



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INFLUÊNCIA DO
ARMAZENAMENTO DO LEITE EM
RESFRIADOR POR EXPANSÃO
DIRETA SOBRE A CONTAGEM DE
MICRO-ORGANISMOS E
ESTABILIDADE DA CASEÍNA.**

Natalia Luiza Machado Reche

Lages, 2013

NATALIA LUIZA MACHADO RECHE

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO DO LEITE EM
RESFRIADOR POR EXPANSÃO DIRETA SOBRE A
CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS E ESTABILIDADE DA
CASEÍNA.**

Dissertação apresentada à
Universidade do Estado de Santa
Catarina como parte das exigências
do programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler
Neto

**LAGES
2013**

R296i

Reche, Natália Luiza Machado

Influência do armazenamento do leite em resfriador por expansão direta sobre a contagem de micro-organismos e estabilidade da caseína. / Natália Luiza Machado Reche. - Lages, 2013.

91 p. : il. ; 21 cm

Orientador: André Thaler Neto

Bibliografia: 87-85p

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

1. Caseína. 2. Contagem de bactérias psicotróficas. 3. Instabilidade. 4. Proteólise. I. Reche, Natália Luiza Machado. II. Thaler Neto, André. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 637.1 - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/ UDESC

NATALIA LUIZA MACHADO RECHE

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO DO LEITE EM
RESFRIADOR POR EXPANSÃO DIRETA SOBRE A
CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS E ESTABILIDADE DA
CASEÍNA.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias,
da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. André Thaler Neto
CAV – UDESC

Membro: _____
Prof. Dra. Vivian Fischer
UFGRS

Membro: _____
Prof. Dra. Lídia Almeida
Picinin CAV – UDESC

Membro: _____
Dr. Heitor Daguer
Fiscal MAPA/ LANAGRO

Lages/SC, 28 / 11 / 2013

Dedico a minha família, em especial meu pai Luiz, por todo o apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelos pais maravilhosos e o irmão carinhoso a quem me destinou. Meus pais que sempre me apoiaram e acompanharam todas as etapas da minha vida. Em especial meu pai Luiz, o qual literalmente esteve presente nesse trabalho de pesquisa, participando de grande parte das coletas e acompanhando meu trabalho no laboratório. Meu marido Thiago por estar sempre disposto acompanhar meu trabalho e me fortalecer nos momentos difíceis, transmitindo tranquilidade nessa etapa da nossa vida. Junto ao marido ganhei uma sogrinha, Lene, a qual agradeço por ter me acolhido em um dos momentos mais complicados durante a pós-graduação.

Aos bons amigos conquistados, Leonardo Leite Cardozo, Nadine Felippus, Luana Pereira e Robson Lorenzetti, os quais perderam algumas horas de sono, estudo e lazer para contribuir ao sucesso desse trabalho.

A Loredana, a qual antes de ser tornar uma grande amiga, já obtinha minha admiração como professora. Obrigada por todo ensinamento, apoio, conselhos, amizade e pela co-orientação extra oficial.

Ao meu orientador André Thaler Neto, agradeço as horas de almoço, sono e privação do âmbito familiar dedicadas a docência e pesquisa, além da constante preocupação com bem estar todos seus pós graduandos, bolsistas e estagiários.

A todos demais colegas que de alguma forma contribuíram a esse trabalho, em especial ao grupo de pesquisa do professor André Thaler Neto, o qual demonstrou união nos trabalhos de pesquisa desenvolvidos.

Os produtores, os quais em sua maioria foram receptivos as visitas e a Flávio De Carli por intermediar o contato com os produtores da região Oeste.

O Instituto Federal Catarinense (IFC) por oferecer infraestrutura a pesquisa durante a etapa realizada na região Oeste Catarinense.

Ao laboratório Lanagro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por disponibilizar estrutura, em especial

a Heitor Daguer por me integrar a equipe do laboratório e ao colega Cristian Kleemann por contribuir pacientemente ao desenvolvimento da metodologia de quantificação da caseína.

A fundação de apoio a pesquisa de em Santa Catarina (FAPESC) pelos recursos financeiros aplicados na pesquisa e ao fundo de apoio à manutenção e ao desenvolvimento da educação superior (FUMDES) pela bolsa de pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música”.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

RECHE, Natália Luiza Machado. **Influência do armazenamento do leite em resfriador por expansão direta sobre a contagem de micro-organismos e estabilidade da caseína.** 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2013

O leite é um meio nutritivo facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens, com taxa de proliferação condicionada à capacidade do micro-organismo adaptar-se ao ambiente e do tempo disponível. Na propriedade rural o leite pode ser armazenado por até 48 horas em tanques de expansão direta modelo de duas ou quatro ordenhas, os quais diferem na capacidade de resfriamento a cada ordenha, respectivamente, esses equipamentos são capazes de resfriarem 50% e 25% de seu volume a cada ordenha. A conservação do leite sob resfriamento pode não ser suficiente para o controle de micro-organismos psicrotróficos, os quais apresentam atividade proteolítica sobre a caseína sem alterar a acidez do leite, podendo ser um fator desencadeador do leite instável não ácido (LINA). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tempo e temperatura de estocagem do leite cru em tanques de expansão direta modelos de duas e quatro ordenhas sobre a contagem bacteriana total (CBT) e contagem de bactérias psicrotróficas (CBP), assim como, determinar o efeito do tempo e da CBP sobre a estabilidade da caseína ao teste do álcool e a ocorrência de LINA. O experimento foi conduzido em 19 propriedades leiteiras localizadas nas regiões Serrana e Meio-oeste Catarinense, as quais possuíam equipamentos de refrigeração do leite por expansão direta modelo duas ou quatro ordenhas com taxa de ocupação de no mínimo 60%. Nas propriedades rurais foram avaliadas informações referentes ao intervalo de 36 horas entre a captação de leite a granel para a indústria de laticínios, as quais

incluíam monitoramento temperatura leite, temperatura ambiente e umidade relativa do ar, aplicação de questionários aos responsáveis pela ordenha e coletas de amostras de leite antes e após a cada ordenha para análise de CBT, CBP, composição e teste físico-químicos (pH, acidez titulável e concentração alcoólica), sendo que em 12 das propriedades as frações de caseína foram quantificadas em duplicata. O tempo de estocagem do leite cru não afetou a CBT e CBP ($P > 0,05$). O modelo de tanque de expansão afetou somente a CBP ($P < 0,05$), com média inferior para amostras de leite de tanques de duas ordenhas em relação a quatro ordenhas ($3,61 \pm 0,104$ e $4,00 \pm 0,120$ UFC/mL(\log_{10})). A CBP não afetou as frações das caseínas e caseína total, entretanto, o tempo de estocagem do leite cru reduziu ($P < 0,05$) a concentração das frações κ e β da caseína e caseína total. A redução das frações de caseína não demonstrou efeito sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool. O tempo de estocagem reduziu a ($P < 0,05$) a estabilidade do leite ao teste do álcool, entretanto não cursou com o aumento da ocorrência de LINA. Conclui-se que tanques de resfriamento por expansão, utilizados dentro de suas especificações quanto ao volume de leite a ser resfriado, permitem a manutenção da CBT e CBP . O tempo de estocagem não afeta a CBT e CBP, entretanto reduz a concentração de caseína e a estabilidade do leite ao teste do álcool, sem alterar a ocorrência de LINA.

Palavras-chaves: caseína. contagem de bactérias psicrótróficas. instabilidade. proteólise.

ABSTRACT

RECHE, Natália Luiza Machado. **Influence of milk storage in expansion bulk tanks on the count of microorganisms and stability of casein.** 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

The milk is rich in proteins, lipids, water and carbohydrates, making it an excellent environment for bacterial contamination from different origins and for its proliferation. Bacterial multiplication depends on its capacity of adaptation to the environment and time available. In dairy farms, milk can be storage under cold in bulk tanks models of two and four milking capacity, with a chilling capacity of 50% and 25% respectively of its total volume, in each milking process. The use of cold storage in milk production reduced the occurrence of acid milk, however, increased the proliferation of psychrotrophic microorganisms. These microorganisms presents proteolytic capacity over casein without modifying the milk acidity. This proteolytic capacity could be responsible for unstable non-acid milk (UNAM). The purpose of this study was to evaluate the effect of the cold storage length of time and temperature of raw milk in bulk tanks of two and four milking models on psychrotrophic bacterial count (PBC), casein stability in alcohol test and occurrence of UNAM. The study was conducted in 19 dairy farms in two rehearsal and each farm had a direct expansion bulk milk tank of two or four milking models. Dairy farms with an interval of four milking between milk transportation to the processing industry were selected, thus the milk had a 36 hours of cold storage in the dairy farm. Samples were collected before and after each milking for bacterial total count (BTC), physical-chemical analysis and PBC. Samples of 12 from a total of 19 dairy farms were collected for casein quantification. The length of time of cold storage did not affect the BTC and PBC ($P > 0,05$).

The bulk tank model only affected the PBC ($P < 0,05$), presenting a lower mean tank's model of two milking when compared with models of four milking ($3,61 \pm 0,104$ and $4,00 \pm 0,120$ CFU/mL(\log_{10})). The PBC did not affected the casein fractions, however the length of time of cold storage affected the κ and β casein fraction concentrations. The reductions in these casein fractions did not affect the casein stability in the alcohol test. The length of time of cold storage affected the casein stability ($P < 0,05$) in the alcohol test without affecting the UNAM occurrence. Bulk tanks, when used properly in concern of raw milk volume to be chilled, allow the BTC and PBC rates to remain stable. The length of time of cold storage does not affect BTC and PBC but affects the casein concentration and casein stability in the alcohol test without affecting the UNAM occurrence.

Keywords: casein. Instability. proteolysis. psychrotrophic bacterial count. instability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Conformação da micela de caseína	33
Figura 2	Esquema de coleta das amostras de leite	55
Figura 3	Temperatura média do leite durante as ordenhas (início e final de cada ordenha) e intervalo de ordenhas (após o final da ordenha e próximo a três horas após a ordenha) em tanques de expansão modelos de duas e quatro ordenhas.....	63
Figura 4	Gráfico de correspondência entre técnicas de manejo de ordenha e indicadores relacionados à infraestrutura para ordenha com a contaminação inicial do leite.....	65
Figura 5	Cromatograma A - amostra de leite cru; Cromatograma B - curva padrão a partir do mix de κ , α , e β caseína na concentração de 0,6 mL para 0,4 mL de solução desnaturate (ponto 4 da curva de calibração).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Médias dos quadrados mínimos±erros-padrão da contagem bacteriana total (CBT) e contagem de bactérias psicrotólicas (CBP) de acordo com o tempo aproximado de armazenamento, do modelo de resfriador, do momento da coleta da amostra de leite em relação à ordenha e da região..... 60

Tabela 2 Curva de calibração e concentração final do padrão de κ , α e β caseína..... 76

Tabela 3 Médias dos quadrados mínimos±erros-padrão para percentagem de caseína e suas frações, proteína total, relação caseína/proteína, de gordura e lactose em função do tempo de estocagem do leite cru em tanques de expansão direta..... 80

Tabela 4 Efeito do tempo de estocagem do leite e momento da coleta sobre a prova do álcool. 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -caseína	Alfa caseína
β -caseína	Beta caseína
κ -caseína	Kappa caseína
°D	Dornic
CBP	Contagem Bactérias Psicrotróficas
CBT	Contagem de Bactérias Psicrotróficas
CCS	Contagem de Células Somáticas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMP	Caseinmacropeptídeo
CPP	Contagem Padrão em Placas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
Kg	Kilograma
LINA	Leite Instável Não Ácido
ML	Mililitro
°GL	Graus Gay Lussac
PCA	Agar padrão para contagem
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
<i>UHT</i>	<i>Ultra High Temperature</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 QUALIDADE DO LEITE	25
2.2 RESFRIAMENTO DO LEITE CRU	26
2.3 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES.....	28
2.3.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios.....	30
2.3.2 Micro-organismos psicrotróficos.....	30
2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE	32
2.4.1 Caseína	32
2.4.2 Efeito da CCS sobre a caseína.....	34
2.4.3 Efeito de micro-organismos psicrotróficos sobre a caseína	35
2.5 LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA).....	36
2.5.1 Nutrição	38
2.5.2 Estresse calórico.....	39
2.5.3 Lactação avançada	40
REFERÊNCIAS	42
4 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM DO LEITE SOBRE A MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA EM TANQUES DE EXPANSÃO DIRETA MODELO DUAS E QUATRO ORDENHAS.	51
4 EFFECT OF THE LENGTH OF TIME OF RAW MILK COLD STORAGE ON MICROBIAL MULTIPLICATION IN EXPANSION BULK TANKS OF TWO AND FOUR MILKING MODELS.....	51
4.1 INTRODUÇÃO	52
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.2.1 Coleta das amostras	54

4.2.2 Análises laboratoriais	55
4.2.3 Análises estatísticas	56
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.5 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
5 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS NO LEITE CRU REFRIGERADO SOBRE A ESTABILIDADE DA CASEÍNA AO TESTE DO ÁLCOOL	71
5 THE EFFECT OF THE LENGTH OF TIME OF RAW MILK COLD STORAGE AND THE PSYCHROTROPHIC BACTERIAL COUNT IN THE CASEIN STABILITY IN THE ALCOHOL TEST.	71
5.1 INTRODUÇÃO	73
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	74
5.2.1 Coleta das amostras	74
5.2.2 Análises Físico-químicas	74
5.2.3 Análise microbiológica	75
5.2.4 Quantificação de caseína	75
5.2.5 Análise estatística	77
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXO	87
ANEXO I - Questionário estruturado utilizado na pesquisa	87

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a 5^o posição em relação a produção leiteira mundial (FAO, 2010) as com uma inexpressiva representatividade no mercado externo. Para expandir a exportação são necessárias padronizações dos sistemas de produção leiteira que irá beneficiar a matéria-prima, gerando: qualidade microbiológica, incremento na composição centesimal e ausência de fraudes. Obter um produto lácteo de qualidade é um desafio à cadeia leiteira, visto que, o leite é um meio nutritivo facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens, com taxa de proliferação condicionada a capacidade do micro-organismo adaptar-se ao ambiente e do tempo disponível.

