensibilidade para a detecção de antibióticos dos grupos β -lactâmicos, em especial as penicilinas, porém são menos sensíveis a outros grupos como os aminoglicosídeos e as sulfonamidas (Hotta, 2003). Dentre as marcas de kits disponíveis no mercado que apresentam as características descritas acima, podem-se citar o Delvotest® (Gist-Brocades, Holanda) e o Copan® (Christian Hansen, Itália).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados brutos obtidos através do Sistema de Telemetria Hidrometeorológica (STH) na estação SE-Barreiro, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005, foram cedidos pela Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG, 2006)¹. Nesta estação de coleta de dados foram realizados registros diários das temperaturas mínima, máxima e média, da umidade relativa do ar e da precipitação pluviométrica.

3.2 DADOS DE CARACTERIZAÇÃO DAS FAZENDAS

3.2.1 FAZENDA 1

O rebanho desta propriedade foi composto por uma média de 86 vacas em lactação ao longo do ano, sendo aproximadamente 35%

¹ COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS (CEMIG). Dados meteorológicos armazenados na Estação Barreiro no período de outubro de 2004 a setembro de 2005. Sistema de Telemetria Hidrometeorológica. 2006. (Comunicação pessoal)

de vacas holandesas puras, 64% de vacas cruzadas 3/4 e 7/8 holandês/zebu e 1% mestiças zebu. As vacas em lactação receberam alimentação conforme o Quadro 4, sendo que, o regime de ingestão de água nesta propriedade foi *ad libidum*. Com relação ao manejo reprodutivo, foi feita a concentração dos partos no período de março a maio, visando aumento da produção de leite no período de entressafra.

Foram realizadas duas ordenhas diárias, a primeira às 04h30minh da manhã e a segunda às 13h30minh, com um intervalo de nove horas da ordenha matinal para a vespertina e de 15 horas entre esta e a da manhã do dia seguinte. O teste da caneca telada foi executado em todas as ordenhas e

os animais positivos em dois testes consecutivos, separados para tratamento de mastite. No pré e no pós-“dipping” foi utilizado iodo glicerinado a 1g/100ml.

A seqüência do procedimento de limpeza e higienização utilizada nos equipamentos de ordenha ao final das mesmas é descrita abaixo:

- enxágüe com água a 45-50° C;
- detergente alcalino clorado (Weizur®) em água a 60° C por 10 minutos;
- sanificante (Weizur Oxiclean5®) em água a 40° C por cinco minutos;
- duas vezes por semana: detergente ácido (Weizur A-500®) em água a 60° C por 15 minutos

Quadro 4. Dietas fornecidas aos animais na fazenda 1 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

VOLUMOSO	Mês	CONCENTRADO	
Silagem de milho, de sorgo ou de capim	outubro 2004	Milho Soja Polpa cítrica Casquinha de soja Uréia Sal mineral Fosfato	
	novembro 2004		
Napier ou <i>Brachiaria decumbens</i>	dezembro 2004		
	janeiro 2005		
	fevereiro 2005		
	março 2005		
	abril 2005		
Silagem de milho, de sorgo ou de capim	maio 2005		Farelo de soja Polpa cítrica Bicarbonato Sal mineral Sal comum
	junho 2005		
	julho 2005		
	agosto 2005		
	setembro 2005		

3.2.2 FAZENDA 2

O rebanho desta propriedade foi de, na média, 63 vacas em lactação, sendo aproximadamente 97% de vacas holandesas puras e 3% de vacas cruzadas 1/2 jersey/holandês. As vacas em lactação receberam alimentação conforme Quadro 5,

sendo que, o regime de ingestão de água nesta propriedade foi *ad libidum*. Com relação ao manejo reprodutivo, foi feita concentração dos partos no período de abril a julho, visando ao aumento da produção de leite no período de entressafra.

Quadro 5. Dietas fornecidas aos animais na fazenda 2 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

VOLUMOSO	Mês	CONCENTRADO
Silagem de milho	outubro 2004	Milho Soja
	novembro 2004	

Capim elefante ou braquiarião	dezembro 2004	Polpa cítrica Casquinha de soja Uréia Sal mineral
	janeiro 2005	
	fevereiro 2005	
	março 2005	
	abril 2005	
Silagem de milho	maio 2005	Farelo de soja Polpa cítrica Bicarbonato Sal mineral Sal comum
	junho 2005	
	julho 2005	
	agosto 2005	
	setembro 2005	

Foram realizadas diariamente duas ordenhas, a primeira às 6h da manhã e a segunda às 15h, com um intervalo de 9 horas entre a ordenha matinal e a ordenha vespertina e de 15 horas entre esta e a próxima ordenha da manhã. O teste da caneca telada foi executado antes da ordenha dos animais, sendo que os positivos foram testados para confirmação por meio do CMT. Se caso positivo neste último, os animais eram tratados para mastite. No “pré-dipping” foi utilizado cloro a 1,9 g/100mL e no “pós-dipping”, iodo glicerinado a 1,8 g/100mL.

A seqüência dos procedimentos de limpeza e higienização utilizada nos equipamentos de ordenha ao final das mesmas é descrita abaixo:

- enxágüe com água a 40° C;
- detergente alcalino clorado (Weizur®; 25 mL/10L de água) em água a 80° C por 10 minutos;
- enxágüe com água a 30-40° C;
- 30 minutos antes da ordenha: sanificante (Weizur Oxiclean 5®; 30mL/10L de água) em água à temperatura ambiente por cinco minutos;
- duas vezes por semana: detergente ácido em água a temperatura ambiente por cinco minutos.

3.3 ORIGEM E PERÍODO DE AMOSTRAGEM

O leite cru obtido de tanques de refrigeração por expansão em duas fazendas foi avaliado por um período de 12 meses, outubro de 2004 a setembro de 2005. As amostras, totalizando 41, foram obtidas da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, em Igarapé, Minas Gerais, e da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo, também no mesmo estado, ambas pertencentes à Escola de Veterinária da UFMG. Foram realizadas duas coletas por mês em cada fazenda, sendo que nos meses de outubro de 2004 e setembro de 2005 foi realizada apenas uma coleta em cada fazenda, e três coletas na fazenda 2 foram inviabilizadas por apresentarem composição anormal (volume de leite do tanque correspondia a ordenhas desproporcionais, isto é, predomínio de leite da ordenha da manhã ou da tarde.

Durante a primeira e até meados da segunda estação de coleta, o leite foi coletado sem a padronização do número de ordenhas que estavam no tanque naquele momento. Após este período foi padronizado que as coletas só deveriam ocorrer quando o número de ordenhas no tanque fosse igual a quatro, para maior semelhança com os parâmetros do leite entregue à indústria.

3.4 COLETA DE AMOSTRAS E ACONDICIONAMENTO

A amostragem foi feita de acordo com o manual de procedimentos de coleta e envio de amostras para a análise da qualidade do leite-LabUFMG², após verificação da temperatura do leite no tanque e homogeneização por 10 minutos (Manual..., 2004).

As coletas realizadas até o dia 14 de março de 2005 não foram padronizadas para o número de ordenhas no tanque no momento da coleta. Decorrido este período foram padronizadas as coletas para quando o número de ordenhas no tanque incluíssem número igual de ordenhas da manhã e da tarde, isto é, volume equivalente a duas ou quatro ordenhas no tanque, para manutenção da proporcionalidade. Este cuidado foi tomado a fim de se minimizar variações decorrentes dos diferentes intervalos entre ordenhas.

As amostras destinadas aos exames microbiológicos, pesquisa de resíduos de inibidores, análise de uréia, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e composição centesimal (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram coletadas separadamente, em frascos coletores estéreis.

As amostras para análise da composição centesimal e CCS foram adicionadas do conservante bronopol³ na proporção de 8 mg/40mL de leite. Para a análise da CBT, o conservante utilizado foi o azidiol⁴ na proporção de 0,13mL/40mL de leite. Para as demais análises: pH, acidez titulável,

alizarol, crioscopia e citrato, a coleta foi realizada em frasco coletor, sem a utilização de conservantes.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável. Ao chegarem ao laboratório, as análises de pH, acidez titulável, alizarol e crioscopia, foram realizadas no máximo em 24 horas após a coleta, permanecendo refrigeradas até o momento das análises. As análises de contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos e psicrotóxicos foram realizadas imediatamente após a chegada das amostras de leite ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG (DTIPOA-EV-UFMG). As análises para composição centesimal, CCS e CBT foram realizadas no LabUFMG² (DTIPOA-EV-UFMG). As amostras para análise de uréia foram encaminhadas ao Laboratório de Análise de Leite da ESALQ/Piracicaba-SP. A dosagem de citrato e a pesquisa de resíduos de inibidores foram realizadas no Laboratório de Físico-Química do DTIPOA-EV-UFMG.

3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.5.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

A determinação do pH foi realizada conforme Brasil (2003), após a calibração do equipamento da marca Sensoglass[®] modelo Sp 769T, com as soluções padrão pH 4,0 e 7,0.

3.5.2 Acidez Titulável

² LabUFMG (Belo Horizonte/MG) unidade operacional da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, credenciadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

³ 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e natamicina

⁴ cloranfenicol (0,15g/100mL), azida sódica (3,6g/100mL), citrato de sódio (4,5g/100mL), álcool etílico (1mL/100mL), azul de bromofenol (35mg/100mL) e água destilada esterilizada q.s.p.

A determinação de acidez titulável foi realizada utilizando-se solução de NaOH (N/9) (solução Dornic) e indicador de fenolftaleína, conforme Brasil (2003).

3.5.3 Prova do Alizarol

A prova do alizarol foi realizada utilizando-se soluções de álcool a concentrações pré-estabelecidas (72, 75, 80, 85 e 90%) adicionadas do indicador alizarina, conforme metodologia descrita em Brasil (2003). A concentração de 72% é a mínima

requerida pela IN51/2002 (Brasil, 2002). Alizarol com concentrações de álcool superiores a 72% foram testadas para verificar o nível de estabilidade do leite em concentrações mais elevadas, algumas rotineiramente utilizadas como critério de seleção pelos estabelecimentos captadores de leite.

Tendo em vista que nesta prova a intensidade de floculação apresenta-se bastante variável foram atribuídos diferentes graus de floculação, conforme Tab. 1.

Tabela 1. Intensidade de floculação apresentada pelo leite cru na prova do alizarol.

RESULTADO	FLOCULAÇÃO	ESCORE
Floculação ausente	-	0
Floculação leve	+	1
Floculação moderada	++	2
Floculação intensa	+++	3

3.5.4 Índice Crioscópico

O índice crioscópico foi determinado em graus Hortvet (°H), utilizando-se crioscópio eletrônico Laktron®, modelo LK-7000, previamente calibrado com as soluções padrão de cloreto de sódio (-0,422 °H; -0,621 °H e -0,530 °H), conforme Brasil (2003).

3.5.5 Teor de Citrato

O teor de citrato foi determinado empregando-se dois métodos distintos. O método enzimático, utilizando-se um kit rápido, e o método espectrofotométrico, empregando piridina e anidrido acético (Método Piridina Acética - MPA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV-160A. Os resultados foram expressos em mg/100mL.

3.5.5.1 Método enzimático

Utilizou-se o kit de determinação de ácido cítrico em alimentos Boehringer Mannheim/r-Biopharm®, com modificações (Izco et al., 2003). O leite foi desnatado, seguindo-se a precipitação de proteínas com solução de ácido tricloroacético (TCA, 3M) e correção do pH para 8,0, com solução de NaOH (1M), e filtrado posteriormente.

Atendendo ainda outra especificação do kit (manual de procedimentos, Anexo 1), a diluição final do filtrado translúcido obtido foi de 1:10. Os passos seguidos no preparo das amostras estão especificados abaixo:

3.5.5.1.1 Preparo das amostras para análises com Kit Boehringer Mannheim

- Centrifugação de 20mL da amostra de leite cru (10 minutos em centrífuga MetPath®, rotação 15);
- Retirar a gordura da superfície com auxílio de espátula;
- Verificar o teor de gordura no leite por meio do método de GERBER;

- Pipetar alíquota de 5mL de leite desnatado em um Becker de 100mL;
- Adicionar 25mL de água destilada;
- Homogeneizar;
- Adicionar 1mL de solução de TCA 3M;
- Homogeneizar;
- Deixar em repouso por 10 minutos;
- Adicionar solução de NaOH 1M até pH 8,0 (o volume gasto desta solução foi de aproximadamente 2,4mL, e a faixa de variação admitida na correção do pH foi de 7,90 a 8,15);
- Completar o volume para 50mL com água destilada, em balão volumétrico;
- Inverter o balão 5 vezes, homogeneizando;
- Filtrar com papel de filtro nº 40.

3.5.5.2 Método piridina acética

Para a determinação do teor de citrato no leite, expresso como ácido cítrico, foi utilizado o método espectrofotométrico empregando piridina e anidrido acético, com leitura a 428 nm, conforme Marier e Boulet, citado por White e Davies (1963) e Silva (2004).

Após a realização das análises, utilizando-se os mesmos procedimentos de Silva (2004), as absorvâncias foram convertidas em concentrações de citrato, expressas como ácido cítrico, empregando-se a equação de regressão linear da curva padrão confeccionada (Anexo 2). A equação obtida foi: $Y = -0,0039 + 0,5820.X$, onde Y é a concentração do citrato e X é o valor da absorvância da amostra. O coeficiente de determinação desta equação ($R^2 = 0,99$) reflete a adequacidade do modelo na estimativa dos pontos observados (Sampaio, 2002).