A partir de dezembro de 2011 passou a vigorar a Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2011), a qual definiu a redução gradativa da contagem bacteriana total (CBT) do leite cru refrigerado, prevendo para 2016 o máximo de 100 mil UFC/mL, com intervalos de captação nas propriedades rurais de até 48 horas. O tempo de permanência de até 48 horas na propriedade leiteira, associado às oscilações na temperatura durante as ordenhas, utilização inadequada dos tanques de resfriamento e baixas condições de higiene durante a obtenção do leite, podem gerar o aumento da CBT do leite no tanque de expansão. A microbiota bacteriana que a compõe varia conforme as condições ambientais disponíveis. Dentre as variáveis do ambiente que afetam seu desenvolvimento destacam-se o tempo e a temperatura de armazenamento do leite. A implementação do resfriamento em propriedades leiteiras minimizou a proliferação de micro-organismos mesófilos aeróbios que se caracterizam pela transformação da lactose do leite em ácido láctico e favoreceu a multiplicação de micro-organismos psicrotróficos, os quais tem ação proteolítica sobre o leite, afetando principalmente o teor de caseína.

A caseína representa aproximadamente 80% da proteína total do leite, sendo composta por submicelas com interações hidrofóbicas (α e β -caseína) e hidrofílicas (κ -caseína) unidas por fosfato de cálcio coloidal. A estabilidade da caseína ao tratamento térmico é fundamental para fabricação de produtos lácteos.

Na propriedade, o leite pode ser armazenado em resfriadores por expansão direta, devendo atingir a temperatura

de 4°C dentro de três horas após o término da ordenha (BRASIL, 2011). No Brasil há dois modelos de tanques de expansão direta disponíveis comercialmente, os quais diferem na capacidade de resfriamento do leite a cada ordenha e no custo para implementação na propriedade rural. O modelo de duas e quatro ordenhas apresentam capacidade máxima de resfriar 50 e 25% do volume de leite a cada ordenha, respectivamente, sendo escassas as informações técnicas sobre possíveis diferenças em relação à eficiência no controle da microbiota do leite cru. A capacidade de resfriamento por ordenha pode beneficiar a proliferação de micro-organismos, com destaque às bactérias psicrófilas, as quais tem capacidade de multiplicação sob temperaturas inferiores a 7°C. Esses micro-organismos com capacidade psicrófila são capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termo resistentes que clivam a κ -caseína expondo as frações hidrofóbicas, resultando em perda de estabilidade da micela de caseína sem alterar a acidez titulável do leite, podendo ser um possível desencadeador de LINA.

Atualmente a utilização de resfriadores por expansão direta modelo de duas e quatro ordenhas vem se difundindo na cadeia leiteira sendo necessário o desenvolvimento de informações científicas “in loco” da associação do tempo de estocagem do leite cru a diferentes condições de manejo, higiene e nível de contaminação inicial. A associação desses fatores pode resultar em uma variação na taxa de multiplicação de micro-organismos e na prevalência de micro-organismos psicrófilos, os quais tem capacidade lipolítica e proteolítica. A ação proteolítica dos micro-organismos psicrófilos sobre a caseína pode desencadeador de instabilidade do leite sem alteração da acidez adquirida.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do tempo de estocagem do leite sobre a CBT, contagem de bactérias psicrófilas (CBP), composição, incluindo frações da caseína, e estabilidade do leite em tanques de expansão modelos de duas e quatro ordenhas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUALIDADE DO LEITE

O leite é considerado um alimento nobre, devido à sua composição rica em gorduras, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas, com elevado valor alimentar para o ser humano, principalmente, para os recém-nascidos e idosos. Em vista disto, torna-se um produto altamente perecível, e está sujeito a alterações pela ação de micro-organismos como pela manipulação a que é submetido, tornando-se veículo de doenças para os consumidores. Assim, o leite necessita de atenção especial a fim de manter a sua qualidade e integridade biológica. Santos e Cortinhas (2010) demonstraram que a deficiência na produção de matéria prima com boa qualidade é um dos principais problemas para a crescente da competitividade dos produtos lácteos no mercado externo, onde nesse contexto, a qualidade microbiológica do leite cru é de grande importância e se traduz na maior limitação para o rendimento, processamento e aceitabilidade dos produtos lácteos, além da aceitação pelo mercado consumidor.

O mercado consumidor exige cada vez mais produtos de melhor qualidade. A maior atenção em relação à sanidade e as características organolépticas dos alimentos geram conseqüentemente, uma reação dos fornecedores em melhorar os sistemas de controle e certificação (garantia) de qualidade (MONARDES, 2004). A produção e a composição físico-química do leite variam segundo diversos fatores, tais como: fator genético (espécie, raça do animal, valor genético individual do animal), fatores fisiológicos (gestação, ciclo estral, etc), fatores ambientais (temperatura ambiente, estação do ano, manejo), fatores individuais (estágio de lactação, idade, persistência de lactação, tamanho da vaca), entre outros como alimentação e condição patológica (mastite) (WALDNER et al., 2007; ZANELA et al., 2011).

Tanto a qualidade como a segurança alimentar são assuntos que têm recebido maior atenção na cadeia produtiva leiteira, sendo discutida não só na indústria de laticínios como também por aqueles que fazem parte do processo de elaboração do produto. Segundo a Organização Internacional de Normatização (ISO), define qualidade dos alimentos como “a

totalidade de atributos e características de um produto ou serviço”.

2.2 RESFRIAMENTO DO LEITE CRU

O resfriamento do leite é uma forma de evitar que as propriedades nutritivas do leite sirvam de meio de cultura para micro-organismos que depreciam sua qualidade (FRANCIOSI et al., 2011). A partir da Instrução Normativa 51 (IN 51), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002), passou a exigir o resfriamento na propriedade leiteira.

A utilização de refrigeração por meio do tanque de expansão inibe a presença de micro-organismos mesófilos que causam a acidificação do leite pela quebra de lactose em ácido láctico. Entretanto, quando o tempo de armazenamento é prolongado e as condições de higiene são desfavoráveis, ocorre o aumento de micro-organismos psicrotóxicos, os quais são capazes de se multiplicar em temperatura igual ou inferior a 7°C (SANTOS;FONSECA, 2007; CEMPÍRKOVÁ R.;MIKULOVÁ, 2009)

Para o resfriamento na propriedade leiteira é permitida a utilização de tanque de imersão e expansão. O tanque de imersão deve ter capacidade para resfriar o leite a 7°C em no máximo 3 horas, após o término da ordenha (BRASIL, 2011). Devido à baixa frequência de homogeneização o tanque de imersão proporciona um resfriamento marginal do leite, favorecendo a proliferação de uma microbiota mista composta de bactérias mesófilas e psicrotóxicas, as quais apresentam atividade acidificante e lipo-proteolítica, respectivamente (IZIDORO et al., 2010).

Para os resfriadores por expansão direta a IN 62 determina que apresente potência para reduzir a temperatura do leite a 4°C no tempo máximo de até 3 horas após o término da ordenha, independente de sua capacidade (BRASIL, 2011), visto que esta temperatura de armazenamento do leite pode inibir ou reduzir a multiplicação da maioria das bactérias e a ação de suas enzimas (ARCURI et al., 2006). O mercado dispõe de tanques de expansão com potência de resfriamento para duas e quatro ordenhas possuindo respectivamente capacidade de resfriar 50% e 25% de seu volume total no período de 3 horas (CBQL, 2006). A utilização de tanques de expansão para quatro ordenhas pode ser prejudicial à qualidade do leite quando sua capacidade de resfriamento por ordenha não é respeitada, visto que a conservação do leite em temperatura superior a 7°C favorece a proliferação bacteriana

(SANTOS;FONSECA, 2007). Lorenzetti (2006), simulando temperaturas de estocagem em silos de laticínios (1, 3, 6°C) e o tempo de estocagem (4, 20 e 36 horas) a partir do leite captado na região sul, observou que mesmo em condições adequadas de resfriamento a contagem de micro-organismos psicrotróficos aumenta, indicando a necessidade de redução do tempo de estocagem do leite na indústria. Em desacordo com o encontrado por Lorenzetti (2006), a avaliação da estocagem de leite cru por 0, 24, 48 e 72 horas em propriedades do Estado de Goiás não apresentou influência da temperatura ao longo do tempo de armazenamento sobre as contagens de micro-organismos psicrotróficos (SANTOS, 2008). Assim como a análise do efeito da refrigeração do leite cru em propriedades com expansão direta e imersão não obteve diferença significativa entre os sistemas de resfriamento para contagem de micro-organismos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos. Destaca-se que ambos os sistemas de resfriamento apresentaram altos percentuais (77,2 a 96,9%) de culturas psicrotróficas com atividade proteolítica (BERSOT et al., 2009). Visto que, a apenas a aquisição de equipamento de ordenha mecânica e resfriador por expansão direta não é eficaz para manter a qualidade microbiológica do leite, sendo necessária a associação com técnicas de higiene de equipamentos e manejo de ordenha adequados (WINCK, 2007). Em relação a esse problema a IN 62/2011 exige que o intervalo entre a primeira ordenha e a captação do leite à unidade processadora não exceda 48 horas, indicando como ideal 24 horas (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011). Visto que o aumento da perda de qualidade do leite e a possibilidade de seleção de micro-organismos psicrotróficos proteolíticos estão relacionados ao tempo de refrigeração prolongado nas propriedades rurais e fabricas de laticínios (NÖRNBERG et al., 2010).

A cadeia leiteira tem como desafio manter o leite refrigerado à uma temperatura constante, em todas as etapas da produção. O ambiente externo ao tanque de refrigeração pode afetar sua eficiência, sendo esperada maior contaminação bacteriana do leite refrigerado nas épocas quentes do ano. Silva (2009), avaliando propriedades leiteiras no Sudeste Goiano observou que no período chuvoso, a temperatura média das amostras coletadas do tanque de expansão foi de 9,7°C, sendo esse o período de maior CBT do leite. Propriedades leiteiras da região de São Paulo também apresentaram CBT mais baixa

durante o outono, período de menor média de temperatura e precipitação (JÚNIOR et al., 2009).

2.3 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES

A qualidade dos produtos lácteos ofertados pela indústria está diretamente relacionada à qualidade da matéria-prima recebida para processamento. Essa matéria-prima deve ser oriunda de animais saudáveis, com higiene durante a ordenha e respeito ao tempo e temperatura de estocagem do leite na propriedade (GIGANTE, 2004).

A legislação brasileira define leite como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2011)

Para manter a saúde da glândula mamária de vacas em lactação é necessário que o produtor disponibilize e um ambiente limpo e confortável para o animal, manejo higiênico-sanitário de ordenha, equipamentos de ordenha calibrados, manejo de vaca seca e quando necessário descarte ou segregação das vacas com mastite crônica. Esses fatores são importantes à contagem bacteriana do leite (CBT), pois, alguns micro-organismos como *Streptococcus agalactiae* e *S. uberis* são responsáveis por contagens iniciais altas que, apesar de se manterem estagnadas sob refrigeração adequada, afetam a inocuidade e qualidade microbiológica final do leite (SANTOS;FONSECA, 2007). A contagem bacteriana inicial e a temperatura de estocagem no tanque de expansão são variáveis que afetam as propriedades sensoriais do leite, visto que, apenas temperaturas inferiores a 4°C são capazes de inibir o metabolismo de micro-organismos acidificantes (IZIDORO et al., 2010).

Procedimentos de higiene na ordenha incluem: a higiene pessoal do ordenhador, a aplicação de detergentes e saneantes nos equipamentos de ordenha e manutenção da limpeza da sala de ordenha. A avaliação de 31 propriedades leiteiras localizadas no município de Marechal Cândido Rondon, no Estado do Paraná, constatou que todas apresentavam falhas em procedimentos de higiene e limpeza, favorecendo a contaminação do leite (CITADIN et al., 2009).

O Conselho Brasileiro de Qualidade do leite (CBQL, 2002) recomenda o imediato enxágue dos equipamentos de ordenha e tanques de expansão após a ordenha, seguido de detergente alcalino em todas as ordenhas, com objetivo de retirar do equipamento a proteína e gordura do leite, utilização de detergente ácido no mínimo uma vez por semana para retirar substâncias inorgânicas e saneantes antes de todas as ordenhas para reduzir a CBT. Essas recomendações, quando respeitados o tempo, temperatura e concentrações ideais para ação dos detergentes contribuem para qualidade microbiológica do leite e vida útil dos equipamentos, já que a deposição no equipamento de gordura e proteína do leite está associado a compostos inorgânicos da água, que pode levar a formação de biofilme.

A aplicação de todas as etapas de higiene recomendadas ao equipamento de ordenha e ao equipamento de refrigeração resulta em um nível excelente de CBT, com contagens padrão de até 100.000 UFC/mL (ARCURI et al., 2006). Entretanto, a realidade encontrada nas propriedades é o aquecimento insuficiente das soluções detergentes ou até ausência na utilização de aquecimento, favorecendo a multiplicação de bactérias psicrotróficas e coliformes nos resíduos de leite que permanecem no equipamento de ordenha. Werncke (2012) destacou que, embora pequenos produtores apresentassem uma elevada utilização de tanques de expansão indicando tecnificação da propriedade, o percentual de produtores com água quente disponível para higiene de equipamento foi inferior em relação aos maiores produtores de leite avaliados.

Outro fator que pode afetar a eficiência do processo de armazenamento do leite é a qualidade da água utilizada na higienização dos equipamentos. João et al. (2010) observaram em um estudo realizado em propriedades leiteiras no Meio Oeste Catarinense que o aumento da Contagem Padrão em Placa (CPP) da água leva ao aumento linear da CBT do leite. Da mesma forma a avaliação de 312 propriedades leiteiras da região Oeste Catarinense relata que a CBT do leite em propriedades que dispõe de água aquecida e clorada no local de ordenha foi 5,03 vezes menor do que aquelas que dispõe de água fria e não clorada (SOUZA et al., 2013).

2.3.1 Micro-organismos mesófilos aeróbios

A CBT é uma forma de quantificar a presença de micro-organismos mesófilos aeróbios no leite cru, os quais apresentam temperatura ótima entre 20 a 40°C e metabolismo fermentativo (HARDING, 1995.). O desenvolvimento de micro-organismos mesófilos aeróbios está relacionado às condições higiênico sanitárias durante a obtenção e estocagem do leite cru. Werncke (2012) descreveu que propriedades com menor volume de leite apresentaram CBT superior as dos maiores produtores, em consequência da menor taxa de adoção de boas práticas de manejo como: *pre-dipping* e secagem dos tetos. Além disso, a qualidade da água utilizada na produção de leite é fundamental, visto que a má qualidade microbiológica da água pode veicular contaminantes para o leite por meio dos equipamentos de ordenha e resfriadores (JOÃO et al., 2010; GUERRA et al., 2011).

A implementação mínima de boas práticas de manejo na ordenha, as quais incluíam *pre-dipping*, higienização manual vigorosa de baldes, latões e refrigeradores com detergente alcalino clorado 2%, reduziu em média de 87,90% da CBT nas propriedades com ordenha manual e 86,99% nas propriedades com ordenha mecânica (VALLIN et al., 2009). Da mesma forma, Santos (SANTOS, 2008), destacou que a alta CBT encontrada em tanques de propriedades evidencia a necessidade de adoção de boas práticas na obtenção do leite cru refrigerado.

2.3.2 Micro-organismos psicotróficos

Para a indústria, as contaminações por micro-organismos que ocorrem durante e após a ordenha são as mais depreciativas ao produto final (FROEDER;PINHEIRO;BRANDÃO, 1985). Micro-organismos psicotróficos são oriundos de fontes naturais como água, solo, plantas e animais, portanto, o contato do leite com esses contaminantes associados às baixas temperaturas e tempo de estocagem prolongadas são prejudiciais à composição do leite (SANTOS;FONSECA, 2007). Quando a manipulação do leite ocorre sob condições higiênico-sanitárias adequadas a presença de micro-organismos psicotróficos se limita a 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto que em situações problemáticas pode representar 75% (NIELSEN, 2002). Esses valores são preocupantes, pois alguns micro-organismos possuem tempo de

geração de 20-30 minutos em condições ótimas (GUERREIRO et al., 2005), comprometendo a eficiência da pasteurização que é dependente da carga microbiana inicial presente na matéria prima (ARCURI et al., 2006). Vesconsi, Valduca e Cichoski (2012), avaliando a média da redução na microbiota do leite após a pasteurização constataram uma redução de micro-organismos psicrotróficos e mesófilos de 53% e 37%, respectivamente.

Micro-organismos psicrotróficos produzem enzimas extracelulares que permanecem ativas após o tratamento térmico e, por consequência, geram alterações sensoriais, redução do tempo de prateleira e perda no rendimento industrial de produtos lácteos (CHAMPAGNE et al., 1994; ARCURI et al., 2008). A proteólise por psicrotróficos, segundo Celestino (1997), é significativa quando sua população excede 10^6 UFC/mL, afetando principalmente a caseína, a qual representa aproximadamente 80% da proteína total do leite (BONIZZII;BUFFONI;FELIGINI, 2009).

As enzimas extracelulares dos micro-organismos psicrotróficos permanecem ativas ao longo da estocagem do leite UHT gera presença de sedimentação no leite (VESCONSI;VALDUGA;CICHOSKI, 2012) e o aumento progressivo da concentração de pseudo-caseinomacropéptideo (pseudo-CMP), o qual resulta no aumento do caseinomacropéptideo (CMP) na análise laboratorial (CLOSS;SOUZA, 2011).

Ressalta-se que a intensidade de degradação exercida pelos micro-organismos psicrotróficos sobre a caseína dependerá da forma de estocagem, temperatura de refrigeração e tempo de armazenamento do leite (FRIEDRICH et al., 2010). Arcuri et al. (2004) inocularam duas cepas distintas da bactéria psicrotrófica *Pseudomonas* spp. em leite fresco e pasteurizado, incubando a $7\pm 1^\circ\text{C}$ e submetendo ao teste do álcool em concentrações entre 62 e 88°GL. Observou-se que em uma das cepas com concentração inicial de 10^6 UFC/mL o leite coagulou com álcool na concentração de 80 e 70° GL após, respectivamente, 24 e 72 horas de incubação, demonstrando instabilidade sem alteração da acidez. Portanto, a proliferação de bactérias psicrotróficas gera hidrólise da caseína sem alterar acidez do leite, podendo ser um possível desencadeador de LINA (SANTOS;FONSECA, 2007).

2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE

A legislação brasileira define leite como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). Devido ao seu elevado valor nutricional e a diversidade de derivados que podem ser elaborados, o leite tornou-se um item de grande importância na dieta humana, sendo utilizado e comercializado em todo o mundo (FUQUAY;P.F. FOX;MCSWEENEY, 2011)

Vários são os componentes do leite, sendo a água o constituinte em maior proporção (~87,3%). Em média a gordura representa 3,6%, as proteínas 3,3%, lactose 4,9% e minerais 0,9%. Existem também pequenas quantidades de substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas (TRONCO, 2008). As proteínas do leite podem ser agrupadas em caseínas e proteínas do soro, sendo a caseína a proteína de maior interesse para indústria láctea (SGARBIERI, 2005; SANTOS;FONSECA, 2007).

A água é o componente em que os demais constituintes irão formar uma solução. Alguns minerais apresentam-se na forma de solução iônica, a lactose e a albumina se apresentam na forma de solução verdadeira, a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura no forma de emulsão (TRONCO, 2008).

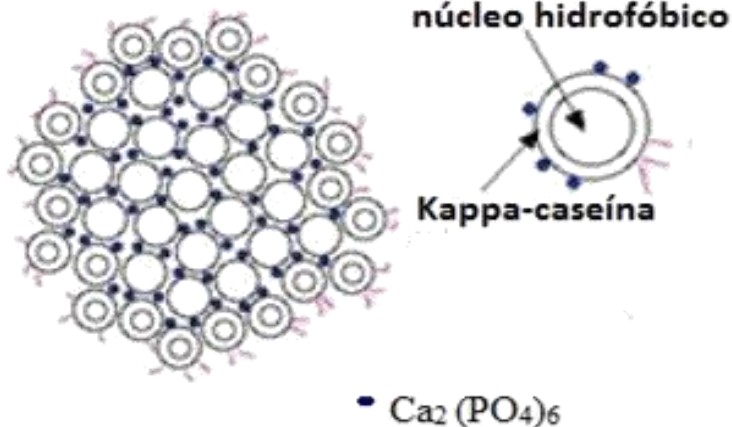
2.4.1 Caseína

As caseínas do leite bovino representam em média 80% da proteína total, sendo composta pelas frações α_{s1-} , α_{s2-} , β - e K-nas proporções 4:1:4:1 (BONIZZI;BUFFONI;FELIGINI, 2009). Estas estão organizadas macromolecularmente agregadas a minerais, formando micelas presente no leite na forma de suspensão coloidal.

A micela de caseína é composta por submicelas que apresentam interações hidrofóbicas, hidrofílicas e pontes de fosfato de cálcio coloidal, o qual age como um “cimento” natural (FOX;MCSWEENEY, 1998). Na Figura 1., estão representadas as interações das frações hidrofóbicas α_{s1-} , α_{s2-} , β caseína e hidrofílicas K-caseína, unidas por fosfato de cálcio coloidal

Figura 1 Conformação da micela de caseína

Micela de caseína



Fonte: Santos e Fonseca (2007).

A estabilidade da caseína pode ser afetada pela hidrólise enzimática da κ -caseína, pH, excesso de cálcio $^{2+}$ e adição de álcool (O'CONNELL et al. (2006) apud OLIVEIRA;TIMM, 2007).

A coagulação por alteração do pH pode ocorrer no leite cru em consequência da quebra de lactose por bactérias mesófilas, resultando na produção do metabólito ácido lático, o qual inibe a repulsão das micelas de caseínas pela liberação de prótons. Logo a acidificação do leite torna as ligações que unem as micelas de caseína mais escassas e fracas (OLIVEIRA;TIMM, 2007) cursando na precipitação do leite ao teste do álcool e positividade na acidez Dornic. Atualmente a ocorrência de leite cru ácido foi minimizada pela exigência do resfriamento obrigatório na propriedade rural.

Na indústria, dois processos tecnológicos são utilizados para separar a caseína das proteínas do soro: precipitação no ponto isoelétrico (pH 4,6; 20°C) e coagulação pela ação da enzima quimosina (renina). A precipitação enzimática ocorre pela degradação da κ caseína, a qual resulta na exposição das frações hidrofóbicas da caseína.

A caseína pode ter sua estabilidade afetada com ausência de acidez adquirida, sendo identificado como leite instável não ácido (LINA), o qual é um problema de origem multifatorial com lacunas a serem preenchidas (RIBEIRO;BARBOSA, 2009). O estresse nutricional pode desencadear o LINA, o qual vem apresentando em sua composição uma redução no teor de caseína e aumento na concentração de cálcio iônico (OLIVEIRA;TIMM, 2007). O aumento no cálcio ionizado está diretamente relacionado à redução nas pontes fosfato de cálcio coloidal, substância essa responsável pela união das submicelas de caseína. Análises realizadas em amostras de leite individual detectaram a relação entre o aumento no cálcio iônico e a instabilidade do leite ao teste do álcool (BARROS et al., 2000; LIN et al., 2009).

Durante processos mastíticos e no final da lactação ocorre aumento na atividade da plasmina que é uma protease sanguínea (FOX;KELLY, 2006). No leite, além da plasmina, há a presença de plasminogênio, fatores de ativação e inibição do plasminogênio. Fernandes et al. (2008) avaliaram a relação entre altas contagens de células somáticas e a degradação das frações de caseína em leite UHT e determinou que o aumento da contagem de células somáticas (CCS) resulta na redução da fração β da caseína. Este efeito é explicado pela ação da plasmina, mas também pela ação das proteases leucocitárias oriundas do processo inflamatório presente na glândula mamária (FERNANDES et al., 2008).

2.4.2 Efeito da CCS sobre a caseína

A saúde da glândula mamária é de grande importância para a qualidade do leite influenciando diretamente na qualidade dos derivados lácteos. A CCS de vacas tem sido usada como ferramenta para monitorar os níveis de mastite em rebanhos leiteiros. Vários fatores podem influenciar a variação da CCS de vacas em lactação, como idade, ordem de parto, período de lactação, mês e estação do ano, entre outros, porém o estado de infecção é o principal fator responsável pela variação da CCS (SOUZA et al., 2009). A elevação da CCS é um fator que tem efeito negativo sobre a composição e o tempo de vida de prateleira dos produtos lácteos. Das alterações que geram prejuízo para a indústria láctea, a redução da caseína é a mais pronunciada. Além disso, o decréscimo de lactose e da gordura pode chegar a 10%

(SANTOS;FONSECA, 2007; FAGAN et al., 2008). Alessio (2013) avaliando o controle leiteiro de 73 rebanhos do estado de Santa Catarina relacionou os baixos teores de lactose ao elevado escore de células somáticas (ECS), estágio de lactação avançada e maior número de lactações. Ressalta se que o estágio de lactação avançado e número de lactações são períodos fisiológicos que cursam com o aumento das células de descamação da glândula.