3.5.6 Teor de Uréia

Os teores de uréia foram determinados no leite cru por meio de método enzimático

colorimétrico, no equipamento ChemSpec 150 da marca Bentley® na Clínica do Leite/ESALQ-Piracicaba-SP, e os resultados expressos em mg/100mL. (Chemspec..., 1998).

3.6 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

As análises de composição centesimal foram realizadas utilizando-se equipamento eletrônico por absorção diferencial de ondas no infravermelho, conforme Determination...(1996). O equipamento utilizado para realização destas análises foi o Bentley 2000®, que quantifica os macrocomponentes por absorção de luz infravermelha em comprimentos de onda específicos. Para a gordura, o comprimento de onda utilizado é de 5,7 μ m, para a proteína, 6,5 μ m e para a lactose, 9,5 μ m (Bentley..., 1998). Os resultados obtidos foram expressos em g/100g (%). O teor de sólidos não gordurosos (SNG) foi obtido pela diferença entre ST e o teor de gordura.

3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A contagem de células somáticas foi realizada pelo método de citometria de fluxo conforme FIL/IDF 148A: 1995 (Enumeration...,1995), no equipamento Somacount 300, unidade acoplada ao Bentley 2000®. Este sistema combinado é denominado Bentley Combi-System 2300®, e estas duas unidades trabalham em conjunto, com capacidade de análise de até 300 amostras por hora. No Somacount 300 é usado um corante fluorescente de DNA, o brometo de etídio. No compartimento denominado célula de fluxo há a incidência de laser sobre uma alíquota da amostra contendo células com o DNA corado, emissão de fluorescência, que é captada como pulso elétrico, que é amplificado,

filtrado e convertido em CCS. O resultado é expresso em células por mL de leite (Somacount..., 1997).

3.8 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

A contagem bacteriana total foi realizada no equipamento Bentley Bactocount 150, que apresenta o mesmo princípio de funcionamento do Somacount 300, que é a citometria de fluxo. Após transformação estatística baseada em curva de calibração previamente elaborada, a intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência captados são traduzidos em contagem individual de bactérias. Esta contagem é expressa em unidade formadora de colônia (UFC)/mL (Bactocount..., 2002).

3.9 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

3.9.1 Contagem de Microrganismos Mesófilos

A contagem de microrganismos mesófilos foi realizada após plaqueamento em ágar padrão para contagem em placas [*Plate Count Agar* (PCA)] e incubação a 30 °C por 48 horas, conforme metodologia FIL/IDF 100B: 1991 (Enumeration..., 1991a). As diluições decimais foram realizadas em água peptonada a 0,1%.

3.9.2 Contagem de Microrganismos Psicotróficos

A contagem de microrganismos psicotróficos foi realizada após plaqueamento em ágar padrão para contagem em placas [*Plate Count Agar* (PCA)] e incubação a 6,5 °C em estufa incubadora B.O.D. durante 10 dias, conforme metodologia FIL/IDF 101A: 1991 (Enumeration..., 1991b). As diluições decimais foram realizadas em água peptonada a 0,1%.

3.10 PESQUISA DE RESÍDUOS DE INIBIDORES

A pesquisa de resíduos de inibidores no leite foi realizada utilizando-se os kits rápidos Copan-CH ATK “Microplate P&S” (Christian Hansen, Itália) e Delvotest-P (Gist-Brocades, Holanda). A presença de inibidores em concentrações próximas ao limite de detecção resulta em coloração final intermediária entre púrpura e amarela. A presença de inibidores em concentrações iguais ou superiores aos limites de detecção determina a permanência da coloração púrpura do meio, e a ausência de inibidores determina modificação da coloração do meio para amarelo (Hotta, 2003).

As amostras foram centrifugadas, sendo utilizado o leite desnatado. Foram empregados controles positivos e negativos feitos com leite em pó desnatado reconstituído.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, onde cada fazenda e cada estação constituíram uma subparcela. Para a análise dos dados foram utilizados os programas estatísticos SPSS®, versão 9.0, e o Minitab® 10.0 ambos para Windows. A comparação entre médias foi realizada utilizando-se os testes de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p \leq 0,05$) e de Duncan ($p \leq 0,05$). O primeiro foi utilizado nos dados que apresentaram coeficiente de variação (CV) menores que 15%, e o segundo para dados com CV acima de 15%.

A distribuição e a dispersão dos dados foram verificadas por meio dos valores de Assimetria e Curtose, respectivamente. A medida da assimetria de uma distribuição reflete a normalidade dos dados e Curtose é

a medida da aglomeração dos dados em torno do ponto central, ou seja, indica a homogeneidade de dispersão dos dados.

As respostas microbiológicas foram analisadas por estatística não paramétrica, por meio dos coeficientes de correlação de Spearman, por não apresentarem distribuição normal. O coeficiente de correlação de Spearman também foi calculado para as respostas nas concentrações de 72, 75, 80, 85 e 90% no teste do alizarol em relação às demais análises. Para os demais dados, o coeficiente de correlação utilizado foi o de Pearson, por se tratarem de dados paramétricos (Sampaio, 2002). As análises das frequências das respostas ao teste do alizarol foram realizadas utilizando-se o teste do qui-quadrado no programa estatístico Minitab[®].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados fornecidos pela CEMIG¹ foram trabalhados com a confecção de médias mensais das temperaturas mínima, média e máxima, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica (Anexo 5). Na Fig. 2 encontram-se graficamente representadas as médias gerais mensais das temperaturas mínima, máxima e média, e da umidade relativa do ar. As maiores temperaturas ocorreram no período de outubro de 2004 a abril de 2005, nas estações primavera, verão e início do outono. Os valores da umidade relativa do ar foram mais elevados no período de dezembro de 2004 a março de 2005, que correspondeu ao período de maior

ocorrência de chuvas, isto é, final da primavera e período do verão.⁵

As médias mensais foram agrupadas de acordo com as estações do ano, ou seja, primavera/2004 (outubro a dezembro), verão/2005 (janeiro a março), outono/2005 (abril a junho) e inverno/2005 (julho a setembro). A compilação dos dados por estação encontra-se na Tab. 2. Estes dados refletem a semelhança entre as estações primavera e verão, caracteristicamente estações quentes e úmidas, sendo descritas como estação de chuvas. As estações do outono e inverno, frias e secas, são relatadas como estação seca. A maior média da precipitação pluviométrica no inverno em relação ao outono (Tab. 2) ocorreu devido ao início das chuvas, em setembro (Fig. 3), ter sido incorporado às médias do inverno, estação sabidamente seca. Os dados médios da precipitação pluviométrica mensal estão graficamente representados na Fig. 3.

4.2 DADOS DE PRODUÇÃO DE LEITE E OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA NAS FAZENDAS AVALIADAS

4.2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NA FAZENDA 1

A maior produção média de leite por animal na fazenda 1 ocorreu no período de julho a setembro (Tab. 3), período em que os animais receberam silagem e concentrado e permaneceram em sistema de semi-confinamento. Além disto, ocorreu também a concentração de partos nos meses de março a maio, resultando em produção mais elevada na estação seguinte (inverno) por estarem a maior parte dos animais na fase da lactação de maior produção.

⁵ COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS (CEMIG). Dados meteorológicos armazenados na Estação Barreiro no período de outubro de 2004 a setembro de 2005. Sistema de Telemetria Hidrometeorológica. 2006. (Comunicação pessoal)

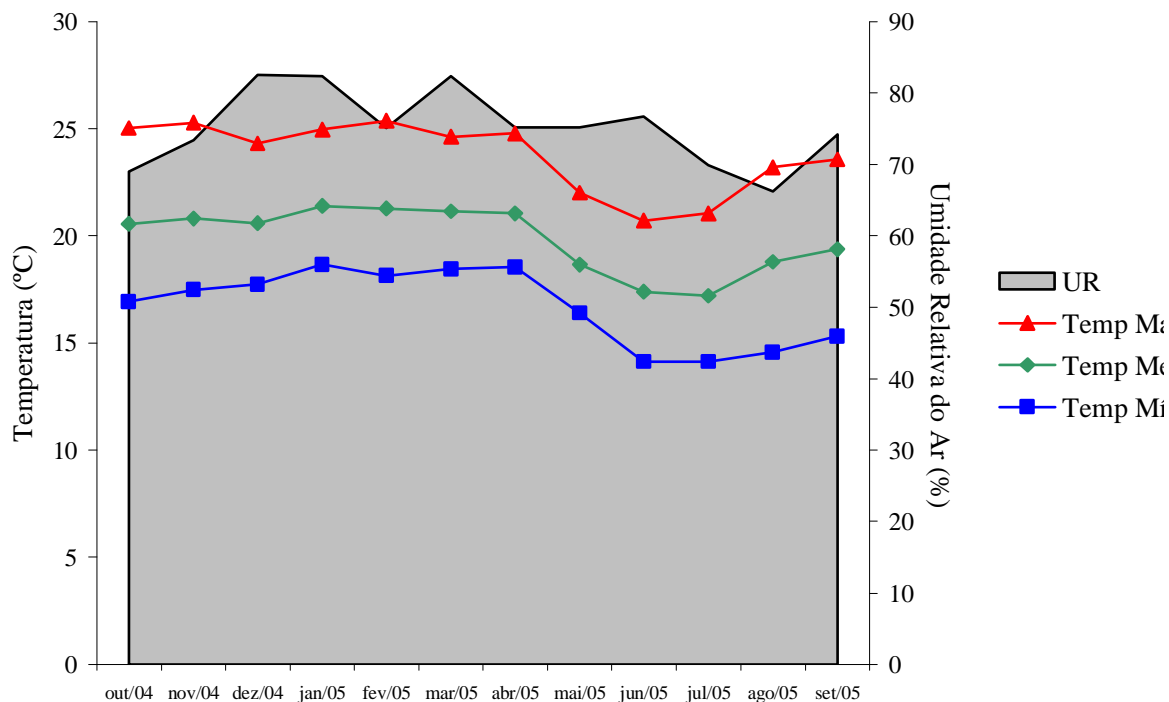


Figura 2. Médias mensais das temperaturas média, mínima média e máxima média e umidade relativa do ar registradas na estação meteorológica do Barreiro-Belo Horizonte.
 Fonte: Adaptado de CEMIG (2006)¹

Tabela 2. Médias por estação das temperaturas média, mínima média e máxima média, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, registradas na estação meteorológica SE-Barreiro da CEMIG, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Estação	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Pluviométrica (mm)
Primavera/04	17,4	20,7	24,9	75	172
Verão/05	18,4	21,3	25	80	191
Outono/05	16,4	19,1	22,5	76	22
Inverno/05	14,7	18,5	22,6	70	51

Fonte: Adaptado de CEMIG (2006)¹

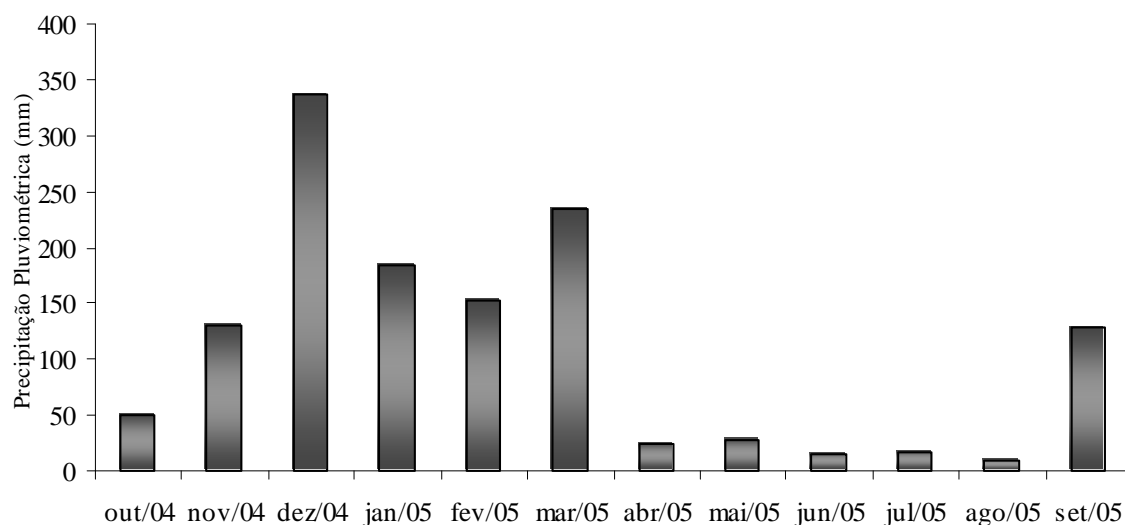


Figura 3. Médias mensais da precipitação pluviométrica registradas na estação meteorológica SE-Barreiro da CEMIG no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Fonte: Adaptado de CEMIG (2006)¹

Tabela 3. Volume médio diário de leite produzido e produção média por animal na Fazenda 1, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Mês/Ano	Volume médio diário (Kg)	Número de animais em lactação	Produção média por animal/dia (Kg)
outubro/04	1.209	92	13,14
novembro/04	1.244	91	13,66
dezembro/04	1.287	89	14,46
janeiro/05	1.214	91	13,34
fevereiro/05	1.100	85	12,94
março/05	1.062	91	11,67
abril/05	990	91	10,88
maio/05	1.028	86	11,96
junho/05	1.131	86	13,15
julho/05	1.143	76	15,04
agosto/05	1.292	75	17,09
setembro/05	1.332	78	17,07

4.2.2 PRODUÇÃO DE LEITE NA FAZENDA 2

No período de abril a junho foi verificada a maior produção de leite, período em que as vacas receberam silagem de milho e concentrado. A menor produção de leite

ocorreu no período de janeiro a março, período em que os animais estavam a pasto. Além disto, esta foi a época mais quente do ano, o que pode ter contribuído para a redução no consumo de alimentos nas horas mais quentes do dia, refletindo em queda da produção de leite.