Na mastite ocorre aumento da passagem de neutrófilos e macrófagos que possuem enzimas proteolíticas, as quais são liberadas durante o processo de fagocitose dos micro-organismos (SANTOS, 2003). Contudo, o efeito mais deletério à caseína ocorre pelo aumento da passagem de plasmina, que é uma protease sanguínea, a qual age principalmente na fração β da caseína (DATTA;DEETH, 2003) e α_1 da caseína Corassin et al. (2013). A plasmina encontra-se aumentada durante processos mastíticos e no final da lactação (FOX;KELLY, 2006). No leite, além da plasmina, há a presença de plasminogênio, fatores de ativação e inibição do plasminogênio.

Fernandes et al. (2008), avaliando a relação entre altas contagens de células somáticas e a degradação das frações de caseína em leite UHT determinaram que o aumento da CSS resulta na redução da fração β da caseína.

A presença de plasmina está associada a defeitos tecnológicos no leite. Além da β -caseína as frações α_1 e α_2 também são degradadas por esta protease, sendo as frações α_1 e β , os principais substratos para esta enzima. Os defeitos tecnológicos atribuídos à atividade da plasmina no leite são: maior tempo de coagulação do leite por ação da renina, redução na firmeza do coágulo, redução no rendimento do coágulo, geleificação em leite UHT e desenvolvimento de sabores estranhos, como sabor amargo nos derivados (CRUDDEN et al., 2005; FOX;KELLY, 2006).

2.4.3 Efeito de micro-organismos psicrotróficos sobre a caseína

O grupo de bactérias com capacidade psicrotrófica tem grande impacto sobre a qualidade do produto final. As proteases oriundas de bactérias psicrotróficas degradam a caseína, podendo agir sobre diversos sítios de clivagem na caseína, tendo preferência pela fração κ da caseína

(NÖMBERG;TONDO;BARNDELLI, 2009), atuando de forma semelhante à quimosina, liberando o pseudo-CMP. Entretanto, apesar do local de fragmentação do pseudo-CMP e CMP ocorrer, respectivamente, entre os aminoácidos 106-107 e 105-106 (MOTTA, 2013), o método de quantificação oficial não é capaz de diferenciá-los (BRASIL, 2006). Desta forma, CMP no leite pode estar elevado pela adição fraudulenta de soro de leite ou pela ação de micro-organismos psicrotróficos.

Para indústria a quantificação da caseína pode ser uma ferramenta para seleção da matéria prima a fim de evitar perdas imediatas na produção e problemas ao mercado consumidor. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem demonstrado ser uma técnica sensível à detecção de proteólise por enzimas bacterianas (DATTA;DEETH, 2006).

A sensibilidade na identificação da origem da proteólise pela cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-CLAE) se deve ao padrão apresentado pela ação das proteases bacterianas que produzem peptídeos menores e hidrofílicos, diferente da plasmina, a qual libera peptídeos maiores, hidrofóbicos, os quais tem menor tempo de retenção (DATTA;DEETH, 2003). A degradação da β -caseína pela plasmina gera os produtos γ_1 , γ_2 , e γ_3 , além de proteoses-peptonas. A identificação desses produtos de degradação permite diferenciar da ação das proteases bacterianas (FOX;KELLY, 2006)

2.5 LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA)

O LINA é uma síndrome caracterizada pela instabilidade da micela de caseína ao teste do álcool com ausência de acidez adquirida, resultando na precipitação da caseína. A origem dessa síndrome é multifatorial estando relacionada, dentre outros fatores, ao estresse nutricional, estresse térmico, estágio de lactação (FISCHER et al., 2012), genética (ZANELA et al., 2006). É sugerido que a redução da instabilidade do leite ao teste do álcool possa ocorrer devido à ação de micro-organismos psicrotróficos (ARCURI et al., 2004; SANTOS;FONSECA, 2007).

O teste do álcool é empregado no Brasil como critério de seleção da matéria prima para o tratamento térmico, apesar de existência de divergências quanto à sua correlação com a resistência térmica, principalmente quando a concentração de

álcool utilizada excede 75°GL (SANTOS;FONSECA, 2007). A ação do álcool consiste na alteração no grau de hidratação das micelas de caseína e a intensidade varia conforme a concentração desse álcool (MARQUES et al., 2010). Além disso, quando se trata de LINA pesquisas demonstram que não há relação entre o teste do álcool e o tratamento térmico, visto que esse leite não precipita no teste da fervura (FISCHER;ZANELA;MARQUES, 2007).

Em relação a composição, o LINA pode apresentar concentração de caseína inferior ao leite estável (TAVERNA et al., 2009), aumento no teor de gordura e geralmente redução no teor de lactose (OLIVEIRA;TIMM, 2007). O estudo da composição do LINA a partir de dados já publicados constatou que a quantificação de caseína relatou a redução da caseína (ZANELA et al., 2011). Recentemente, Barbosa et al. (2012), observaram que as micelas de caseína das amostras positivas para LINA apresentavam em sua composição menor concentração de κ -caseína e maiores concentrações de β -caseína e de proteínas totais. Destaca-se que os resultados obtidos quanto à composição do LINA apresentam variação. Zanela et al. (2009) avaliando 2205 amostras de leite não detectaram alterações na percentagem da gordura ao comparar o leite normal e LINA, já os teores de proteína bruta, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados foram mais baixos no LINA.

Embora a maior parte das amostras de LINA não tenha apresentado expressiva alteração na composição química do leite, Marques et al. (2007), por meio da avaliação de 9832 amostras de leite entregues em um laticínio detectaram decréscimo de 0,1% para gordura, 0,2% para proteína bruta e 0,6% para lactose. Na região sul de Santa Catarina o LINA não apresentou alterações quanto a composição (teor: gordura, proteína, lactose), contagem bacteriana total (CBT) e na contagem de células somáticas (CCS) (WERNCKE, 2012). Existem divergências quanto à composição do LINA, o que implica em discussões sobre o aproveitamento industrial dessa matéria prima. Para produção de leite em pó o decréscimo na composição (lactose, gordura, proteína) relatado por alguns autores pode realmente ser prejudicial à indústria, assim como para produção de queijos, uma vez que o rendimento do produto depende da coagulação da caseína, a qual pode apresentar-se reduzida no LINA.

O LINA poderia ser aproveitado para produção de leite UHT, visto que essa matéria prima apresenta estabilidade térmica ao teste da fervura e a indústria utiliza na rotina a adição de estabilizante, o qual garantiria a estabilidade da micela de caseína frente as altas temperaturas aplicadas no tratamento térmico. Estudos evidenciam que o LINA pode ser utilizado na produção de alguns tipos de derivados de leite sem acarretar prejuízos à qualidade do produto final. A elaboração de iogurte batido utilizando LINA não apresentou alterações tecnológicas em relação ao tempo de fermentação, pH e viscosidade (RIBEIRO;BARBOSA, 2009).

O LINA é rejeitado pela indústria, resultando em prejuízos ao produtor, em vista disso diversos fatores de risco para o aparecimento de LINA vem sendo estudados recentemente, estando os principais fatores descritos a seguir.

2.5.1 Nutrição

A ocorrência de LINA está relacionada a bovinos com alto potencial genético e épocas de estresse nutricional e/ou calórico (OLIVEIRA;TIMM, 2007). Diversos autores vêm reafirmando a importância do manejo nutricional na prevenção do LINA por meio de experimentos com diferentes níveis energéticos com objetivo de simular situações a campo (MARQUES et al., 2010).

O aparecimento de LINA vem apresentando um comportamento sazonal, no qual as ocorrências aumentam no outono, época em que ocorre escassez de nutrientes para os animais. Restrições experimentais de 40% das exigências nutricionais em vacas jersey resultaram em aumento na ocorrência de LINA, utilizando a concentração de álcool a 76% (ZANELA et al., 2006).

Apesar de não estar completamente confirmado , é possível que o estresse causado pela restrição alimentar provoque um aumento na permeabilidade das junções firmes entre as células epiteliais mamárias aumentando a passagem de cátions monovalentes provenientes do sangue, o que resulta no aumento da força iônica e redução da repulsão entre as micelas de caseína (STUMPF et al., 2013). Esse autor observou aumento na frequência de LINA e na concentração de lactose no soro sanguíneo com redução no teor de lactose no leite em vacas

submetidas a restrição alimentar correspondente à 50% das exigências nutricionais.

Apesar do LINA apresentar divergências quanto à composição, o aumento do teor de gordura e redução no teor de lactose são parâmetros frequentemente relatados, sendo consequência de alterações fisiológicas já conhecidas (OLIVEIRA;TIMM, 2007). O equilíbrio osmótico entre o leite e o sangue depende principalmente da lactose e íons como potássio, sódio e cloro. Dietas com baixos níveis de energia resultam em redução da lactose alterando o gradiente de concentração o que proporciona aumento na taxa de passagem de íons (MARQUES et al., 2010). Essa modificação no equilíbrio de íons, como o aumento de sódio pode gerar redução na estabilidade do leite ao teste do álcool (TSIOULPAS;GRANDISON;LEWIS, 2007).

A concentração de lactose está diretamente relacionada ao volume de leite produzido, representando 50% da pressão osmótica, sendo que, para cada micrograma de lactose 10 vezes do seu peso é arrastado em água (SANTOS;FONSECA, 2007). Diante disso, a restrição alimentar pode gerar diminuição na concentração de lactose e por consequência redução no volume de leite produzido, sendo provavelmente a principal razão para o aumento da concentração de gordura no leite. Essas alterações fisiológicas na síntese do leite podem explicar, em parte, o decréscimo na produção de lactose e o aumento da gordura relatado em alguns trabalhos sobre LINA. Zanela et al. (2006), ao submeterem os animais à restrição alimentar obteve redução no volume e quantidade de componentes no leite sem alterar os teores desses componentes. Visto que é uma síndrome multifatorial, as divergências na composição do LINA em experimentos que utilizam restrição alimentar podem ser explicadas pela intensidade da restrição alimentar, equilíbrio de nutrientes, estágio de lactação e potencial genético dos animais (FISCHER et al., 2012).

2.5.2 Estresse calórico

O estresse calórico desencadeia alterações fisiológicas: vasodilatação, aumento do ritmo respiratório, perda de apetite e redução de metabolismo. Raças especializadas apresentam limitações fisiológicas para manter a homeotermia quando desafiadas, em consequência do estresse térmico, reduzem o

consumo de matéria seca, cursando em baixa produção de leite. A redução da exposição ao estresse térmico tem apresentado efeito positivo na produção de leite, sendo que a utilização de túnel evaporativo de ventilação resultou no aumento de 11 a 12% no consumo de alimentos, por conseguinte, incrementou em média 2,6-2,8 kg de leite /dia/vaca (SMITH et al., 2006).

Avaliando o efeito do estresse calórico sobre a estabilidade da caseína em vacas da raça holandesa, Abreu et al. (2011), observaram que a restrição ao acesso à sombra reduziu a estabilidade do leite ao álcool (76,41 para 70,83% de etanol), bem como sua estabilidade térmica (185,3s para 106,7s) e a produção de leite (20,3 para 12,75 L). Em Taiwan durante a estação quente, a avaliação de 1248 amostras a partir de 30 animais da raça holandesa, detectou a ocorrência de 20% de leite instável ao álcool 70% (LIN et al., 2009).

A perda na estabilidade apresentada em animais de alta produção sob temperaturas altas pode estar relacionada à redução no teor de caseínas com destaque as α 1 e 2 e β caseínas (BERNABUCCI et al., 2002).

2.5.3 Lactação avançada

Pesquisas demonstraram que, em estádios de lactação avançada, a melhoria no aporte nutricional pode não ser suficiente para evitar a ocorrência de instabilidade térmica no leite devido às alterações fisiológicas que ocorrem na glândula mamária nesse período (FISCHER;ZANELA;MARQUES, 2007; MARQUES et al., 2010).

No avançar da lactação, ocorre uma inversão na curva da lactação, a qual resulta no decréscimo do volume de leite produzido e aumento na gordura e proteína total. Da mesma forma, ocorre aumento nos teores de sais e cálcio iônico (BARROS, 2006).

O aumento no cálcio ionizado está diretamente relacionado a redução nas pontes de fosfato de cálcio coloidal, substância essa responsável pela união das submicelas de caseína. Além disso, a caseína ao longo da lactação altera sua composição micelar, resultando na redução sistemática das α s e κ -caseína com o proporcional aumento da B-caseína (OSTERSEN;FOLDAGER;HERMANSEN, 1997). Visto que a κ -caseína é a parte hidrofílica responsável pela estabilidade da

micela na emulsão, a redução desta resulta na exposição da parte hidrofóbica da micela de caseína, a qual coagula.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, D.R.M.; NETO, A.T.; GASPARINI, C.; CARDOZO, L.L.; VELHO, J.P. Análise de correspondência múltipla do teor de lactose em controle leiteiro de rebanhos das raças holandesa e jersey. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE – CBQL, 5.2013. Águas de Lindoia. **ANAIS...** 2013.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.

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

ARCURI, E.F.; TAVARES, W.P.P.; PEREIRA, D.B.C.; BRITO, M.A.V.P. Bactérias Psicrófilas proteolíticas: efeito na estabilidade do leite refrigerado ao etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21.,1. 2004. Juiz de Fora: Revista do ILCT. **ANAIS...** 2004.

BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S.D. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.621-628, 2012.

BARROS, L. Ionized calcium as responsible of stability of milk. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 92006. Porto Alegre. **ANAIS...** 2006.

BARROS, L.; DENIS, N.; NÚÑES, A.; GONZÁLEZ, O.; GALAIN, C.; DE TORRES, E.; GONZÁLEZ, P. Variations of milk and alcohol test. In: XXI WORLD BUATRICS CONGRESS2000. Punta del Este. **CD-ROM...** 2000.

BERNABUCCI, U.; LACETERA, N.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. **Anim. Res.**, v. 51, p.25-33, 2002.

BERSOT, L.D.S.; FUJISAWA, F.M.; PEREIRA, J.G.; BARCELLOS, V.C.; MAZIERO, M.T. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite in natura. **Revista Instuto Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 64, p.35-39, 2009.

BONIZZI, I.; BUFFONI, J.N.; FELIGINI, M. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p.165-8, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A.; ANIMAL, D. D. I. D. P. D. O.; INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, D. D. S. D.; GRANEL, C. D. L. C. R. E. S. T. A. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 172,p. 8-13, seção 1, 2002.

BRASIL. ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E.; INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, D. D. D. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 251,p. 6-11, seção 1, 2011.

CBQL. **Equipamentos de Ordenha: recomendações do comitê de equipamentos. Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite**. São Paulo: Quiron. 2002

CBQL. **Tanques de refrigeração: recomendações do comitê de equipamentos/Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite**. São Paulo: Quiron. 2006

CELESTINO, E.L.; LYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated Milk: Effects of Raw Milk, Powder Quality and Storage Conditions of UHT Milk on its Physico-Chemical Attributes and Flavour. **International Dairy Journal**, v. 7, p.129-140, 1997.

CEMPÍRKOVÁ R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, p.65-73, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; R. R. LAING; ROY, D.; MAFU, A.A. Psychrotrops in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p.1-30, 1994.

CITADIN, Â.S.; POZZA, M.S.D.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 10, n. 1, p.52-59, 2009.

CLOSS, E.; SOUZA, C.F.V.D. Avaliação do teor de caseínomacropeptídeo (CMP) nos leites cru e UAT ao longo do tempo de armazenamento. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, p.111-119, 2011.

CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; KOBASHIGAWA, E.; FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Relação entre atividade de plasmina e frações de caseína durante o armazenamento do leite longa vida. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p.29-33, 2013.

CRUDDEN, A.; AFOUFA-BASTIEN, D.; FOX, P.F.; BRISSON, G.; KELLY, A.L. Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p.1017-1025, 2005.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 36, 2003.

DATTA, N.; DEETH, H.C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. **Food Research International**, v. 39, p.823-830, 2006.

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009-2010**. Florianópolis: Epagri/Cepa. 2010. 316 p.

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.D.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p.651-660, 2008.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Homepage da FAO: <http://www.fao.org/forestry/databases/29420/en/>> 02 jul 2012. 2010.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; ROSIM, R.E.; DE LIMA, C.G.; DE OLIVEIRA, C.A.F. Casein fractions of ultra

high temperature milk with different somatic cell counts.

Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 43, p.149-152, 2008.

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

FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T. Alimentação de vacas leiteiras: reflexos sobre a produção leiteira e características físico-químicas do leite. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL, 1. 2007. Passo Fundo. **CD-ROM...** 2009.

FOX, P.; MCSWEENEY, P. **Dairy chemistry and biochemistry**. New York: Chapman & Hall. 1998. 470 p.e-book
<<http://books.google.com.br/books?id=6Q8mX8DsDe4C&prints_ec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>>.

FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. **International Dairy Journal**, v. 16, p.500-516, 2006.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; COLOGNA, N.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Microbial analysis of raw cows' milk used for cheese-making: influence of storage treatments on microbial composition and other technological traits. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p.,p.171-180, 2011.

FRIEDRICH, M.T.; FRANKEN, R.B.C.; AZEVEDO, M.S.; PRESTA, M.A.; AGNOL, C.D. Avaliação da estabilidade do leite in natura e UHT quanto ao índice ade CMP. **Revista CIATEC**, v. 2, p.21-27, 2010.

FROEDER, E.; PINHEIRO, A.J.R.; BRANDÃO, S.C.C. Variação da qualidade microbiológica do leite cru tipo C da Região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 40, p.55-68, 1985.

FUQUAY, J.W.; P.F. FOX; MCSWEENEY, P.L.H. Encyclopedia of Dairy Sciences **Academic Press, Elsevier Ltd**. LONDON, U.: 3875 p. 2011.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J. W. C., M.P.; SANTOS, M.V (Ed.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo. 2004. p.235-254

GUERRA, M.G.; JÚNIOR, J.G.B.G.; RANGEL, A.H.D.N.; ARAÚJO, V.M.D.; GUILHERMINO, M.M.; NOVAES, L.P. DISPONIBILIDADE E QUALIDADE DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE LEITE. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, p.230-235, 2011.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.D.S.M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, p.216-222, 2005.

HARDING, F. **Milk Quality**. Glasgow: Aspen. 1995. e-book <http://books.google.com.br/books?id=PWmQTKDWPz0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>.

IZIDORO, T.B.; SPINA, T.L.B.; LIMA, M.T.; NOBILE, C.; TUASEK, S.O.; PEREIRA, J.G.; ALMEIDA, J.P.D.; PINTO, N. Resfriamento marginal: multiplicação da microbiota psicrotrófica e o metabolismo acidificante da microbiota láctea. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE,4. 2010. Florianópolis. **CD-ROM...** 2010.

JOÃO, J.H.; ROSA, C.A.D.V.L.; NETO, A.T.; PICININ, L.C.A.; FUCK, J.J.; MARIN, G. Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n.1, p.9-15, 2010.

JÚNIOR, L.C.R.; MONTOYA, J.F.G.; MARTINS, T.T.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 61, n.6, p.1411-1418, 2009.

LIN, M.-J.; YING-CHING LI; YU-CHI LIN; CHEN, K.-J. Study on cow's raw milk quality in the eastern Taiwan during hot season. **J. Chin. Soc. Anim. Sci.**, v. 38, p.87-95, 2009.

LOPEZ-FERNANDEZ, O.; FERRER-PEREZ, X.; LAFARGA-LEBEY, S.; HONRUBIA-SERRANO, M.L.; TUDELA-MARI, M.

[Follow-up of alcohol and/or cocaine dependents after their discharge from a therapeutic community: a pilot study].

Adicciones, v. 23, p.289-98, 2011.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** . Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 71 p. (Dissertação)

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; JUNIOR, W.S.; MANZKE, N. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite.

Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, p.2724-2730, 2010.

MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; JÚNIOR, W.S.; FISHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, p.91-97, 2007.

MOTTA, T.M.C. **IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE LEITE BOVINO POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO POR CLAE-EM/EM.** Química UFRGS, Porto Alegre, 2013.

(Dissertação)

NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6628-34, 2002.

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

NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p.41-46, 2010.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-562, p.17-2, 2007.

OSTERSEN, S.; FOLDAGER, J.; HERMANSEN, J.E. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p.207-219, 1997.

RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S. Avanços nas pesquisas do leite instável não ácido no Brasil. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL, 1. 2009. Passo Fundo. **CD-ROM...** 2009.

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na monofatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. . In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B.; (ORG) (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibiótico**. Juiz de Fora, v.1. 2003

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. Pirassununga: Manole. 2007

SANTOS, P.A.D. **Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de Goiás estocado por diferentes períodos**. Higiene e Tecnologia de Alimentos, UFG, GOIÂNIA, 2008. (Tese)

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p.43-56, 2005.

SILVA, M.A.P.D.; SANTOS, P.A.D.; ISEPON, J.D.S.; REZENDE, C.S.M.E.; LAGE, M.E.; NICOLAU, E.S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 68, n. 3, p.373-380, 2009.

SMITH, T.R.; CHAPA, A.; WILLARD, S.; HERNDON, C.; WILLIAMS, R.J.; CROUCH, J.; RILEY, T.; POGUE, D. Evaporative Tunnel Cooling of Dairy Cows in the Southeast. II: Impact on Lactation Performance¹. **Journal of dairy science**, v. 89, p.3915-3923, 2006.

SOUZA, A.A.M.D.; BAJALUK, S.A.B.; PAGLIARINI, G.A.; ROYER, R.C.F. Efeito de fatores relacionados a qualidade da água sobre a contagem bacteriana total e contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros do oeste de Santa Catarina. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 5. 2013. Águas de Lindoia **ANAIS...** 213.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p.1015-1020, 2009.

STUMPF, M.T.; FISCHER, V.; MCMANUS, C.M.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; SANTOS, C.S.; ABREU, A.S.; MONTAGNER, P. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, p.1137-42, 2013.

TAVERNA, M.; NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; COSTABEL, L. Factores que afectan la estabilidad térmica y al alcohol em leches de calidad higiénico-sanitaria. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL, 1. 2009. Passo Fundo. **CD-ROM...** 2009.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria. 2008

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrums period to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. v. 90, p.p. 5012-5017, 2007.

VALLIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.D.; SILVA, L.C.C.D. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p.181-188, 2009.

VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v. 42, p.730-736, 2012.

WERNCKE, D. **PERFIL DAS PROPRIEDADES E OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NA REGIÃO DO VALE DO BRAÇO DO NORTE, SUL DO ESTADO DE**

SANTA CATARINA. Produção Animal UDESC, Lages, 2012. 61 p. (Dissertação)

WINCK, C.A. PERFIL DAS PROPRIEDADES LEITEIRAS EM SANTA CATARINA E SUA RELAÇÃO COM A ADEQUAÇÃO ÀS NORMAS BRASILEIRAS DE QUALIDADE DO LEITE.

Produção animal e alimentos, UDESC, Lages, 2007. (Dissertação)

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; JUNIOR, W.S.; ZANELA, C. Leite Instável Não Ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5 p.835-840, 2006.

ZANELA, M.B.; KOLLING, G.J.; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V. Análises de composição e estabilidade do leite ao álcool. In: **CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INESTABLE**, 2. 2011. Colonia Del Sacramento. **CD-ROM...** 2011.

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

4 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM DO LEITE SOBRE A MULTIPLICAÇÃO MICROBIANA EM TANQUES DE EXPANSÃO DIRETA MODELO DUAS E QUATRO ORDENHAS.

4 EFFECT OF THE LENGTH OF TIME OF RAW MILK COLD STORAGE ON MICROBIAL MULTIPLICATION IN EXPANSION BULK TANKS OF TWO AND FOUR MILKING MODELS.

RESUMO

Na propriedade rural o leite pode ser armazenado sob resfriamento por até 48 horas em tanque de expansão direta, em modelos de duas e quatro ordenhas. O tempo de permanência do leite cru na propriedade associado às oscilações na temperatura durante as ordenhas, utilização inadequada dos tanques de resfriamento e baixas condições de higiene durante a obtenção do leite, podem provocar o aumento da população bacteriana contaminante. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do tempo de estocagem do leite em tanques de expansão modelo duas ou quatro ordenhas sobre a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de bactérias psicotróficas (CBP). As avaliações foram conduzidas em 19 propriedades leiteiras localizadas em duas regiões de Santa Catarina, as quais possuíam equipamentos de refrigeração do leite por expansão direta, modelo de duas ou quatro ordenhas com taxa de ocupação variando de 60 a 100%. Antes e após cada ordenha foram coletadas amostras de leite para análise de CBT e CBP, totalizando aproximadamente 36 horas de estocagem (quatro ordenhas). O tempo de estocagem do leite cru não afetou a CBT e CBP ($P > 0,05$). O modelo de tanque de expansão afetou somente a CBP ($P < 0,05$), com média inferior para amostras de leite de tanques de duas ordenhas em relação ao de quatro ordenhas ($3,61 \pm 0,104$ e $4,00 \pm 0,120$ UFC/mL(\log_{10})). Conclui-se que tanques de resfriamento por expansão, utilizados dentro de suas especificações quanto ao volume de leite a ser resfriado, permitem a manutenção da CBT e da CBP em sistemas de transporte do leite ao laticínio a cada 36 horas.

Palavras chaves: contagem bacteriana total. contagem de bactérias psicotróficas. higiene. temperatura.