Tabela 4. Volume médio diário de leite produzido e produção média por animal na Fazenda 2, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Mês/Ano	Volume médio diário (Kg)	Número de animais em lactação	Produção média por animal/dia (Kg)
outubro/04	1.220	53	23,02
novembro/04	1.300	61	21,31
dezembro/04	1.035	62	16,69
janeiro/05	960	62	15,48
fevereiro/05	870	52	16,73
março/05	885	52	17,02
abril/05	1.220	49	24,90
maio/05	1.380	56	24,64
junho/05	1.660	67	24,78
julho/05	1.780	80	22,25
agosto/05	1.680	82	20,49
setembro/05	1.700	81	21,00

4.2.3 PRODUÇÃO DE LEITE POR ESTAÇÃO

Na fazenda 1, a maior produção de leite ocorreu no inverno e a menor, no outono (Fig. 4). Na fazenda 2, a maior produção ocorreu no outono e a menor, no verão (Fig.

4). Em ambas as fazendas, o período de maior produção de leite coincidiu com o período em que os animais receberam silagem como forrageira e concentrado formulado de acordo com análise da silagem.

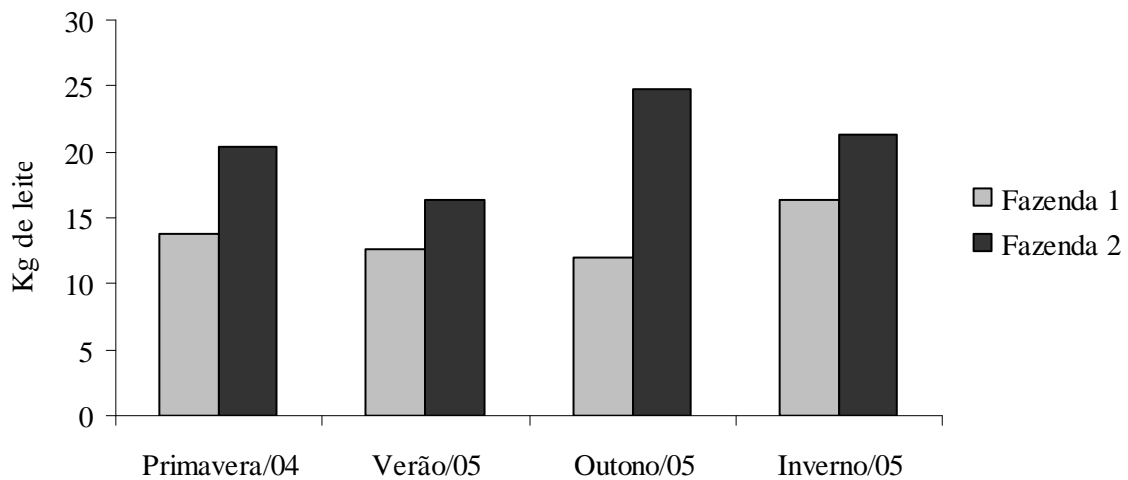


Figura 4. Produção média de leite por animal/dia de acordo com a estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

A maior produção de leite/animal/dia ocorreu no inverno e a menor, no verão (Fig. 5). Na primavera e no verão, os animais estiveram a pasto, e, no outono e inverno, receberam como forragem, silagem. Na Fig. 5 pode-se observar que a produção média por animal/dia na primavera foi um pouco mais elevada que no verão, fato que pode ser

atribuído à maior disponibilidade e à melhor qualidade nutricional do pasto. A ingestão de silagem elevou a produção de leite por animal/dia, tendo sido maior no inverno que no outono (Fig. 5), provavelmente, devido ao maior conforto térmico dos animais em relação ao outono.

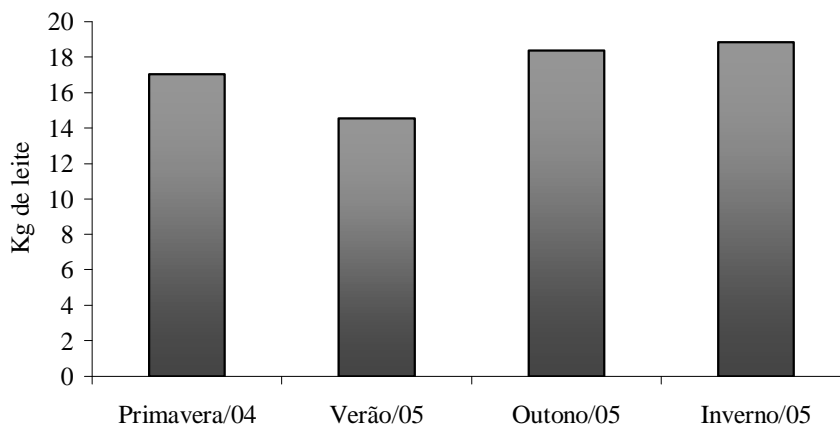


Figura 5. Produção média de leite por animal/dia por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.2.4 OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA

A ocorrência de mastite clínica no período de dezembro de 2004 a março de 2005 nas duas fazendas (Fig. 6) pode ser atribuída às condições ambientais favoráveis à multiplicação de microrganismos, época em que ocorrem as maiores temperaturas (Fig. 2) e precipitações pluviométricas (Fig. 3). O rebanho da fazenda 2 possui maior pureza racial e apresentou maior produção de leite, fatores que podem ter contribuído para

maior ocorrência de mastite clínica, em relação a fazenda 1. No mês de maio de 2005, na fazenda 2, foi registrada a maior ocorrência de mastite clínica durante todo o período avaliado (23,2%) (Fig. 6). Foi verificado que as borrachas do equipamento de ordenha estavam ressecadas. Após a troca das borrachas e manutenção no equipamento de ordenha, realizadas no final do mês de junho de 2005, verificou-se queda significativa na ocorrência da mastite clínica na fazenda 2 (1,3%).

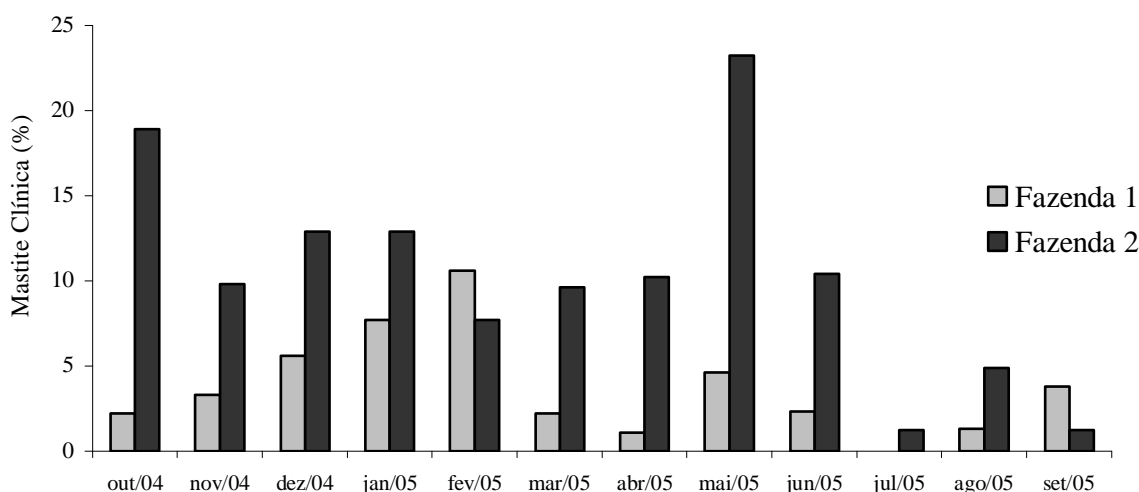


Figura 6. Dados médios da ocorrência mensal de mastite clínica, nos rebanhos em lactação das fazendas 1 e 2 no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.2.5 OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA POR ESTAÇÃO

A maior ocorrência de mastite clínica na fazenda 1 foi verificada durante o verão e na fazenda 2, durante o outono (Fig. 7). Em ambas as fazendas a estação com menor ocorrência de mastite foi o inverno (Fig. 7).

Na fazenda 1 houve aumento dos casos de mastite clínica no verão, estação que apresentou condições de elevadas temperaturas e umidade, favorecendo à ocorrência de mastite ambiental. Na fazenda 2, a maior ocorrência de mastite clínica durante o outono pode ser atribuída ao

desgaste das borrachas e regulagem inadequada do equipamento de ordenha.

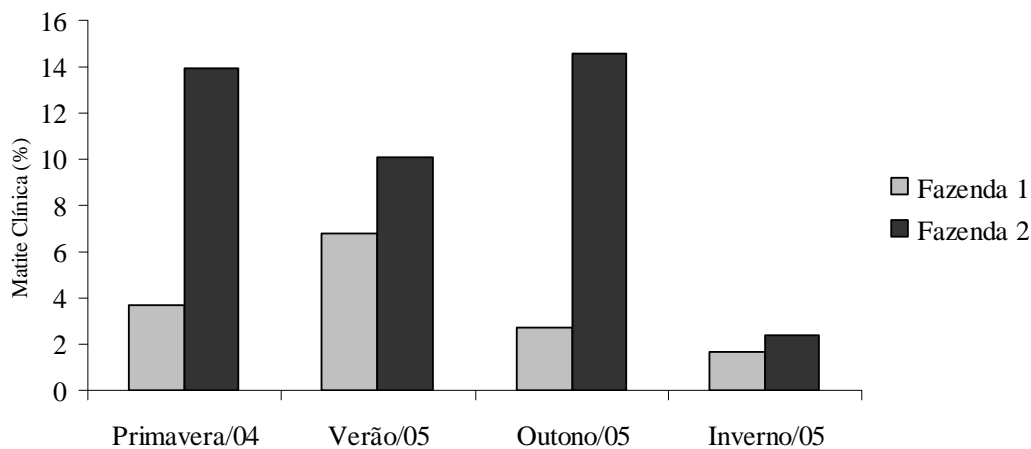


Figura 7. Dados médios da ocorrência de mastite clínica, por estação, nos rebanhos em lactação das fazendas 1 e 2, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

A estação em que houve maior ocorrência de mastite clínica foi o verão, sendo que na primavera esta ocorrência também foi elevada (Fig. 8). A maior incidência de mastite nestas duas estações pode ser justificada pelas condições ambientais favoráveis, como as altas temperaturas ambientais e umidade relativa do ar, a elevada contaminação microbiana ambiental e dos tetos. O alto índice de mastite clínica observado no outono (Fig. 8) pode ser

atribuído aos problemas de desgaste verificados no equipamento de ordenha na fazenda 2, fato que contribuiu de maneira determinante na elevação da média de ocorrência de mastite clínica no outono. No inverno foram observados os menores índices de mastite (Fig. 8), provavelmente devido às condições ambientais desfavoráveis à multiplicação de microrganismos.

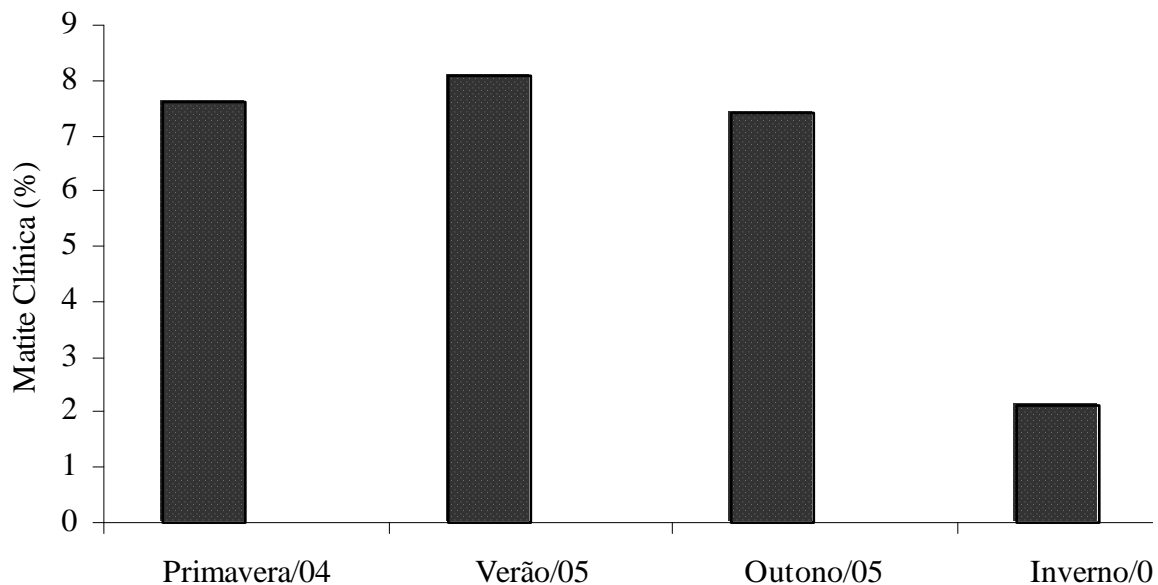


Figura 8. Dados médios da ocorrência de mastite clínica, por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE CRU REFRIGERADO

Os resultados médios obtidos das análises físico-químicas de pH, acidez titulável e índice crioscópico de 41 amostras de leite cru, provenientes de duas fazendas na região metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005, foram condensados na Tab. 5. Os valores médios estão acompanhados de seus respectivos desvios-padrão, coeficiente de variação (CV), assimetria e curtose.