ABSTRACT

In the dairy farm milk can remain in cold storage for a maximum period of 48 hours in bulk tanks of two and four milking models. The length of time of milk storage associated to temperature variation, the improper use the bulk tank and lack of hygienic practices during milk production may increase the bacterial contamination. The purpose of this study was to evaluate the effect of the cold storage length of time and temperature of raw milk in bulk tanks of two and four milking models on psychrotrophic bacterial count (PBC) and bacterial total count (BTC). A total of 19 dairy farms, located in two regions of the Santa Catarina State, had been evaluated. Each dairy farm had direct expansion bulk milk tank and an occupancy rate varying from 60% to 100%. Samples were collected before and after each milking procedure to determine PBC and BTC, totalizing 4 milking and a storage period of 36 hours. The length of time of cold storage did not affect the BTC and PBC ($P > 0,05$). The bulk tank model only affected the BTC ($P < 0,05$), presenting a lower mean tank's model of two milking when compared with models of four milking ($3,61 \pm 0,104$ and $4,00 \pm 0,120$ CFU/mL(\log_{10})). Bulk tanks, when used properly in concern of raw milk volume to be chilled, allow the BTC and PBC rates to remain stable demonstrating that the milk transportation every 36 hours is viable.

Keywords: total bacterial count. psychrotrophic bacteria count. hygiene. temperature.

4.1 INTRODUÇÃO

O leite é um meio nutritivo facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens, sendo a taxa de proliferação condicionada à capacidade dos micro-organismos adaptarem-se ao ambiente e do tempo disponível. A Instrução Normativa nº62 (IN 62) apresentou metas para redução da CBT do leite, a qual cuminará em 2016 um limite máximo de 100.000 UFC/mL (região Sul, Sudeste e Centro Oeste), entretanto não reduziu o tempo de estocagem do leite nas propriedades rurais, o qual é de até 48 horas (BRASIL, 2011). Fatores como o tempo de armazenamento na propriedade leiteira associado às oscilações na temperatura a cada ordenha, utilização inadequada dos tanques de resfriamento

e baixas condições de higiene durante a obtenção do leite podem gerar o aumento da contagem bacteriana do leite cru armazenado em resfriadores por expansão direta. Na propriedade, o leite pode ser armazenado sob resfriamento em tanques de expansão, existindo no mercado brasileiro dois modelos denominados tanques de duas e de quatro ordenhas, os quais devem ter, respectivamente, capacidade para resfriar 50% e 25% de seu volume à uma temperatura de 4°C em um período máximo de três horas após o término da ordenha (CBQL, 2006).

A implementação do resfriamento do leite nas propriedades leiteiras minimizou a proliferação de micro-organismos mesófilos que se caracterizam pela fermentação da lactose do leite em ácido láctico, porém, permitiu o predomínio de micro-organismos psicrotóxicos. Essas bactérias com capacidade psicrotóxica produzem enzimas extracelulares lipolíticas e proteolíticas que permanecem ativas após o tratamento térmico e por consequência geram alterações sensoriais, redução do tempo de prateleira e do rendimento industrial de produtos lácteos (CHAMPAGNE et al., 1994; ARCURI et al., 2008). Lorenzetti (2006), simulando temperaturas de estocagem em silos de laticínios (1, 3, 6°C) e o tempo de estocagem (4, 20 e 36 horas) a partir do leite captado na região Sul observou que mesmo em condições adequadas de resfriamento a contagem de micro-organismos psicrotóxicos aumenta, indicando a necessidade de redução do tempo de estocagem do leite na indústria.

Um dos fatores mais importantes para qualidade final dos produtos lácteos é a contaminação inicial do leite cru, visto que alguns micro-organismos podem dobrar sua população a cada 20-30 minutos (GUERREIRO et al., 2005). Desta forma gerando comprometimento da eficiência do processo de pasteurização, o qual é dependente da carga microbiana inicial do leite (ARCURI et al., 2006). Um estudo conduzido por Vesconsi, Valduga, Cichoski (2012), demonstrou uma redução média da microbiota do leite após a pasteurização de 53% e 37% para micro-organismos psicrotóxicos e mesófilos, respectivamente. A contaminação inicial do leite pode ser consequência de deficiências no manejo e higiene da ordenha, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente e mão de obra desqualificada (VALLIN et al., 2009). Sabe-se que o tempo e as oscilações na temperatura de estocagem do leite são variáveis que podem afetar a qualidade microbiológica do leite e sua

composição, podendo desencadear prejuízos ao produtor, laticínios e consumidores (SANTOS et al., 2008; VALLIN et al., 2009).

Atualmente, a utilização de equipamentos por expansão direta vem se difundindo na cadeia leiteira, entretanto as informações técnicas sobre possíveis diferenças entre os modelos de equipamentos em relação à eficiência de resfriamento e o controle microbiológico do leite cru são escassas. Visto que, no processo de refrigeração, a massa de leite resfriado recebe uma mistura de leite com temperatura elevada a cada ordenha, ocorrendo oscilação de temperatura do leite ao longo do período de armazenamento do mesmo, a qual pode ser mais pronunciada em resfriadores por expansão direta modelo de quatro ordenhas em consequência da sua menor capacidade de resfriamento a cada ordenha. Em resultado as oscilações de temperatura uma microbiota psicrotrófica pode se prevalecer de formar progressiva no leite cru refrigerado ao longo das 48 horas de estocagem.

A partir desta realidade torna-se importante o desenvolvimento de informações científicas sobre as consequências do armazenamento do leite em propriedades leiteiras, com diferentes condições de manejo e higiene, as quais afetam a contaminação inicial e, conseqüentemente, a taxa de multiplicação de micro-organismos e sua ação sobre a composição do leite. Em função disto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do tempo de estocagem do leite sobre a contagem bacteriana total (CBT) e contagem de bactérias psicrotóficas (CBP) em tanques de expansão modelos de duas ordenhas e quatro ordenhas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

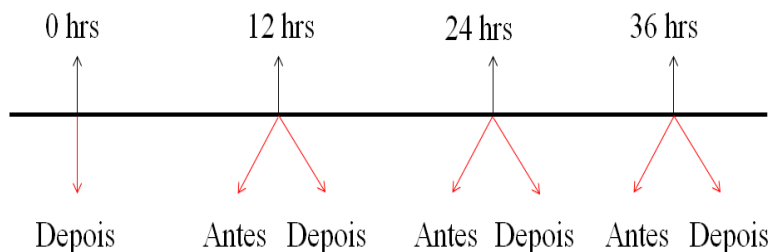
4.2.1 Coleta das amostras

O estudo foi conduzido em 19 propriedades leiteiras, localizadas em duas mesorregiões de Santa Catarina (Serrana e Meio-Oeste), as quais possuíam equipamentos de refrigeração do leite através de expansão direta, modelo de duas ordenhas ou quatro ordenhas, com ocupação entre 50 e 100% da capacidade, considerando um modelo de transporte a granel do leite para a indústria a cada 48 horas, procedimento este que era adotado pelas indústrias para as quais os produtores comercializavam seu

leite. Foram incluídas no presente estudo somente propriedades em que a capacidade nominal dos resfriadores não foi excedida. O procedimento experimental foi repetido uma vez em cada propriedade com um intervalo mínimo de duas semanas. Para obtenção de informações referentes às boas práticas de higiene e manejo de ordenha foi aplicado um questionário estruturado (ANEXO 1) aos responsáveis pelo manejo de ordenha em cada propriedade, sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Plataforma Brasil - Ministério da Saúde, número de referência 04389812.7.0000.0118.

As amostras de leite para análise de CBT e CBP foram coletadas após a 1^o ordenha e consecutivamente antes e após a 2^o, 3^o e 4^o ordenha, totalizando sete amostras (aproximadamente 36 horas de estocagem) (Figura 2). Em sequência, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório. Sendo que durante todo período de estocagem, a temperatura do leite no tanque de expansão direta, umidade relativa do ar e temperatura do ar foram registradas por meio de um *datalogger*, em intervalos de cinco minutos.

Figura 2 Esquema de coleta das amostras de leite



Fonte: produção do próprio autor

4.2.2 Análises laboratoriais

No laboratório as amostras para CBP (coletadas em frascos estéreis, sem conservante) foram diluídas em solução salina estéril a 0,9%, sendo que, de cada diluição seriada, uma

alíquota de 0,1mL foi plaqueada, em triplicata, através do espalhamento em superfície no ágar Ágar padrão para contagem (PCA) com o auxílio de uma alça de Drigasly (SILVA et al., 2010).

As placas inoculadas foram incubadas a 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias. Após este período, as colônias formadas foram enumeradas, o valor obtido foi multiplicado pela recíproca da diluição correspondente e os resultados finais expressos em UFC/mL. As amostras para CBT coletadas em frascos estéreis com o conservante Azidiol® foram quantificadas pelo método de citometria de fluxo utilizando um equipamento Bentley Bactocount IBC no laboratório da Universidade do Contestado (UnC/CIDASC) em Concórdia – SC.

4.2.3 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em fatorial, com $2 \times 2 \times 3 \times 2$, sendo os fatores as regiões de estudo, os modelos de tanques de expansão, os tempos de armazenamento e o momento da coleta da amostra do leite (antes ou após a ordenha). Os dados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas no tempo dentro de cada propriedade leiteira, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS, 2005). Visando a obtenção de normalidade dos resíduos, os valores de CBT e CBP sofreram transformação logarítmica (\log_{10}), sendo a normalidade testada, empregando-se o teste de Shapiro Wilks. Foram avaliados os dados a partir de aproximadamente 12 horas de armazenamento (antes da segunda ordenha) e as CBT e CBP das amostras coletadas na primeira ordenha consideradas como contaminação inicial, sendo as mesmas analisadas como covariáveis. O modelo estatístico para CBT e CBP foi composto pelas variáveis explanatórias da região em que se localizava a propriedade (Serrana ou Meio-oeste), modelo de tanque de expansão (duas ou quatro ordenhas), tempo de armazenamento (12, 24 ou 36 horas), momento de coleta (antes ou após a ordenha) e as interações entre essas variáveis, além das covariáveis percentagem de ocupação do tanque de expansão e contaminação inicial (\log_{10} de CBT ou de CBP antes do resfriamento (imediatamente após a primeira ordenha)).

A relação entre algumas técnicas de manejo de ordenha e indicadores relacionadas à infraestrutura para ordenha com a contaminação inicial foi avaliada através de análise multivariada.

Empregou-se a técnica de correspondência múltipla, utilizando-se o procedimento CORRESP do pacote estatístico SAS (SAS, 2009). Para tal, foram criadas classes para as variáveis contínuas, para as quais valores abaixo do limiar foram considerados baixos e iguais ou acima foram considerados alto, sendo CBT(\log_{10}) 4,5, CBP(\log_{10}) 3,8 e CCS(\log_{10}) 5,6. As técnicas de manejo foram divididas em realização ou não de *pre-dipping*, tratamento de água utilizada na ordenha e tipo de sala de ordenha.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das 19 propriedades rurais a partir do questionário determinou uma produção média de leite de 389,6 L/dia, variando entre 200 a 650 L/dia. O leite armazenado na propriedade correspondeu a ordenha de 2 dias, apresentando uma taxa de ocupação variando entre 50 a 100%, com média de 73,42 e 78,6% para tanques de 2 e 4 ordenhas, respectivamente. Em relação ao sistema de ordenha 42,1% utilizavam balde ao pé e 57,9% ordenha canalizada.

Dentre as boas práticas de manejo de ordenha realizadas nas propriedades, 26,3% eliminavam os 3 primeiros jatos antes da ordenha, 63,2% aplicavam o *pre-dipping* e 78,9% o *pós-dipping*. A utilização de boas práticas de manejo de ordenha resultou na redução da CBP e contagem de micro-organismos mesófilos no leite cru refrigerado em propriedades rurais em Minas Gerais (NERO;VIÇOSA;PEREIRA, 2009).

Um fator determinante para à redução da contaminação do leite é a qualidade da água utilizada no manejo dos animais e higiene de equipamentos (GUERRA et al., 2011). Nas propriedades avaliadas apenas 34,84% disponibilizavam de alguma forma de tratamento na água. Segundo a IN 62, a qualidade microbiológica da água utilizada na limpeza e sanitização dos resfriadores e utensílios de ordenha é um ponto crítico na obtenção do leite cru refrigerado, desta forma fica determinada a obrigatoriedade da cloração da água (BRASIL, 2011).