A distribuição e a dispersão dos dados foram verificadas por meio dos valores de Assimetria e Curtose, respectivamente. O valor de Assimetria é a medida da

distribuição dos dados refletindo a normalidade dos mesmos. Assimetria igual ou próxima a zero indica distribuição normal simétrica. Valores positivos apresentam distribuição lateral para a direita, e negativos, para a esquerda. Valores maiores que +1 ou menores que -1 indicam distribuição sem tendência normal. Já o valor de Curtose é a medida da aglomeração dos dados em torno do ponto central, ou seja, indica a homogeneidade dos dados. Em uma distribuição normal, Curtose é igual a zero. Valores positivos indicam maior aglomeração dos dados, apresentando distribuição lateral mais curta do que na distribuição normal, e valores negativos representam menor concentração dos dados, com distribuição lateral alongada (SSPS, 1996).

Tabela 5. Resultados médios das análises de pH, acidez titulável e índice crioscópico, de 41 amostras de leite cru, obtidos em duas fazendas próximas a Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Análise	Média Geral ± Desvio	CV	Assimetria	Curtose
pH	6,75 ± 0,08	0,01	-1,39	2,43
Acidez (°D)	14,84 ± 0,43	0,03	-0,16	-0,15
IC (°H)	-0,536 ± 0,004	0,008	-0,34	3,78

CV= coeficiente de variação

A distribuição dos dados de pH não apresentou distribuição normal, tendo ocorrido aglomeração de dados em torno de um valor. Esta aglomeração ocorreu também com os dados de crioscopia.

4.3.1 pH E ACIDEZ

O valor médio do pH do leite cru foi de 6,75 ± 0,08. De acordo com Walstra e Jenness (1984), Harding (1995) e Santos (2004), este valor está dentro da faixa de normalidade. A acidez titulável média, 14,84 °D ± 0,43, apresentou-se dentro dos limites de normalidade do leite, que, segundo Harding (1995), deve ser menor que 16 °D, e, segundo a legislação brasileira, deverá se apresentar entre 14 e 18 °D (Brasil, 2002). Nenhuma das amostras coletadas apresentou acidez elevada, o que pode refletir condições adequadas do armazenamento sob refrigeração. A temperatura média de armazenamento verificada à coleta foi de 5,85 °C.

4.3.2 ÍNDICE CRIOSCÓPICO

O índice crioscópico médio das amostras foi -0,536 °H ± 0,004, sendo considerado normal de acordo com Brasil (2002). No entanto, duas amostras apresentaram-se fora dos padrões de normalidade segundo Brasil (2002). Estas apresentaram pontos de congelamento de -0,526 °H, valor equivalente à incorporação de água de aproximadamente 2,3%. Por ser a água o solvente utilizado na limpeza e higienização dos equipamentos, pode ocorrer presença desta em quantidades residuais nas

tubulações e sua incorporação acidental ao leite. O problema da aguagem não intencional, segundo Fonseca et al. (1995), pode ocorrer devido à utilização de água no processo de higienização. Outro fator que pode levar a alterações no índice crioscópico do leite seria o congelamento devido a volume reduzido, ou mesmo agitação deficiente. Foi verificado que estas duas amostras pertenciam à fazenda 2 e que ocorreram na estação verão. Outra possibilidade é a elevada ingestão de água pelas vacas, no momento pré-ordenha, refletindo no aumento do índice crioscópico do leite naqueles dias, conforme relatado por Measurement... (1983).

4.3.3 PROVA DO ALIZAROL

Foram testadas diversas concentrações do álcool na prova do alizarol por estarem as indústrias de laticínios, em sua maior parte, utilizando concentrações superiores à mínima preconizada na legislação brasileira, que é de 72% (v/v). Santos (2004) relata que a grande maioria das indústrias atualmente utiliza este teste na concentração de 78% (v/v).

Todas as amostras testadas apresentaram coloração vermelho tijolo, indicando normalidade do pH. Levando-se em consideração a frequência de floculação, verificou-se, através do teste do qui-quadrado ($p \leq 0,05$), a existência de diferença estatisticamente significativa entre as respostas medidas nas duas fazendas estudadas (Tab. 6). Estas diferenças ocorreram nas concentrações de 72, 75 e

80% de álcool. A fazenda 1 apresentou maior frequência de positividade, isto é, floculação a esta prova, nas concentrações de 72, 75 e 80%, em relação à fazenda 2. Levando-se em consideração que esta prova reflete a estabilidade térmica do leite, sendo um procedimento útil para a verificar a aptidão do leite para processamento (Silva e Almeida, 1998), conclui-se que o leite proveniente da fazenda 2 apresentou melhor

aptidão para processamentos térmicos mais rigorosos. No alizarol contendo álcool a 75% apenas 17% das amostras apresentaram floculação enquanto que na concentração de álcool a 80%, 73% das amostras flocularam. Estes resultados indicam que a concentração do álcool entre 75 e 80% foi fator crítico no processo de verificação da estabilização protéica das amostras de leite analisadas.

Tabela 6. Ocorrência de floculação na prova do alizarol nas concentrações de 72, 75, 80, 85 e 90% em duas fazendas próximas a Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

FAZENDA/ ALIZAROL	Nº Amostras	72%*	75%**	80%**	85%	90%
1	22	18,2 ^a	31,8 ^a	90,9 ^a	95,5 ^a	100
2	19	0 ^b	0 ^b	52,6 ^b	78,9 ^a	100
Total	41	9,8	17,1	73,2	87,8	100

Valores seguidos de letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes pelo teste do qui-quadrado, *(p≤0,05), **(p≤0,01)

Considerando a frequência de floculação à prova do alizarol por estação avaliada, a maior frequência de floculação ocorreu no verão e no outono, e as menores no inverno e na primavera. Este fato pode ser visualizado na Fig. 9, que representa a ocorrência de floculação nas amostras de leite avaliadas, distribuídas de acordo com a estação. Nas estações verão e outono foram

verificados os menores teores de citrato no leite (respectivamente, 147mg/100mL e 164mg/100mL), fato que pode ter contribuído para menor estabilidade do leite ao etanol na prova do alizarol. No inverno foi obtido o menor percentual de floculação das amostras, estação que apresentou a maior média da concentração de citrato no leite (182mg/100mL).

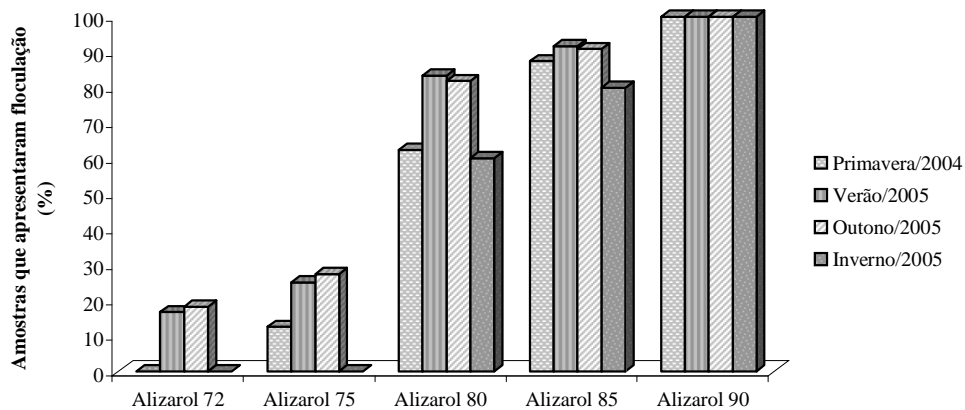


Figura 9. Frequência de floculação na prova do alizarol nas concentrações de 72, 75, 80, 85 e 90% por estação, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

De acordo com a intensidade de floculação na prova do alizarol, foi atribuído um escore (Tab. 1). Todas as amostras que apresentaram floculação após a mistura com alizarol contendo álcool em concentrações de 72 e 75%, apresentaram apenas floculação leve (escore 1). O escore 2 começou a ocorrer a partir das concentrações de álcool a 80%, sendo que, nesta concentração, 30% das amostras apresentaram grau de floculação moderado. Já o escore 3, ocorreu somente nas

concentrações de 85 e 90% do alizarol, correspondendo, respectivamente, a 17 e 54% dos resultados obtidos nestas concentrações (Fig. 10). Segundo Horne (1992), o álcool promove a desidratação das caseínas e redução da constante dielétrica para níveis que induzem sua desestabilização e coagulação. Conforme observado, o efeito do álcool sobre as caseínas é proporcional à concentração do mesmo, ou seja, quanto mais concentrado, maior a ocorrência de floculação protéica.

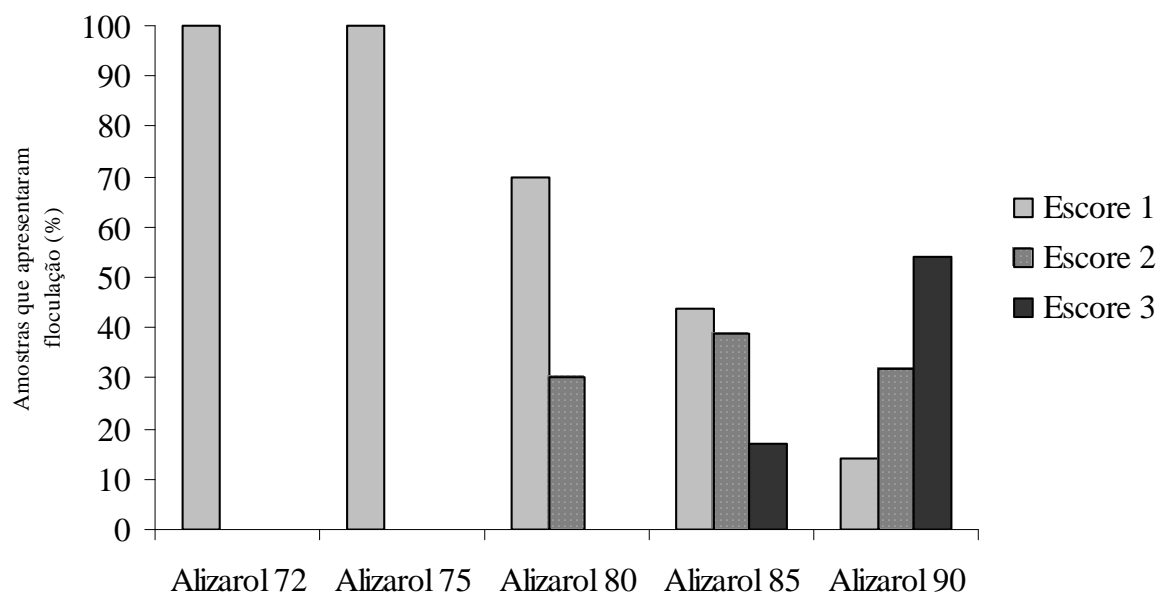


Figura 10. Frequência da intensidade de floculação medida em escores 1, 2 e 3, referente à prova do alizarol nas concentrações de álcool a 72, 75, 80, 85 e 90%, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.3.4 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os dados médios obtidos das análises de composição centesimal de 41 amostras de leite cru, provenientes de duas fazendas na

região metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005, foram condensados na Tab. 7. Os valores médios são seguidos de seus respectivos desvios-padrão, coeficiente de variação (CV), assimetria e curtose.

Tabela 7. Dados médios obtidos nas análises de composição centesimal de 41 amostras de leite cru refrigerado obtido em tanques de expansão, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Análise	Média Geral \pm Desvio	CV	Assimetria	Curtose
MACROCOMPONENTES				
Gordura (g/100g)	3,68 \pm 0,26	0,07	-0,8	-0,1
Proteína (g/100g)	3,04 \pm 0,14	0,04	-0,51	0,99
Lactose (g/100g)	4,42 \pm 0,13	0,03	0,36	0,11
ST (g/100g)	12,08 \pm 0,26	0,02	0,09	-0,32
SNG (g/100g)	8,4 \pm 0,16	0,02	0,44	-0,57
MICROCOMPONENTES				
Uréia (mg/100 mL)	14,53 \pm 3,1	0,21	-0,05	-0,78
Citrato MPA (mg/100 mL)	165 \pm 25	0,15	0,07	-0,41
Citrato Kit (mg/100 mL)	139 \pm 23	0,16	-0,9	1,03

ST= sólidos totais; SNG= sólidos não gordurosos; CV= coeficiente de variação

Na Tab. 7, observa-se que, entre os macrocomponentes do leite, os que apresentaram os teores com a menor variação em relação à média foram lactose e proteína, e o de maior variação foi a gordura. Estes resultados coadunam com os encontrados por outros autores (Santos et al., 1981; Auldist et al., 1998; Cerqueira et al., 1999a; Hamann, 2002; Brito et al., 2003; Dürr, 2003; Machado et al., 2003; Bueno, 2004; Fonseca, 2005).

O teor médio de lactose encontrado neste trabalho ($4,42 \pm 0,13\text{g}/100\text{g}$) (Tab. 7) foi ligeiramente inferior ao relatado por Fonseca (2005), que foi $4,51 \pm 0,12\text{g}/100\text{g}$. De acordo com Harding (1995), os teores de lactose relatados na literatura encontram-se entre 4,8 e $4,9\text{g}/100\text{g}$. Possivelmente os teores médios de lactose deste trabalho foram baixos em relação aos descritos na literatura devido à comparação com resultados obtidos por meio de diferentes técnicas e diferentes tipos de padrão de lactose utilizados. A lactose tradicionalmente é obtida por diferença calculada a partir do teor de outros componentes. Além disso, em diferentes técnicas analíticas, a lactose utilizada pode ser diferente (mono-hidratada, anidra). Outro aspecto importante é quanto à necessidade de se obter amostras-padrão nacionais utilizando-se como referência os rebanhos brasileiros.

Os teores de uréia encontrados variaram de $8,2\text{mg}/100\text{mL}$ até $20,5\text{mg}/100\text{mL}$, com média de $14,5\text{mg}/100\text{mL} \pm 3,1\text{mg}/100\text{mL}$. Estes valores são semelhantes aos relatados por Walstra e Jenness (1984) que consideraram normais teores de uréia de 8,4 a $28,0\text{mg}/100\text{mL}$. Por outro lado, Wolfschoon-Pombo e Lima (1983), analisando amostras de leite na região de Juiz de Fora - Minas Gerais, obtiveram valores entre 18 e $28\text{mg}/100\text{mL}$.

Por ser a uréia um componente estreitamente relacionado aos componentes administrados na dieta, principalmente em relação ao teor de proteína, esta apresentar-se-á sujeita a variações entre regiões, ou até mesmo entre propriedades, que adotam programa nutricional diferenciado (Wolfschoon-Pombo e Lima, 1983). Não houve diferença estatisticamente significativa no teor de uréia entre as duas fazendas estudadas, fato esperado devido à semelhança nas dietas fornecidas, já que o concentrado fornecido nas duas propriedades foi basicamente o mesmo durante o período do experimento.

Para a determinação dos teores de citrato no leite foram utilizados os métodos piridina acética (MPA) e kit enzimático (Kit). Apesar de apresentarem CV e desvios semelhantes, houve diferença entre os valores médios de citrato detectado por cada método, $165\text{mg}/100\text{mL}$ para MPA e $139\text{mg}/100\text{mL}$ para Kit (Tab. 7). A diferença percentual média do método MPA para o Kit foi de aproximadamente 15% a menos. Provavelmente esta diferença ocorreu por terem sido utilizados filtrados diferentes para cada método. O kit exige uma diluição do leite para análise de 10 vezes e pH final de 8,0 (Anexo 1), enquanto que para o método MPA, a diluição final do leite foi de 1:20, e o pH muito baixo de aproximadamente 1,0. Portanto, as condições exigidas para o filtrado em cada método foram distintas.

Os teores médios de citrato encontrados neste experimento, $165 \pm 25\text{mg}/100\text{mL}$, foram inferiores aos relatados por Jenness e Patton (1959), Walstra e Jenness (1984), Fox (1991), que citam o valor de $175\text{mg}/100\text{mL}$. Porém, Silva (2004), em trabalho realizado no Brasil, nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, verificou teores médios de citrato em leite cru na estação seca de respectivamente, 163,

160 e 193mg/100mL, e, na estação chuvosa, de 157, 154 e 168mg/100mL. Este autor encontrou diferenças significativas nos teores de citrato no leite cru entre os estados e entre as estações (seca e chuva), atribuindo este resultado às diferenças de condições climáticas, manejo alimentar, manejo reprodutivo e diferenças raciais entre os rebanhos. Os dados médios dos teores de citrato obtidos neste experimento (165mg/100mL) são consoantes com os encontrados por Silva (2004) nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, porém são inferiores ao do estado de Goiás. Estes dados reforçam que a variação nos teores de citrato no leite seja influenciada por diversos fatores, dentre os quais, de acordo com Fox (1991), a alimentação é o fator preponderante.

4.3.4.1 VARIACÕES NA COMPOSIÇÃO DE ACORDO COM O NÚMERO DE ORDENHAS NO TANQUE

Os teores médios de gordura foram maiores no leite proveniente de tanques contendo duas (3,58g/100g) ou quatro ordenhas (3,78g/100g), quando comparados ao leite obtido da ordenha matinal (3,33g/100g) (Tab. 8). Isto ocorreu porque na ordenha da manhã o volume de produção é maior, devido ao maior intervalo entre a ordenha da tarde e a ordenha da manhã seguinte (14 horas), fato que se reflete proporcionalmente

em menores teores de gordura (Harding, 1995).

O teor médio de sólidos totais também variou de acordo com o número de ordenhas contido no tanque. Houve uma elevação dos teores com o aumento do número de ordenhas, sendo estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) entre os tanques contendo uma ordenha da manhã (11,83g/100g) e quatro ordenhas seguidas (12,16g/100g). Os dados de CCS (média geométrica) também diferiram entre as amostras de leite do tanque correspondendo a uma ordenha (manhã) (equivale a 178.000 células/mL) e as amostras correspondendo a quatro ordenhas no tanque (equivale a 288.000 células/mL), apresentando a mesma tendência para o teor médio de sólidos totais. A comparação destas médias pode ser visualizada na Tab. 8.

A média geométrica da CCS diferiu de acordo com o número de ordenhas contido no tanque, seguindo a tendência observada para os ST e para a gordura. As CCS mais elevadas ocorreram quando o número de ordenhas no tanque era igual a quatro, e a menor contagem ocorreu no volume de leite correspondente a uma ordenha (Tab. 8). Fato este que pode ser atribuído às pequenas variações que ocorrem na composição do leite obtido na ordenha da manhã em relação à da tarde, decorrente de maior ou menor intervalo de tempo entre as ordenhas.

Tabela 8. Teores médios de gordura, sólidos totais e CCS de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

N° de Ordenhas	N° de Observações	Gordura** (g/100g)	Sólidos Totais** (g/100g)	CCS* (células/mL) (média geométrica)
1	7	3,33 ^b	11,83 ^b	178.000 ^b
2	4	3,58 ^a	11,98 ^{ab}	240.000 ^{ab}
4	30	3,78 ^a	12,16 ^a	288.000 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes pelo teste de SNK. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$)

4.3.4.2 VARIAÇÕES NA COMPOSIÇÃO POR FAZENDA

Comparando-se os resultados das análises dos componentes do leite entre as duas fazendas estudadas, verificou-se que os teores médios de proteína, SNG e citrato

foram diferentes ($p \leq 0,01$) entre as fazendas estudadas (Tab. 9). Os teores de proteína e SNG do leite da fazenda 2 foram, em média, maiores, respectivamente, 0,11 g/100g (3,6% maior) e 0,20 g/100g (2,4% maior), em relação à fazenda 1.

Tabela 9. Teores médios de proteína, SNG e citrato do leite cru obtido em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Fazenda	Proteína** (g/100g)	SNG** (g/100g)	Citrato** (mg/100 mL)
1	2,99	8,30	175
2	3,10	8,50	154
Diferença	-0,11	-0,20	21

Teste t-student, ** Os teores destes componentes foi diferente entre as duas fazendas ($p \leq 0,01$)

Quanto aos teores de citrato, a fazenda 1 apresentou teores médios mais elevados (175mg/100mL) em relação à fazenda 2 (154mg/100mL) ($p \leq 0,05$), ou seja, a fazenda 1 apresentou média de teor de citrato 12% maior em relação à média da fazenda 2, o que, em valor absoluto, equivale a 21mg/100mL de citrato.

Silva (2004) mostrou haver influências regionais e sazonais nos teores de citrato do leite, atribuindo a isto os fatores que influenciam os teores de sais no leite. Dentre estes, de acordo com Fox (1991), estão as diferenças entre raças, estágio de lactação e alimentação, sendo a alimentação considerada o fator mais relevante para a variação dos teores de citrato no leite. Considerando-se os fatores citados por Fox (1991), a diferença nos teores de citrato entre as duas fazendas pode estar relacionado à variedade, qualidade e quantidade da forragem fornecida aos animais, uma vez que o concentrado utilizado nas duas propriedades foi o mesmo (Quadros 4 e 5). Faulkner e Peaker (1982) citaram que as variações sazonais nos teores de citrato no leite ocorrem principalmente

devido a modificações na dieta, que por sua vez, estão relacionadas às alterações nutricionais do pasto ao longo do ano.

4.3.4.3 VARIAÇÕES DA COMPOSIÇÃO DE ACORDO COM A ESTAÇÃO

Devido ao aumento do preço do litro de leite pago ao produtor na entressafra (outono e inverno), nas fazendas estudadas foram realizadas modificações no manejo reprodutivo e nutricional dos rebanhos para concentrar os partos nos meses de março, abril e maio, resultando em aumento do volume de leite produzido nas estações do outono e, principalmente, inverno. Outra estratégia realizada foi a manipulação da dieta das vacas, a base de silagem e concentrado, para aumentar o volume de leite produzido. Os teores de gordura e de sólidos totais mais altos podem ser atribuídos à dieta de melhor qualidade fornecida aos animais neste período. Os teores de gordura e de sólidos totais apresentaram níveis crescentes do período da primavera até o inverno (Tab. 10).

Tabela 10. Teores médios de gordura, sólidos totais, lactose, citrato e uréia de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005, de acordo com a estação do ano.

Estação	Nº de Observações	Gordura ^{1**} (g/100g)	Sólidos Totais ^{1**} (g/100g)	Lactose ^{1*} (g/100g)	Citrato ^{2**} (mg/100 mL)	Uréia ^{2**} (mg/100 mL)
Primavera/2004	8	3,31 ^c	11,78 ^c	4,50 ^a	171 ^a	11,82 ^b
Verão/2005	12	3,68 ^b	12,01 ^b	4,34 ^b	147 ^b	15,79 ^a
Outono/2005	11	3,75 ^b	12,11 ^b	4,40 ^{ab}	164 ^{ab}	12,40 ^b
Inverno/2005	10	3,92 ^a	12,38 ^a	4,47 ^{ab}	182 ^a	17,54 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam valores estatisticamente diferentes pelos testes de ¹SNK e ²Duncan, *(p≤0,05), ***(p≤0,01)

Verificou-se neste experimento que o teor médio de lactose foi menor no verão, em relação às demais estações, possivelmente devido à maior ocorrência de mastite clínica nos animais nesta estação (Fig. 8), que coincide com o período das chuvas (Fig. 3) e, portanto, traduz-se como uma época de maior susceptibilidade devido a condições ambientais favoráveis à multiplicação microbiana (temperatura e umidade altas). A ocorrência de inflamação da glândula mamária leva a uma redução nos teores de lactose e conseqüente aumento de sais como o sódio e cloro, além da redução nas concentrações de potássio, cálcio e fósforo (Brito e Dias, 1998).

Com relação aos teores de uréia no leite, na comparação de médias por estação pelo teste de Duncan (p≤0,05), foi observado que na primavera estes foram equivalentes aos do outono, que por sua vez foram menores que os teores observados no verão e no inverno. A maior média ocorreu no inverno (Tab. 10).

Os teores médios de citrato também variaram por estação (Tab. 10). O menor teor ocorreu no verão, sendo estatisticamente igual (p>0,05) ao teor médio no outono. A maior média da concentração de citrato foi verificada no inverno, sendo estatisticamente igual (p>0,05) às médias da primavera e do outono. É provável que, apesar da maior

disponibilidade de forragens no verão (período chuvoso), os animais não tenham conseguido ingerir quantidades adequadas de forragens. Uma das causas de menor ingestão poderia ser o estresse térmico devido às altas temperaturas e umidade ambientais (Fig. 2). Este fato que pode ter contribuído para teores reduzidos de citrato no leite.

Confrontando-se os resultados do teor médio de citrato por estação aos da frequência de floculação na prova do alizarol, verificou-se que nas estações em que ocorreram os maiores teores de citrato, inverno e primavera, houve maior estabilidade à floculação na prova do alizarol. A estabilidade aumentada devido a maiores teores de citrato presente no leite já foi descrita por Fox (1991), Harwalkar (1997) e Silva (2004).

4.4 AVALIAÇÃO DAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A CCS média observada (média aritmética) foi de 285.000 ± 123.000 células/mL. Os resultados de CCS foram transformados matematicamente, utilizando-se a função logarítmica, por não apresentarem distribuição normal (Tab. 11). Estes dados compuseram as médias geométricas, que são obtidas por meio das médias dos logaritmos dos resultados. O uso de médias geométricas teve por objetivo aproximar a distribuição

dos dados a uma tendência de distribuição normal, minimizando o efeito de contagens

extremas sobre as médias mensais e por estação.

Tabela 11. Contagem de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Análise	Média Geral \pm Desvio	CV	Assimetria	Curtose
CCS/mL (média aritmética)	285.000 \pm 123.000	0,43	1,47	3,07
CCS/mL (média geométrica)	262.000	0,03	0,08	0,34

Os dados médios de CCS (média aritmética) encontrados neste trabalho (285.000 \pm 123.000 células/mL) foram inferiores aos valores encontrados por Machado et al. (1999) (641.000 \pm 767.000), Brito et al. (2003) (493.000 \pm 413.000), Bueno (2004) (348.000 \pm 273.000) e Fonseca (2005) (483.000 \pm 376.000). De acordo com Philpot e Nickerson (1992), nas contagens médias obtidas no presente experimento (285.000 células/mL), ainda não estariam sendo detectadas perdas significativas na produção de leite por presença de processo infeccioso na glândula mamária. Perdas na produção por alta CCS no leite de conjunto ocorreriam a partir de 200.000 células/mL, podendo ser detectadas acima de 500.000 células/mL. De acordo com Current... (1996), em rebanhos que apresentam CCS acima de 500.000 células/mL, inicialmente esta contagem levaria a perdas da ordem de 6%. Machado et al. (1999) concluem ainda que mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorrem a partir de 1.000.000 células/mL, para a gordura, e a partir de 500.000 células/mL para proteína e lactose.

As CCS obtidas neste trabalho atendem aos parâmetros estabelecidos pela IN51 (Brasil, 2002), que são de no máximo 1.000.000 células/mL. A contagem média de 262.000 células/mL, encontrada neste trabalho, atende inclusive aos requisitos de CCS que vigorarão a partir do ano de 2011 na Região Sudeste, que correspondem ao máximo de 400.000 células/mL.