Na higiene dos equipamentos, 94,7% utilizavam de água aquecida, sendo o aquecimento realizado por aquecedores elétricos (44,44) ou a gás (16,66%), seguido de métodos alternativos como torneira elétrica, fogão e ebulidor elétrico. Apesar do alto índice de utilização de água quente para

higienização dos equipamentos, pode ocorrer variabilidade na sua eficiência, visto que apenas 22,2% aferiam a temperatura da água, além da frequente utilização de métodos de aquecimento alternativos, cuja capacidade pode ser insuficiente para atingir o limiar de máxima eficiência dos detergentes alcalino-clorados. Para uma ação eficaz do detergente alcalino-clorado, a água usada deve atingir 70°C e manter-se acima de 40°C durante todo o procedimento de higiene de equipamentos (SANTOS;FONSECA, 2007). Dos produtores avaliados, 78,9% utilizaram detergentes adequados (alcalino-clorado e ácido) para higiene de equipamentos de ordenha e refrigeração. Entretanto, o alto índice de utilização de detergentes só é eficaz quando atrelado a utilização água de boa qualidade e respeitado o tempo e a temperatura de ação dos produtos. Werncke (2012) observou percentuais semelhantes de utilização de detergentes indicados para a higienização dos equipamentos de ordenha. A prática de higiene de equipamentos com detergentes adequados (alcalino/ácido) está relacionada a baixas contagens de micro-organismos no leite, visto que as propriedades que aplicavam essas boas práticas de higiene apresentaram contagem média de 100.000UFC/mL (ARCURI et al., 2006; ARCURI et al., 2008). Desta forma a baixa contagem inicial do leite, a qual no presente estudo apresentou uma média de 91.666 UFC/mL para CBT e 36.459 UFC/mL para CBP pode estar relacionada aplicação de boas práticas como aplicação de detergentes. Ressalta-se que ao longo da estocagem a média de CBT e CBP manteve-se estável. Os baixos valores de CBT estão em acordo com a meta final da IN 62, a qual exigirá, a partir de 2016, uma contagem de 100.000 UFC/mL. Em relação à CBP não há um limite regulatório, contudo a literatura relata que quando a manipulação do leite ocorre sob condições higiênico-sanitárias adequadas a presença de micro-organismos psicotróficos se limita a 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto que, em situações problemáticas pode representar 75% (NIELSEN, 2002). No presente estudo a proporção de micro-organismos psicotróficos foi de 34,69% sobre a microbiota total.

O tempo de estocagem não afetou ($P < 0,05$) a CBT e a CBP (Tabela 1), evidenciando que o disposto na IN 62 (BRASIL, 2011), ou seja, o leite pode ser transportado em intervalos de 48 horas para a indústria, visto ser possível manter a qualidade microbiológica do leite em resfriadores por expansão direta, nos

modelos de duas e quatro ordenhas, dentro deste período estabelecido. Esse resultado corrobora com a avaliação da estocagem de leite cru por 0, 24, 48 e 72 horas realizada em propriedades do Estado de Goiás, na qual o tempo de estocagem não afetou a CBP (SANTOS, 2008), assim como com os resultados de um estudo de modelagem matemática para a multiplicação bacteriana no leite cru, o qual também, evidenciou que o tempo de refrigeração não influencia no crescimento bacteriano (FRÜHLING, 2013).

Os resultados divergem de um estudo realizado em 30 propriedades leiteiras no Paraná, no qual o leite cru estocado por 24 e 48 horas apresentou aumento da microbiota ($P < 0,05$) em relação ao estocado por 2 horas. Da mesma forma, a avaliação do leite com 24 e 48 horas de estocagem em ambiente controlado a partir de amostras de leite individual de vaca, tanque de expansão e silo industrial, apresentaram um aumento progressivo de micro-organismos psicrótróficos nas 48 horas de estocagem (LEITNER et al., 2008).

Experimentos conduzidos em laboratório têm demonstrado que as amostras de leite estocadas em ambiente controlado apresentam taxa de multiplicação microbiana linear (ARCURI et al., 2004; LORENZETTI, 2006). Em condições a campo a entrada de leite quente a cada ordenha é uma variável fundamental, pois gera oscilação na temperatura do leite e proporciona a entrada de matéria prima fresca, resultando em alteração da microbiota bacteriana presente e um efeito de diluição. Além disso, a taxa de multiplicação dos micro-organismos está condicionada a contagem inicial, a qual no presente estudo afetou de forma altamente significativa a CBT e a CBP ($P < 0,0001$) das amostras de leite refrigerado. Estas condições divergem das existentes de estudos realizados com leite estocado em temperatura constante (ARCURI et al., 2004; LORENZETTI, 2006), nos quais a contagem inicial de micro-organismos estava acima do limite de 600 mil UFC/mL de CBT, estabelecido pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011). Embora a CBP não possua um limite determinado pela legislação, sabe-se que altas contagens iniciais desses micro-organismos podem potencializar o aumento da população em até 8-9 log UFC/mL (NÖRNBERG et al., 2010).

Tabela 1 Médias dos quadrados mínimos±erros-padrão da contagem bacteriana total (CBT) e contagem de bactérias psicotróficas (CBP) de acordo com o tempo aproximado de armazenamento, do modelo de resfriador, do momento da coleta da amostra de leite em relação à ordenha e da região.

Variável	Classe	CBT (log ₁₀ UFC/mL)	CBP (log ₁₀ UFC/mL)
Resfriador	2 ordenhas	4,51±0,046 a	3,61±0,104 b
	4 ordenhas	4,61±0,052 a	4,00±0,120 a
Tempo de armazenamento	12 horas	4,58±0,036 a	3,78±0,081 a
	24 horas	4,57±0,036 a	3,81±0,081 a
	36 horas	4,54±0,036 a	3,82±0,081 a
Coleta da amostra	antes da ordenha	4,60±0,041 a	3,83±0,079 a
	depois da ordenha	4,55±0,041 a	3,78±0,079 a
Região	Serrana	4,51±0,045 a	3,65±0,102 a
	Oeste	4,61±0,052 a	3,96±0,117 a

Fonte: produção do próprio autor

* Médias seguidas de letras diferentes para uma mesma variável diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

O tempo de resfriamento na propriedade parece ser um fator coadjuvante na qualidade do leite, ressaltando a importância de boas práticas de manejo, visto que a contagem inicial de micro-organismos manteve-se estável ao longo da estocagem do leite cru. O sucesso na aplicação das boas práticas de manejo possibilita a redução em média de 87% da CBT no leite cru, independente do sistema de ordenha adotado pela propriedade (VALLIN et al., 2009). Da mesma forma, na região Leste do Paraná, o tempo de transporte do leite para indústria, o qual variou entre 24 e 48 horas não demonstrou relação com a CBT, sugerindo que baixas contaminações iniciais podem suportar maiores variações de temperatura sem comprometer a CBT final do produto (PAGNO et al., 2013).

O modelo de resfriador não afetou a CBT (P <0,05), uma vez que ambos os modelos atingiram temperaturas baixas suficientes para inibir a proliferação de micro-organismos

mesófilos. Além disso, a média da CBT no presente estudo foi muito abaixo da média descrita em outras pesquisas com leite cru refrigerado em que as médias de CBT superavam o limite atual estabelecido pela IN 62 (BRASIL, 2011) (SANTOS et al., 2008; CITADIN et al., 2009; VALLIN et al., 2009; CATANIO et al., 2012). Deve-se considerar que foram incluídas no presente estudo somente propriedades em que a capacidade nominal dos resfriadores não foi excedida.

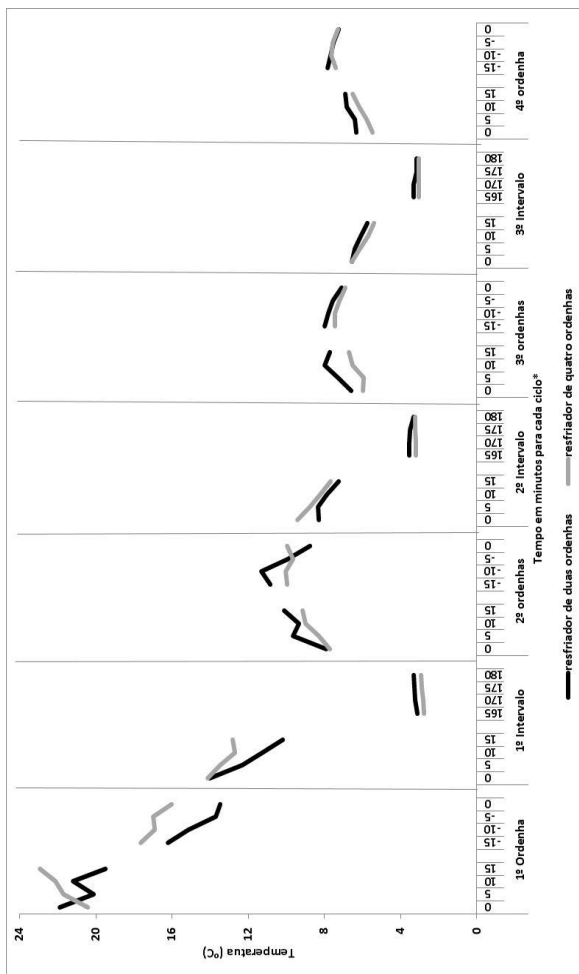
A CBP foi afetada pelo modelo de tanque de expansão ($P < 0,05$) (Tabela 1). Na Figura 3 são apresentadas as temperaturas médias nos períodos iniciais e finais de cada ordenha e intervalo entre ordenhas. Verifica-se que entre a 1^o ordenha e o 1^o intervalo, em média, os tanques de expansão de duas ordenhas apresentaram redução de temperatura mais pronunciada do que os tanques de quatro ordenhas. Essa diferença na oscilação da temperatura do leite nas primeiras horas de estocagem pode ser o fator determinante para uma maior proliferação de micro-organismos psicrotróficos em tanques de quatro ordenhas, uma vez que, algumas espécies desses micro-organismos podem dobrar sua população a cada 20-30 minutos quando sob temperatura de 7°C (GUERREIRO et al., 2005), portanto, oscilações de temperatura devido ao modelo de tanque de expansão direta de quatro ordenhas apresentar uma capacidade limite de resfriamento de 25% do seu volume a cada ordenha podem favorecer a prevalência desta microbiota no leite cru.

O momento de coleta das amostras de leite (antes x depois da ordenha) não afetou ($P > 0,05$) a CBT e a CBP (Tabela 1), havendo um possível efeito de diluição da microbiota presente a partir da entrada de leite fresco, assim como a desestabilização da multiplicação dos micro-organismos em consequência a oscilação de temperatura do leite. Não foi observada diferença entre as mesoregiões de Santa Catarina avaliadas quanto a CBT e CBP, igualmente não havendo interação entre região e modelo de tanque resfriador ($P > 0,05$).

A temperatura média do ambiente externo aos tanques de resfriamento, durante o período experimento, foi de 21.9 °C. Observa-se na Figura 3 que os tanques de duas ordenhas promoveram refrigeração mais rápida do leite, especialmente durante a primeira ordenha e no primeiro intervalo entre ordenhas. Entretanto, após três horas de estocagem, em ambos os modelos de tanque as temperaturas médias do leite estocado encontravam-

se abaixo dos 4°C, conforme estabelece a IN 62, contribuindo para a manutenção da CBT e da CBP ao longo do período de armazenamento. Estes resultados divergem de estudo realizado no Cerrado Goiano (SILVA et al., 2009), no qual a temperatura média do leite acima do estabelecido pela IN 62 (BRASIL, 2011).

Figura 3 Temperatura média do leite durante as ordenhas (início e final de cada ordenha) e intervalo de ordenhas (após o final da ordenha e próximo a três horas após a ordenha) em tanques de expansão modelos de duas e quatro ordenhas.



Fonte: produção do próprio autor

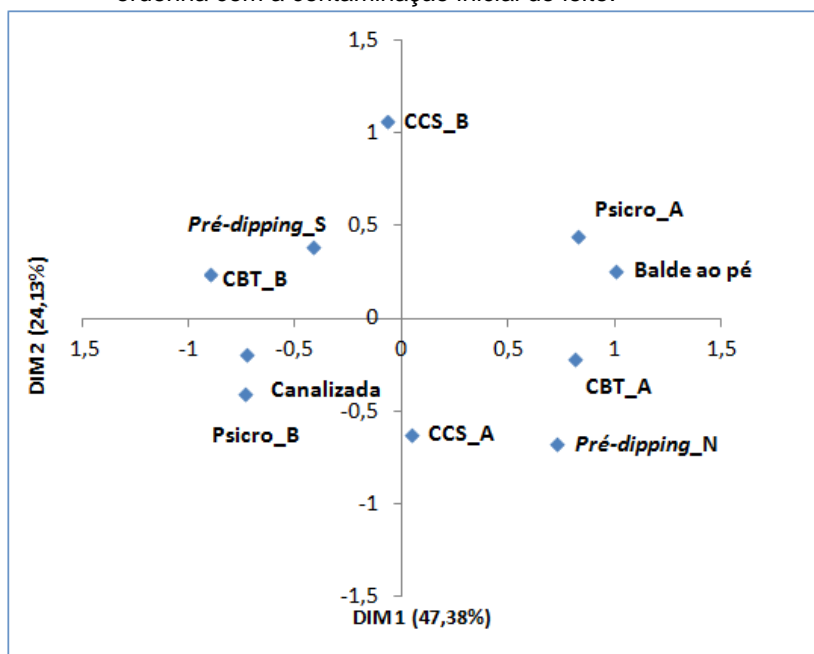
*Valores com sinal negativo referem-se a minutos para o término da ordenha.

A relação entre algumas técnicas de manejo de ordenha e de indicadores relacionada à infraestrutura para ordenha com a contaminação inicial estão apresentados na Figura 4. As duas dimensões formadas na análise de correspondência múltipla explicaram 71,51% da variação total.