Houve diferença estatisticamente significativa na CCS entre as duas fazendas sob estudo, sendo que a fazenda 1 apresentou maior média geométrica (equivalente a 309.000 células/mL) em relação à fazenda 2 (219.000 células/mL) (Tab. 12). A média geométrica encontrada refere-se, em resumo, à média dos logaritmos das CCS. Foi encontrada diferença estatística na CCS entre as duas fazendas (fazenda 1 apresentou CCS mais elevada em relação à fazenda 2), porém, na comparação das médias por estação (primavera, verão, outono e inverno), não foram verificadas variações significativas nos teores de CCS entre as estações do ano.

Tabela 12. Contagem de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Fazenda	Nº de Observações	CCS/mL (média geométrica)
1	22	309.000
2	19	219.000
Diferença	3	90.000*

*Diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Na variação média mensal da CCS das 41 amostras de leite cru analisadas, a menor contagem foi observada no mês de dezembro de 2004 e a maior contagem no mês de fevereiro de 2005 (Fig. 11). Ao serem relacionadas a CCS e a presença de resíduos de inibidores, foi verificado que no mês de dezembro de 2004 não houve amostras positivas nem suspeitas da presença de resíduos de inibidores. Enquanto que, no mês de fevereiro de 2005,

50% das amostras analisadas foram positivas e 14% suspeitas para a presença de resíduos de inibidores. Machado et al. (1999) ressaltaram que, quanto maior a CCS, maior a probabilidade de existência de resíduos de antibióticos no leite. Este fato pode ser relacionado ao tratamento de maior número de animais com mastite e maior utilização de antibióticos, sem respeitar o período de carência (Santos, 2004).

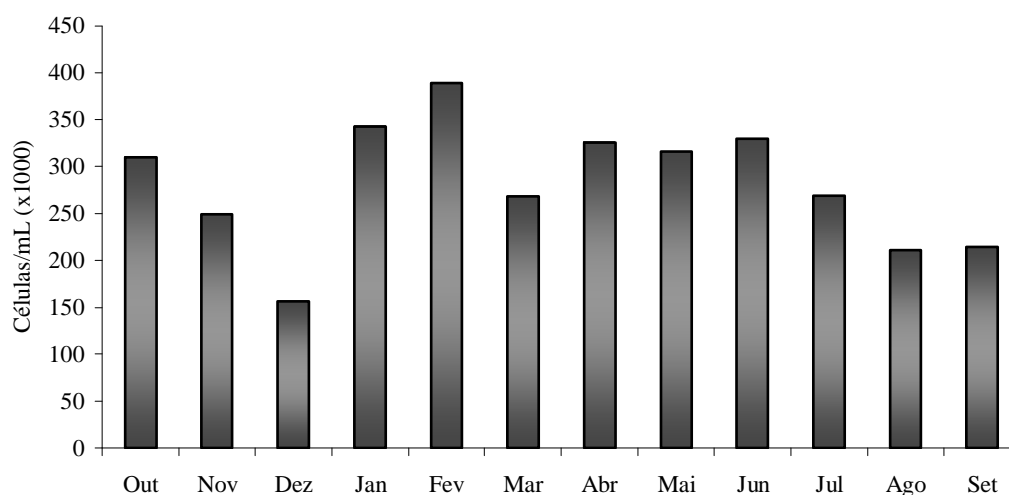


Figura 11. Variação média mensal das contagens de células somáticas de 41 amostras de leite cru obtidas em tanques refrigeradores de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte-MG, durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.5 DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Levando-se em consideração os requisitos estabelecidos na IN51/2002 (Quadro 1), a temperatura média do leite cru no tanque de refrigeração imediatamente antes das coletas da maior parte das amostras ($5,85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,75$) atendeu às exigências da legislação vigente. Ocorreram cinco registros da temperatura fora dos padrões, fato atribuído à realização

da coleta imediatamente após o término da ordenha, não permitindo que o leite atingisse a temperatura de resfriamento adequada.

A temperatura de estocagem do leite é relevante na manutenção da sua qualidade. Por ficar estocado na fazenda por um período de até 48 horas, a refrigeração adequada do leite cru é ponto crítico na qualidade deste, principalmente em relação à sua qualidade microbiana. A qualidade

microbiológica é reflexo da higiene de ordenha. Antes da maior difusão da granelização, o maior problema com relação à qualidade era a multiplicação de microrganismos mesófilos, que levavam à acidificação do leite. No entanto, com a granelização, o problema da qualidade higiênica da ordenha, aliado ao maior período de estocagem, contribuiu para a proliferação de outro grupo de microrganismos, os psicrotóxicos. Estes são capazes de se multiplicarem em temperaturas de refrigeração e, quando em concentrações superiores a 1×10^6 UFC/mL, produzem enzimas lipases e proteases. As células vegetativas dos microrganismos

psicrotóxicos são eliminadas com o tratamento térmico, porém, suas enzimas são termorresistentes, mantendo atividade após o mesmo (Cousin, 1982; Cox, 1993; Harding, 1995; Pereira Júnior, 2002).

As contagens de microrganismos mesófilos tiveram média geométrica equivalente a 49.000 UFC/mL, e média aritmética de 544.000 UFC/mL (Tab. 13), apresentando-se dentro dos padrões exigidos pela legislação (Quadro 1). No entanto, cinco amostras (12%) apresentaram contagens acima do permitido pela legislação, que é no máximo 1×10^6 UFC/mL.

Tabela 13. Dados médios das análises microbiológicas de 41 amostras de leite cru refrigerado obtido em duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Análise	Média Geral (UFC/mL)	CV	Assimetria	Curtose
MÉDIA ARITMÉTICA				
Mesófilos	544.000 ± 1.652.180	3,04	5,44	32,15
Psicrotóxicos	446.000 ± 817.253	1,83	1,86	2,39
Contagem bacteriana*	179.000 ± 361.516	2,02	3,13	10,03
MÉDIA GEOMÉTRICA				
Mesófilos	49.000	0,22	0,35	-1,04
Psicrotóxicos	13.000	0,40	-0,02	-1,47
Contagem bacteriana*	36.000	0,19	0,14	-0,94

* metodologia eletrônica

As contagens de microrganismos psicrotóxicos apresentaram média geométrica equivalente a 13.000 UFC/mL e média aritmética de 446.000 UFC/mL (Tab. 13). Oito amostras (21,6%) apresentaram contagens acima de 1×10^6 UFC/mL, sendo todas provenientes da fazenda 1. Estas contagens elevadas ocorreram seguidamente, podendo indicar falhas no processo de obtenção higiênica do leite e/ou problemas na higienização dos equipamentos. A contagem de microrganismos psicrotóxicos no leite cru ainda não é exigência da Instrução Normativa n.51/2002. Este grupo de microrganismos constitui indicador da

qualidade higiênica e do período de armazenagem do leite cru sob refrigeração. Altas contagens determinam menor rendimento e vida de prateleira reduzida do produto (Pereira Júnior, 2002). Ressalta-se a importância da inclusão deste grupo de microrganismos nos requisitos microbiológicos legais.

A contagem bacteriana total, realizada pelo método de citometria de fluxo, obteve média geométrica de 36.000 UFC/mL e média aritmética de 179.000 UFC/mL (Tab. 13), apresentando-se dentro dos padrões exigidos pela legislação, em relação à contagem de microrganismos mesófilos (Quadro 1). Duas

amostras (5%) apresentaram contagens acima do permitido pela legislação, que é no máximo 1×10^6 UFC/mL.

A fazenda 1 apresentou maiores médias, em relação à fazenda 2, das contagens de mesófilos, psicotróficos e CBT (Fig. 12). Cerqueira et al. (1999a) ressaltaram que a qualidade microbiológica do leite cru resulta de um conjunto de fatores como a saúde da glândula mamária, as condições de manejo do rebanho, a higiene na obtenção do leite, da sala e dos equipamentos e utensílios de ordenha, o estado de saúde do ordenhador e

as condições de estocagem e transporte do leite enviado à indústria. Todos estes fatores podem ter contribuído, em grau variável, para os resultados obtidos. Existem diferenças nas instalações da sala de ordenha da fazenda 2 (em fosso) em relação à fazenda 1 (sem fosso). Além de diferenças no sistema de higienização dos equipamentos conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Estes dois fatores podem ter sido determinantes nas diferenças microbiológicas observadas, podendo estar relacionados às falhas nos procedimentos de limpeza e higienização.

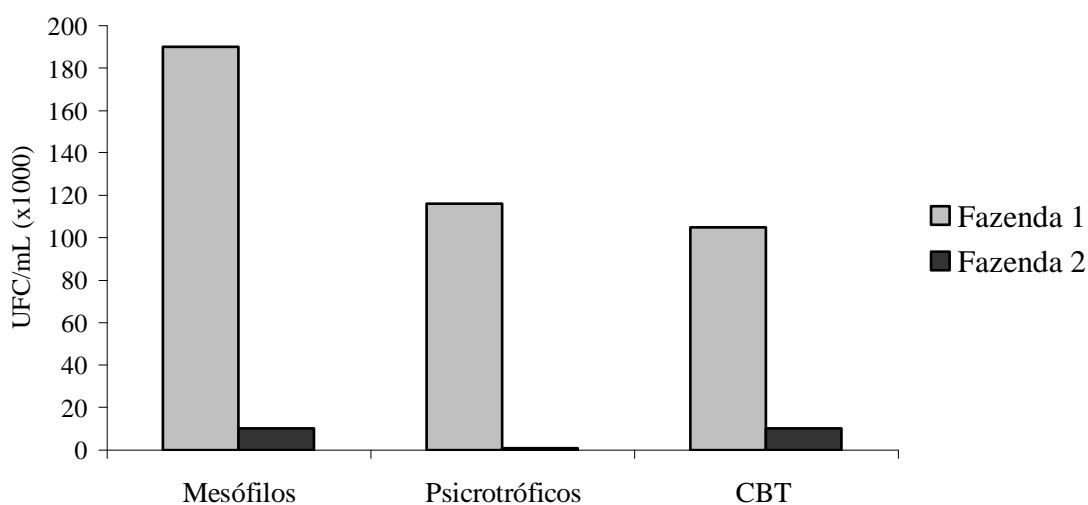


Figura 12. Médias geométricas das contagens de microrganismos mesófilos, psicotróficos e CBT do leite cru refrigerado, em UFC/mL, obtido em duas fazendas, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Na comparação de médias geométricas por estação foi verificada a mesma tendência entre as contagens dos microrganismos mesófilos e psicotróficos. As estações com as maiores contagens foram a primavera, o verão e o outono, não tendo ocorrido diferença estatística entre elas ($p > 0,05$). A menor contagem média foi verificada no

inverno (Fig. 13). Existem duas prováveis explicações para a redução nas contagens de microrganismos observadas durante o período avaliado. O trabalho foi iniciado na estação quente e úmida e terminou durante a estação seca com temperaturas amenas. Este fato pode ter contribuído para valores mais elevados das contagens de microrganismos

mesófilos e psicrotróficos no início do experimento e menores no final.

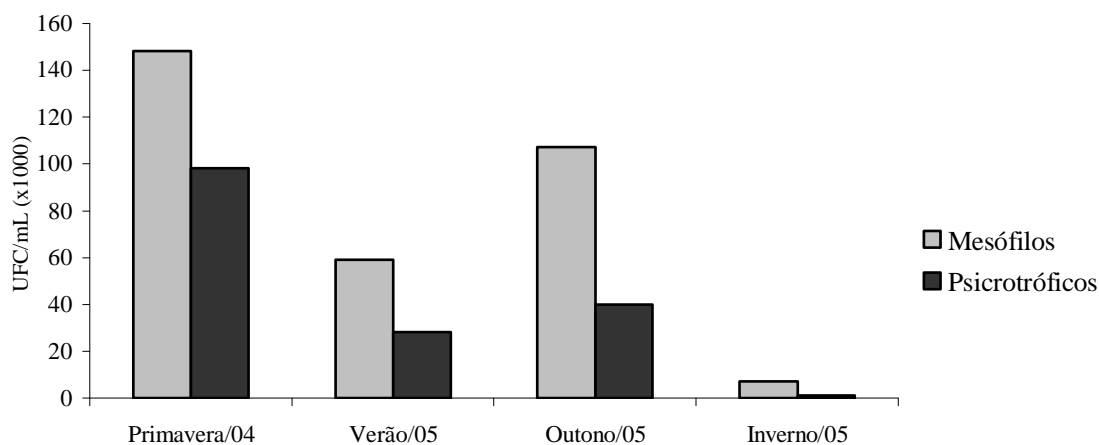


Figura 13. Distribuição por estação das contagens médias de microrganismos mesófilos e psicrotróficos em duas fazendas no período de outubro de 2004 a setembro de 2005. Os valores em UFC/mL equivalem as médias geométricas obtidas.

4.5.1 COMPARAÇÃO ENTRE CBT E CONTAGENS MICROBIANAS POR MÉTODOS TRADICIONAIS

A comparação pareada da contagem bacteriana total (CBT) (contagem eletrônica) com a contagem padrão em placas de mesófilos e psicrotróficos (média geométrica e aritmética) foi realizada utilizando-se o teste t. Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a CBT e a contagem de psicrotróficos, sendo que a CBT foi equivalente à contagem de mesófilos ($p \leq 0,05$).

Considerando-se a atual legislação, que exige apenas a contagem de microrganismos mesófilos, e de acordo com o encontrado neste experimento, a estimativa da contagem bacteriana de mesófilos com equipamento baseado em metodologia de citometria de fluxo fornece resultados consoantes com a exigência legal. Este tipo de equipamento é utilizado no LabUFMG, pertencente à Rede

Brasileira de Laboratório de Análise da Qualidade do Leite. Este é um achado importante, pois somente a capacidade de análise eletrônica é capaz de atender à demanda analítica requerida atualmente.

No leite cru obtido em boas condições de higiene, a população microbiana contém aproximadamente 90% de bactérias mesofílicas, enquanto que a população de microrganismos psicrotróficos corresponde a aproximadamente 10% da microbiota total. Porém, em condições higiênicas deficientes, os microrganismos psicrotróficos podem atingir 75% ou mais da microbiota do leite (Cousin, 1982). A contagem de microrganismos mesófilos em leite cru é contemplada na atual legislação brasileira. Entretanto, as condições inadequadas de obtenção, higiene precária do leite e período prolongado de estocagem sob refrigeração favorecem a multiplicação dos microrganismos psicrotróficos.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

Ambos os testes utilizados no presente experimento têm como princípio de funcionamento a inibição microbiológica, utilizando esporos do *Bacillus stearotherophilus* var. *calidolactis* C953. Esta cepa é muito sensível a muitos antibióticos, em especial a penicilina e outros componentes β -lactâmicos. Em presença de nutrientes selecionados, temperatura de 64 °C ($\pm 0,5$ °C) e período de incubação de até 3 horas, ocorrem

germinação e multiplicação dos esporos com a formação de ácido. Em quantidades suficientes de ácido formado, a cor do indicador de meio muda de púrpura para amarela. Em caso de presença de inibidores em concentrações superiores aos limites de detecção dos kits (Tab. 14), não haverá mudança de coloração do meio, que permanecerá púrpura, por não haver multiplicação dos microrganismos ali presentes. Quando as concentrações dos inibidores estiverem próximas ao limite de detecção, a coloração final estará entre púrpura e amarelo (Hotta, 2003).

Tabela 14. Limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos no leite estabelecidos pela legislação brasileira e limites de detecção dos kits utilizados neste experimento (partes por bilhão - ppb).

ANTIBIÓTICO	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	COPAN (ATK PeS microplate)	DELVOTEST P* (3h)
Penicilina G	4,0	2,5	3
Ampicilina	4,0	4,0	8-10
Amoxicilina	4,0	3,5	15-20
Tetraciclina	100	200-300	300
Oxitetraciclina	100	250-300	250-300
Clortetraciclina	100	300-400	150
Gentamicina	NE	250-350	1.000-5.000

NE: não estabelecido

Fonte: Brasil (1999); *Material técnico Delvotest P fornecido pela Global Food (Anexo 4) e Manual de procedimentos Copan (Anexo 3)

Em relação aos testes qualitativos de inibição microbiana, ao confrontar os limites de detecção de cada teste utilizado com os limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pela legislação para resíduos de antimicrobianos (Tab. 14), verificou-se que ambos não atendem de modo coerente os LMRs estabelecidos pela legislação brasileira. Para a maior parte dos antimicrobianos, os testes começam a detectar concentrações acima dos LMRs estabelecidos pela legislação, podendo incorrer na atribuição de resultados falso-negativos. Outro problema é a detecção pelos kits de concentrações inferiores às permitidas pela legislação, como no caso da penicilina G, podendo ocorrer resultados falso-violativos. O ideal seria o desenvolvimento de um teste que tivesse

como limite de sensibilidade, os valores dos LMRs estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 1999). Desta forma, os atuais problemas gerados pelos resultados falso-negativo e falso violativo seriam sanados. Ressalta-se aqui a baixa sensibilidade destes dois kits de inibição microbiológica na detecção de resíduos de tetraciclina.

No total de 41 amostras, foi encontrada uma frequência de 9,8% de amostras positivas e 17,1% de amostras suspeitas à contaminação por inibidores microbianos no leite cru, nas duas fazendas estudadas, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005. Na fazenda 1, a frequência de amostras positivas foi maior (13,6%) em relação à fazenda 2 (5,3%) (Tab. 15). Estes resultados

podem indicar que na fazenda 2 o período de descarte do leite dos animais em terapia foi “seguido” com maior rigor que na fazenda 1.

As possíveis explicações para a presença de resíduos de antibióticos no leite são o uso

Tabela 15. Resultados positivos nos testes de resíduos de inibidores, utilizando-se os kits Copan e Delvotest, em 41 amostras de leite cru provenientes de duas fazendas da Região Metropolitana de Belo Horizonte, no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

Fazenda	Nº Amostras	COPAN® (%)	DELVOTEST® (%)	Resíduos de Antimicrobianos (%)
1	22	9,1	9,1	13,6
2	19	5,3	0	5,3
Total	41	7,3	4,9	9,8

Em leite com elevada CCS, a probabilidade de existência de resíduos de antibióticos no leite é maior (Machado et al., 1999), podendo ser relacionada ao tratamento de maior número de animais com mastite e maior utilização de antibióticos, sem respeitar os períodos de carência para descarte do leite (Santos, 2001; citado por Hotta, 2003). Portanto, a maior frequência de amostras positivas para inibidores microbianos no leite da fazenda 1 (13,6%), pode ser relacionada à maior CCS média no leite desta propriedade (Tab. 12) e à falta de rigor no cumprimento dos períodos de carência para descarte do leite.

As 41 amostras, 22 provenientes da fazenda 1 e 19 da fazenda 2, foram testadas com os kits de inibição microbiológica Copan® e Delvotest®. Por estes kits apresentarem limites de detecção diferenciados para alguns antibióticos (Tab. 14), foram considerados como contendo resíduos de antimicrobianos as amostras que apresentaram resultados positivos nos dois kits em conjunto (Tab. 15).

A frequência de positividade (9,8%) encontrada neste trabalho foi maior que a encontrada por Costa et al. (2002), que ao avaliarem a presença de resíduos de antimicrobianos no leite de tanque em rebanhos paulistas detectaram 6,9% de positividade. Em contrapartida, Hotta (2003)

indiscriminado de antibióticos, o não cumprimento do período de carência dos medicamentos, além da falta de informação dos funcionários.

encontrou 21% de amostra positivas em leite de tanque de 200 propriedades do estado de Minas Gerais. Lopes et al. (2002) detectaram incidência de 25,6% de resíduos de antimicrobianos, em 320 amostras de leite produzido na região metropolitana de Curitiba-PR.

Considerando-se que o leite cru é a matéria-prima para a produção não só de leite fluido, mas também de ampla gama de derivados lácteos, é de grande relevância monitorar a qualidade do leite cru, que deverá estar livre de resíduos de antimicrobianos. Gallina (1997) ressalta que os tratamentos térmicos usualmente empregados pelas indústrias de laticínios não inativam totalmente os resíduos de antimicrobianos.

Ao analisar os resultados percentuais por estação, verificou-se que a presença dos resíduos de inibidores microbianos ocorreu somente na primavera e no verão (Fig.14). Este período coincidiu com o período das chuvas (Fig.3), e também a maior ocorrência de casos de mastite nos rebanhos (Fig.8). Ou seja, maior número de animais afetados e em tratamento. Na fazenda 2 a maior ocorrência de mastite ocorreu no mês de maio de 2005 (Fig.6), fato provavelmente desencadeado pela má qualidade das borrachas das teteiras e desregulagem do vácuo. A realização da manutenção do equipamento de ordenha com a troca das borrachas no final do mês de

junho contribuiu de maneira positiva na redução dos casos clínicos no inverno.

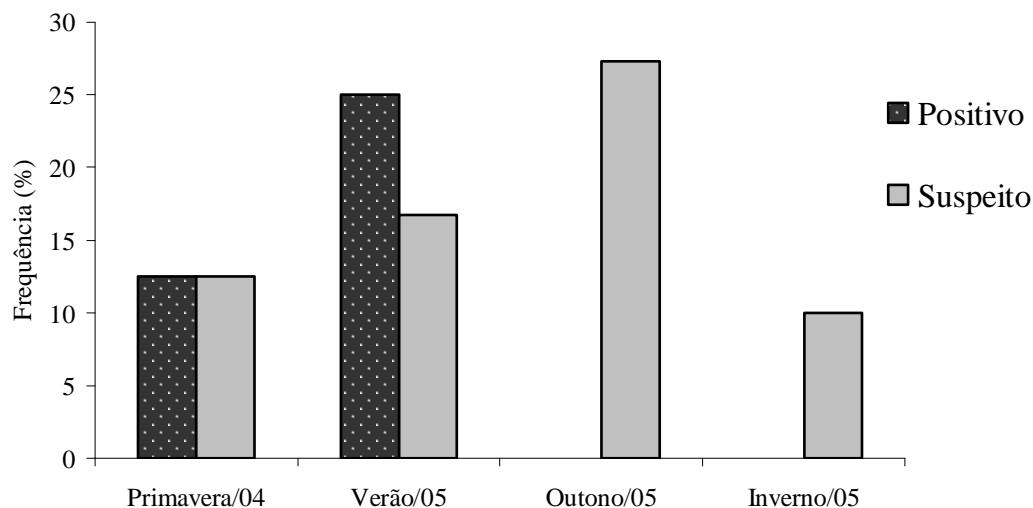


Figura 14. Frequência da detecção de resíduos de inibidores microbianos, distribuída por estação, em 41 amostras de leite cru provenientes de duas fazendas, utilizando-se os testes Copan[®] e Delvotest[®], no período de outubro de 2004 a setembro de 2005.

4.7 CORRELAÇÕES

Houve correlação negativa (-0,372), ($p \leq 0,05$), entre o pH e a acidez. Esta correlação pode ser explicada pelo fato que a menores valores de pH geralmente são correlacionados maiores, de acidez, mesmo considerando-se a acidez natural do leite. A acidez natural ocorre devido à presença de citratos, fosfatos, proteínas e outros componentes ácidos menores. Desta forma, a acidez titulável não é uma medida somente da presença de ácido láctico (acidez adquirida), mas também da acidez natural do leite (Santos, 2004). A acidez titulável consiste na medida da neutralização das moléculas ácidas do leite, utilizando-se solução alcalina para titulação.

Foi encontrada correlação positiva significativa ($p \leq 0,05$) entre a floculação à prova do alizarol e a CCS, indicando que quanto maior a CCS de um leite, maior a instabilidade deste na prova do alizarol. Provavelmente isto ocorre devido à elevação na CCS ser acompanhada por alterações no balanceamento de gordura, proteínas, lactose e sais (Kitchen, 1981; Pereira et al., 1997; Machado et al., 1999; Schäellibaum, 2000). Também ocorrem mudanças como o aumento dos teores das proteínas do soro, das proteases derivadas dos leucócitos e maior atividade da plasmina (Alslam e Huley, 1996, citado por Silva, 2004). Todos estes fatores podem contribuir para a redução da estabilidade do leite ao calor.

As correlações foram negativas ($p \leq 0,05$) entre os teores de lactose e a floculação pelo alizarol a 72% (-0,448) e 80% (-0,42), e entre os teores de SNG e o a floculação pelo alizarol a 72% (-0,337), 75% (-0,359), 80% (-0,604) e 85% (-0,391). A lactose, além de ser o constituinte cujo teor é um dos mais constantes no leite, representa também o de maior concentração nos sólidos do leite (Walstra e Jenness, 1984). O aumento dos teores de sais, principalmente dos íons sódio e cloretos, está correlacionado com a redução dos teores de lactose (Walstra e Jenness, 1984; Harding, 1995; Brito e Dias, 1998). Estas mudanças levam a alterações no equilíbrio salino do leite, refletindo na estabilidade térmica do mesmo, podendo explicar a correlação negativa observada neste experimento entre lactose e alizarol. Por ser a lactose o componente de maior proporção nos sólidos do leite, alterações no teor deste componente refletem no teor de SNG.

A lactose apresentou correlação negativa (-0,313) ($p \leq 0,05$) com o índice crioscópico. Esta correlação fundamenta-se no princípio de que o aumento da concentração de moléculas solúveis no leite (lactose) resulta em pontos de congelamentos menores, isto é, valores mais negativos.

Foi observada correlação positiva ($p \leq 0,01$) entre CCS e teores de gordura (0,427), e correlação negativa ($p \leq 0,05$) entre CCS e teores de lactose (-0,352) e entre CCS e teores de SNG (-0,596). Correlações semelhantes também foram encontradas por Pereira et al. (1997), Prada e Silva et al. (2000) e Fonseca (2005). A correlação negativa entre CCS e lactose ocorre porque a CCS aumentada leva à redução do teor de lactose do leite. Esta redução ocorre devido aos danos no tecido secretor da glândula mamária lesada que tem também seus sistemas enzimáticos alterados (Kitchen, 1981; Pereira et al., 1997; Schäellibaum, 2000). Estes fatores resultam em deficiências na síntese de lactose por dano

na célula secretora e por menor disponibilidade de glicose, o principal precursor da lactose. Por consequência, ocorre redução na produção de leite, pois o componente osmoticamente ativo do leite encontra-se reduzido (Kitchen, 1981). Por ser a lactose o componente sólido de maior teor nos sólidos do leite, a sua redução reflete na redução dos teores de SNG, esclarecendo a correlação negativa encontrada entre estes componentes.

Houve correlação positiva ($p \leq 0,01$) entre CBT e CCS (0,493). Correlação semelhante foi descrita por Gigante (2004) e Fonseca (2005). Tal correlação pode ser atribuída ao fato de que altas CBT indicam condições higiênicas deficientes no processo de ordenha, o que pode levar ao aumento da ocorrência de mastite e conseqüentemente à elevação das CCS. Adicionalmente, a microbiota responsável pela mastite no animal será estimada juntamente na contagem com microrganismos contaminantes externos.

5. CONCLUSÕES

As variações sazonais influenciaram a qualidade do leite cru refrigerado coletado em tanques de expansão.

Teores mais elevados de gordura e sólidos totais foram encontrados no inverno, estação em que os animais estavam confinados recebendo silagem e concentrado, que foi o período de melhor nutrição.

Menores teores de lactose foram encontrados no verão, coincidindo com maior valor percentual médio de ocorrência de mastite clínica nos rebanhos avaliados.

Menores contagens de células somáticas e maiores teores de citrato do leite foram determinantes no aumento da estabilidade do leite à floculação na prova do alizarol.

As menores CBT ocorreram na estação inverno devido às condições ambientais de menores temperaturas, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica. Condições estas desfavoráveis à multiplicação microbiana.

Houve equivalência entre a CBT (eletrônica) e a contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos.

A presença de resíduos de inibidores microbianos no leite ocorreu nas estações primavera e verão, provavelmente devido à maior ocorrência de mastite neste período (7,6 e 8,1%, respectivamente) e ao desrespeito ao período de carência dos medicamentos utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULDIST, M.J.; WALSH, B.J.; THOMPSON, N.A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zeland. *Journal of Dairy Research*, v.65, n.3, p.401-411, 1998.

BACTOCOUNT 150 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

BARROS, L.; DENIS, N.; NÚÑES, A. et al.. Variaciones de la leche y pruebas del alcohol. In: BUIATRICS CONGRESS, 21, 2000, Punta del Este, Uruguay. *Anais...*Punta del Este: [s.n.], 2000. 577p.

BENTLEY 2000 Operator's Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.

BLOCK, E. Nutrição de vacas leiteiras e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000. Curitiba. *Anais...*Curitiba: 2000. p. 85-88.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 de dez. 1999. Seção 1. p. 13.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 370 04/09/1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., n.172, 08 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 22 14/04/2003. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., 02 mai. 2003. Seção 1, p. 3-25.

BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P.et al.. Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. In: DIAGNÓSTICO da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.47-61.

BRITO, J.R.F; DIAS, J.C. *A qualidade do leite*. Juiz de Fora: Tortuga, 1998. 98 p.

BROUTIN, P. Individual bacteria counting in milk quality management. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo, 2004. (CDRoom)

BUENO, V.F. *Contagem celular somática e bacteriana total do leite refrigerado em tanques de expansão de uso individual no Estado de Goiás*. 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CARLSSON, J.; PEHRSON, B. The relationships between seasonal variations in the concentration of urea in bulk milk and the

- production and fertility of dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v.40. n.3, p.205-212, 1993.
- CERQUEIRA, M.M.O.P; SENA, M.J.; SOUZA, M.R. et al. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p.251-254, 1999 a.
- CERQUEIRA, M.M.O.P; SOUZA, M.R.; SENA, M.J. et al. Fatores determinantes na qualidade do leite – estudo de uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p. 241-245, 1999 b.
- CHEMSPEC 150: user's guide. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 17 p.
- COSTA, E.O.; RAIA, R.; GARINO, F. et al. Influence of mastitis on the persistence of the residues beyond the expected withholding and an evaluation of antibiotic residues on bulk tanks of brazilian dairy herds. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, n.2, 2002, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. 204 p.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, v.45, n.2, p. 172-207, 1982.
- COX, J.M. The significance of psychrotrophic Pseudomonas in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.48, n.2, p.108-113, 1993.
- CURRENT concepts of bovine mastitis. 4 ed., Madison: National Mastitis Council, 1996, 64p.
- DETERMINATION of milkfat, protein and lactose content in whole milk–Guide for the operation of mid-red instruments. *International IDF Standard*, n. 141B, 1996.
- DÜRR, J.W. Panorama da qualidade do leite na Região Sul (RG). In: DIAGNÓSTICO da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.2-17.
- EBERHART, R.J.; HUTCHINSON, L.J.; SPENCER, S.B. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *Journal of Food Protection*, v.45, n.12, p.1125-1128. 1982.
- ENUMERATION of microorganism in milk and milk products–colony count technique at 30°C. *International IDF Standard*, n. 100B, 1991a.
- ENUMERATION of psychrotrophic microorganism in milk–colony count technique at 6,5°C. *International IDF Standard*, n. 101A, 1991b.
- ENUMERATION of somatic cells in milk. *International IDF Standard*, n. 148A, 1995.
- ERNSTRAM, C.A.; ANIS, S.K. Properties of products from ultrafiltered whole milk. In: NEW dairy products via new technology. Atlanta: IDF, 1985. p.21-30.
- ESTATÍSTICAS do leite. 2005. Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 2005. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.com.br>>. Acesso em 17 de janeiro de 2006.
- FAULKNER, A.; PEAKER, M.. Reviews of the progress of dairy science: Secretion of citrate into milk. *Journal of Dairy Research*, v.49, n.1, p.159-169, 1982.
- FONSECA, C.S.P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores em Minas Gerais*. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M.R. Índice crioscópico do leite. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, n.13, p.73-83, 1995.
- FOX, P. F. *Food chemistry*: part III. Cork: Cork University College. 1991. 201p.

- FOX, P.F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation. *Journal of Dairy Science*, v.64, n.11, p.2127-2137, 1981.
- FOX, P.F.; NASH, B.M.; HORAN, T.J. et al. Effect of selected amides on heat-induced changes in milk. *Journal of Dairy Research*, v.47, n.2, p.211-319, 1980.
- GALLINA, D.A. *Avaliação de tratamentos térmicos industriais sobre resíduos inibidores presentes no leite utilizando o teste de inibição de iogurte*. 1997. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: O COMPROMISSO com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: UPF, 2004. p.235-254.
- GODDEN, S.M.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F. et al. Relationships between milk urea concentrations and nutritional management, production, and economic variables in Ontario dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.5, p.1128-1139, 2001.
- GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: SIMPÓSIO internacional sobre qualidade do leite, 2. Curitiba: Anais..., 2000. p.9-20.
- HAMANN, J. Relationships between somatic cell count and milk composition. *Bulletin of the International Dairy Federation (IDF)*, n.372, p.56-59, 2002.
- HARDING, F. *Milk quality*. London: Chapman & Hall, 1995. 166p.
- HARWALKAR, V. R. Age gelation of sterilized milks. In: *ADVANCED dairy chemistry*. London: Chapman & Hall, 1997. v. 1, p. 691-734.
- HORNE, D.S. Ethanol stability. In: *ADVANCED dairy chemistry*. London: Chapman & Hall, 1992. v.1, p.657-689.
- HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. 2. The origin of the pH transition. *Journal of Dairy Research*, v.48, n.2, p.285-291, 1981.
- HOTTA, J.M. *Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção*. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- IZCO, J.M.; TORMO, M.; HARRIS, A. et al. Optimization and validation of a rapid method to determine citrate and inorganic phosphate in milk by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.1, p.86-95, 2003.
- JENNESS, R.; PATTON, S. *Principles of dairy chemistry*. London: Chapman & Hall, 1959. 446p.
- MEASUREMENT of extraneous water by the freezing point test. *Bulletin International Dairy Federation*, n.154, p.1-20, 1983.
- JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.10, p.2681-2692, 1998.
- KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n.1, p. 167-188, 1981.
- LOPES, L.T.; GANDARA, A.L.N.; CRISTIANINI, M. Detecção de resíduos de antibiótico em leite comercializado na cidade de Campinas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.53, n.301-303, p.64-67, 1998.
- LOPES, M.O.; CARRARO, C.N.M.; VEIGA, D.R. et al. Levantamento do uso e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na região metropolitana de Curitiba-PR. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.57, n.327, p.233-235, 2002.
- MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D.; COLDEBELLA, A.; COELHO, K.O. Panorama da qualidade do leite na região Sudeste: São Paulo. In: *DIAGNÓSTICO da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.39-45.

- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIÉS, G.A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p.10-16, 1999.
- MANUAL de Procedimentos de coleta e envio de amostras para a análise da qualidade do leite – LabUFMG. Belo Horizonte: LabUFMG, 2004. 8p.
- McCRAE, C.H.; MUIR, D.D. Heat stability of milk. In: HEAT-induced changes in milk. 2.ed. Brussels: IDF, 1995. p.206-230.
- MOLINA, L.H.; GONZALEZ, R.; BRITO, C. et al. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.33, n.2, p. 233-240, 2001.
- MOLLER, S.; MATTHEW, C.; WILSON, G.F.. Pasture protein and soluble carbohydrate levels in spring dairy pasture and associations with cow performance. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.53, [s.n.], p.83-86, 1993.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Quebec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998. Curitiba. *Anais...* Curitiba: UFPR, 1998. p.40-43.
- MÜHLBACH, P. R. F. Nutrição da vaca em lactação e a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2003, Chapecó. *Anais...* Chapecó: Sociedade Catarinense de Médicos Veterinários –Núcleo Oeste. Disponível em: <<http://www.nucleovet.com.br/simposio.htm>>. Acesso em 20 de janeiro de 2006.
- PEREIRA JÚNIOR, F.N. *Comparação de métodos de enumeração e de estimativa de microrganismos psicrotóxicos em leite cru e avaliação do método de Moseley*. 2002. 36 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G.; SILVA, L.V.F. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. *Revista dos Criadores*, v.67, n.807, p. 19-21, 1997.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Mastitis: counter attack*. Naperville: Babson Bros. Co.,IL. 1992, 150p.
- PRADA E SILVA, L.F.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRIÉS, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite: II- lactose e sólidos totais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.4, p.330-333, 2000.
- PYNE, G.T.; McHENRY, K.A. The heat coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, v.22, n.1, p.60-68, 1955.
- REGULAMENTO da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília-DF: MAPA, 1980, 166p.
- REIS, R.B.; GLÓRIA, J.R.; VIEIRA, L.R.; FARIA, B.N. Manipulação da composição do leite pela nutrição da vaca. In: SIMPÓSIO DO AGRONEGÓCIO DO LEITE: PRODUÇÃO, GESTÃO E QUALIDADE, 1, 2004, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte, 2004. (CDRoom)
- RODRIGUES, R.; FONSECA, L.M.; SOUZA, M.R. Acidez do leite. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, n.13, p.63-72, 1995.
- ROSE, D. Factors affecting the heat stability of milk. *Journal of Dairy Science*, v.45, n.11, p.1305-1311, 1962.
- ROSELER, D.K.; FERGUSON, J.D.; SNIFFEN, C.J.; HERREMA, J. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.2, p.525-534, 1993.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 221 p.

- SANTOS, E.C.; HAJDENWURCEL, J.R.; VILELA, M.A.P. Influência sazonal na composição de alguns constituintes do leite da bacia leiteira de Juiz de Fora. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.36, n.219, p.3-9, 1981.
- SANTOS, M.V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo, 2004. (CDRoom)
- SCHÄELLIBAUM, M. Resíduos de antibióticos no leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000. Curitiba. *Anais...*Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000, p.89-94.
- SILVA, P.H.F. *Leite UHT*: fatores determinantes para sedimentação e gelificação. Juiz de Fora: Paulo Henrique Fonseca da Silva, 2004. 128p.
- SILVA, P.H.F.; ABREU, L.R. Estabilidade do leite ao etanol e ao calor: impacto nas indústrias de laticínios. In: SIMPÓSIO DO AGRONEGÓCIO DO LEITE: PRODUÇÃO, GESTÃO E QUALIDADE, 1, 2004, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte, 2004. (CDRoom)
- SILVA, P.H.F.; ALMEIDA, M.C.F. Estabilidade térmica do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.53, n.304, p.157-163, 1998.
- SILVEIRA, T.M.L. *Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino*. 2002. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SINGH, H.; LATHAM, J.M. Heat stability of milk: aggregation and dissociation of protein at ultra-high temperatures. *International Dairy Journal*, v.3, n.3, p.225-237, 1993.
- SINGH, H.; McCARTHY, O.J.; LUCEY, J.A. Physico-chemical properties of milk. In: ADVANCED dairy chemistry. London: Chapman & Hall, 1997. v.3, p.469-518.
- SOMACOUNT 300 Operator's Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.
- SOMMER, H.H.; BINNEY, T.H. A study of the factors that influence the coagulation of milk in the alcohol test. *Journal of Dairy Science*, v.6, n.6, p.176-197, 1923.
- SOMMER, H.H.; HART, E.B. The heat coagulation of milk. *Journal of Dairy Science*, v.5, n.6, p.525-543, 1922.
- SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J.; et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p.238-241, 1999.
- SPREER, E. *Lactologia industrial*. Zaragoza: Acribia. 1991. 617p.
- SPSS Advanced Statistics™ 7.0 update. Chicago: 1996. 166p.
- SWAISGOOD, H.E. Characteristics of milk. In: FOOD chemistry. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 841-878.
- TORRENT, J. Nitrogênio uréico no leite e qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000. Curitiba. *Anais...*Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000, p.27-29.
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Milk and milk products*. technology, chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 1994. 451p.
- VEISSEYRE, R. *Lactologia tecnica*: composicion, recogida, tratamiento y transformacion de la leche. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.
- WAITTIAUX, M.A. *Nutrição e Alimentação*. Madison: University of Wisconsin, 1998. 128p.
- WALDNER, D. N.; STOKES, S.R.; JORDAN, E.R.; LOOPER, M.L. Managing milk composition: normal sources of variation. OSU: Extension facts. 2004. Disponível em: www.ansi.okstate.edu/exten/dairy/ef-4016.html . Acessado em: 11 de maio de 2004.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y física lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1984. 423p.

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The determination of citric acid in milk and milk sera. *Journal of Dairy Research*, v.30, n.2, p.171-189, 1963.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; LIMA, A. Teor de uréia do leite fornecido no DPTA/ILCT. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.38, n.226, p.19-22, 1983.