A CBP e CBT inicial apresentaram relação próxima entre si, tanto altas como baixas contaminações do leite. Dentre os fatores avaliados, a baixa CBP e CBT inicial dos tanques de expansão direta apresentaram relação com a existência de uma infraestrutura mais adequada para ordenha, representada pela disponibilidade de ordenha canalizada.

Um manejo mais adequado no momento da preparação do úbere, através da aplicação de *pre-dipping* apresentou relação com baixa CBP, CBT e CCS inicial do tanque de expansão direta. Relações inversas também ocorreram para elevada CBT e CBP.

Figura 4 Gráfico de correspondência entre técnicas de manejo de ordenha e indicadores relacionados à infraestrutura para ordenha com a contaminação inicial do leite.



Fonte: produção do próprio autor

Legenda: Ordenha canalizada (canalizada), ordenha balde ao pé (balde ao pé), contagem de micro-organismos psicrotróficos (psicro), contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS); sim (S), não (N), baixa (B), alta (A).

A ordenha canalizada quando higienizada de forma adequada minimiza o contato do leite com micro-organismos provenientes do ambiente e otimiza o tempo para resfriamento da matéria prima na propriedade leiteira (CITADIN et al., 2009). Taffarel et al. (2013), atribuiu a alta qualidade microbiológica do leite da região Oeste do Paraná a utilização de ordenha canalizada e de sistema de resfriamento a granel e Citadin et al. (2009) atribuíram a melhor qualidade do leite a propriedades que utilizavam ordenha mecânica canalizada, visto que minimiza o contato direto da matéria prima com possíveis contaminantes.

A superfície do teto veicula micro-organismos contaminantes causadores de mastite e aumenta a contagem de micro-organismos no leite cru, portanto a utilização do *pre-dipping* higieniza o teto e impede a ascensão de micro-organismos patogênicos, os quais gerariam aumento da CCS devido ao processo inflamatório. A avaliação da qualidade microbiológica de leite cru estocado em tanques de expansão realizada por ELMOSLEMANY et al. (2010), evidenciou que a quantidade de sujidade nos tetos antes da preparação para a ordenha foi positivamente relacionada à contagem de micro-organismos psicrotóxicos e aeróbios totais, assim como, a aplicação de *pre-dipping* reduziu a contagem de bacteriana. Produtores que afirmaram aplicar *pre-dipping* apresentaram melhores resultados ($P < 0,01$) para a CBT no leite cru refrigerado. Da mesma forma, em outro trabalho a aplicação de boas práticas, em propriedades com ordenha mecânica, as quais incluíam descarte dos três primeiros jatos de leite, lavagem dos utensílios de ordenha e *pre-dipping*, resultou em redução média de CBT e CCS de 86,99% e 51,85%, respectivamente (VALLIN et al., 2009). A avaliação da associação de práticas de manejo determinou um efeito significativo da aplicação de procedimentos pré-ordenha sob a redução da CCS do leite cru refrigerado (GOODGER et al., 1993).

4.5 CONCLUSÃO

Resfriadores por expansão direta de quatro ordenhas apresentam valores de CBP superiores ao modelo de duas ordenhas. Entretanto ambos os modelos de resfriadores quando utilizados dentro de suas especificações quanto ao volume de leite a ser resfriado, permitem a manutenção da qualidade microbiológica do leite em termos de contagem bacteriana total (CBT) e contagem total de bactérias psicrotóxicas (CBP) ao longo do tempo, em sistemas de transporte a granel do leite ao laticínio a cada 48 horas.

A contagem inicial de micro-organismos no leite cru apresenta elevada importância para a qualidade microbiológica final da matéria prima.

REFERÊNCIAS

- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p.440-446, 2006.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.D.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANG, C.C.; MAGALHÃES, M.M.D.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p.2250-2255, 2008.
- ARCURI, E.F.; TAVARES, W.P.P.; PEREIRA, D.B.C.; BRITO, M.A.V.P. Bactérias Psicrotróficas proteolíticas: efeito na estabilidade do leite refrigerado ao etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21.,1. 2004. Juiz de Fora: Revista do ILCT. **ANAIS...** 2004.
- BRASIL. ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E.; INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, D. D. D. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 251,p. 6-11, seção 1, 2011.
- CATANIO, F.S.; INAY, O.M.; SILVA, A.S.D.; PEREIRA, J.R.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, M.D.R.; SOUZA, C.H.B.D.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; SANTANA, E.H.W.D. Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p.3171-3180, 2012.
- CBQL. **Tanques de refrigeração: recomendações do comitê de equipamentos/Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite**. São Paulo: Quiron. 2006
- CHAMPAGNE, C.P.; R. R. LAING; ROY, D.; MAFU, A.A. Psychrotrops in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p.1-30, 1994.
- CITADIN, Â.S.; POZZA, M.S.D.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v. 10, n. 1, p.52-59, 2009.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; VAN HOORDE, K.; MESSENS, W.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p.460-70, 2011.

ECKSTEIN, I.I.; POZZA, M.S.D.S.; TSUTSUMI, C.Y.; POZZA, P.C.; SABEDOT, M.A.; WOBETO, J.R. COMPOSIÇÃO E QUALIDADE DO LEITE EM DIFERENTES TIPOS E TEMPOS DE RESFRIAMENTO. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, 2013.

ELMOSLEMANY, A.M.; KEEFE, G.P.; DOHOO, I.R.; WICHTEL, J.J.; STRYHN, H.; DINGWELL, R.T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p.32-40, 2010.

FRÜHLING, S.W. **Modelagem matemática do crescimento bacteriano no leite cru**. Departamento de Ciências Exatas e Engenharia UNIJUI, Ijuí, 2013. 80 p. (Dissertação)

GOODGER, W.J.; FARVER, T.; PELLETIER, J.; JOHNSON, P.; DESNAYER, G.; GALLAND, J. The association of milking management practices with bulk tank somatic cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, p.235-251, 1993.

GUERRA, M.G.; JÚNIOR, J.G.B.G.; RANGEL, A.H.D.N.; ARAÚJO, V.M.D.; GUILHERMINO, M.M.; NOVAES, L.P. DISPONIBILIDADE E QUALIDADE DA ÁGUA NA PRODUÇÃO DE LEITE. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, p.230-235, 2011.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.D.S.M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**, v. 29, p.216-222, 2005.

JOÃO, J.H.; ROSA, C.A.D.V.L.; NETO, A.T.; PICININ, L.C.A.; FUCK, J.J.; MARIN, G. Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense, Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n.1, p.9-15, 2010.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; JACOBI, S.; WEISBLIT, L.; BERNSTEIN, S.; MERIN, U. The influence of storage on the farm

and in dairy silos on milk quality for cheese production.

International Dairy Journal, v. 18, p.109-113, 2008.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** . Departamento de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 71 p. (Dissertação)

NERO, L.A.; VIÇOSA, G.N.; PEREIRA, F.E.V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 2, p.386-390, 2009.

NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6628-34, 2002.

NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p.41-46, 2010.

PAGNO, J.T.; GODOI, C.C.D.; MARTINS, A.D.S.; PEDROSA, V.B.; HORST, J.A.; WARKENTIN, M. Influência do transporte do leite a granel sobre a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado correlação entre tempo de coleta contagem bacteriana total. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE – CBQL, 5.2013. Águas de Lindóia **ANAIS...** 2013.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite.** Pirassununga: Manole. 2007

SANTOS, P.A.; SILVA, M.A.P.; ANASTÁCIO, P.I.B.; ISEPON, J.S.; NICOLAU, E.S. QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO ESTOCADO POR DIFERENTES PERÍODOS. **Revista Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 364, p.36-41, 2008.

SANTOS, P.A.D. **Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de goiás estocado por**

diferentes períodos. Higiene e Tecnologia de Alimentos, UFG, GOIÂNIA, 2008. (Tese)

SAS. INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. Versão 8.2. Cary NC: Sas Institute, Inc. v. I, II e III., v., 2005.

SILVA, M.A.P.D.; SANTOS, P.A.D.; ISEPON, J.D.S.; REZENDE, C.S.M.E.; LAGE, M.E.; NICOLAU, E.S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** v. 68, n. 3, p.373-380, 2009.

SILVA, N.D.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.D.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.D.; GOMES, R.A.R. **Análises microbiológicas de alimentos e água.** São Paulo: Livraria Varela Editora. 2010

SOUZA, A.A.M.D.; BAJALUK, S.A.B.; PAGLIARINI, G.A.; ROYER, R.C.F. Efeito de fatores relacionados a qualidade da água sobre a contagem bacteriana total e contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros do oeste de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE DO CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 5. 2013. Águas de Lindoia **ANAIS...** 213.

TAFFAREL, L.E.; COSTA, P.B.; OLIVEIRA, N.T.E.D.; BRAGA, G.C.; ZONIN, W.J. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p.07-11, 2013.

VALLIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.D.; SILVA, L.C.C.D. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p.181-188, 2009.

VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v. 42, p.730-736, 2012.

WERNCKE, D. **PERFIL DAS PROPRIEDADES E OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NA REGIÃO DO VALE DO BRAÇO DO NORTE, SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA.** Produção Animal UDESC, Lages, 2012. 61 p. (Dissertação)

5 EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS NO LEITE CRU REFRIGERADO SOBRE A ESTABILIDADE DA CASEÍNA AO TESTE DO ÁLCOOL

5 THE EFFECT OF THE LENGTH OF TIME OF RAW MILK COLD STORAGE AND THE PSYCHROTROPHIC BACTERIAL COUNT IN THE CASEIN STABILITY IN THE ALCOHOL TEST.

RESUMO

A implementação do resfriamento obrigatório na propriedade rural minimizou a ocorrência de leite ácido e alterou o foco da qualidade do leite para o controle de micro-organismos psicrotóxicos, principalmente, proteolíticos. Esses micro-organismos agem principalmente na fração κ da caseína alterando a estabilidade da solução coloidal, podendo causar precipitação do leite no teste do álcool, sendo possível causador de leite instável não ácido (LINA). O estudo objetivou avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite em tanques de resfriamento por expansão direta e da contagem de bactérias psicrotóxicas no leite cru refrigerado sobre a estabilidade da caseína ao teste do álcool. As avaliações foram conduzidas em 12 propriedades leiteiras localizadas em duas mesorregiões de Santa Catarina, as quais possuíam equipamentos de refrigeração do leite por expansão direta, com taxa de ocupação variando de 60 a 100% e armazenavam o leite de quatro ordenhas para a entrega de leite a granel. Antes e após cada ordenha foram coletadas amostras de leite para contagem de bactérias psicrotóxicas (CBP), caseína e análises físico-químicas, as quais incluíam pH, acidez titulável e teste do álcool. Sendo que, o teste do álcool foi aplicado em concentrações alcoólicas variando de 64 a 84°GL com intervalos de 2°GL, sendo classificado como LINA as amostras que precipitaram em concentração $\leq 72^\circ\text{GL}$. As amostras de caseína foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CBP não afetou as frações de caseína, entretanto, o tempo de estocagem do leite cru afetou ($P < 0,05$) a concentração das frações κ e β da caseína. A redução das frações de caseína não demonstrou efeito sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool. O tempo de estocagem reduziu ($P < 0,05$) a estabilidade

do leite ao teste do álcool, sem alterar a ocorrência de LINA. Os resultados demonstraram que o tempo de estocagem do leite é fator determinante na degradação das frações de caseína e na redução da estabilidade da micela de caseína independentemente do valor de CBP e CCS.

Palavras-chaves: cromatografia líquida de alta eficiência. κ -caseína. leite instável não ácido. proteólise.

ABSTRACT

The compulsory cold storage of raw milk in dairy farms reduced the occurrence of acid milk, however it create a new concern about psychrotrophic microorganisms, mainly those with proteolytic action. These microorganisms affects κ casein fraction, that destabilizes the colloidal solution, may causing the casein precipitation in the alcohol test. This destabilization could lead to unstable non-acid milk. The purpose of this study was to evaluate de effect of the length of time of raw milk cold storage in bulk tanks and psychrotrophic bacterial total count influence on casein stability in the alcohol test. A total of 12 dairy farms, located in two regions of the Santa Catarina State, had been evaluated. Each dairy farm had direct expansion bulk milk tank and an occupancy rate varying from 60% to 100%. Samples were collected before and after each milking procedure to determine the psychrotrophic bacterial count (PBC), casein quantification and physical-chemical analysis, totalizing 4 milking. The alcohol test was conducted in concentrations varying from 64 to 84°GL with 2°GL increase. Samples were classified as unstable non-acid milk when a precipitation occurred in alcohol concentrations $\geq 72^\circ\text{GL}$. The total casein was quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The PBC did not affect the caseins fraction, however the length of time of cold storage of raw milk affected ($P < 0,05$) the κ 's casein fraction concentration. The reduction of casein fractions did not demonstrate an effect on casein stability in the alcohol test. The cold storage length of time affected ($P < 0,05$) the casein stability in alcohol test without affecting the unstable non-acid milk occurrence. The results demonstrate the importance of cold storage time in the final milk quality.

Keywords: κ -casein. liquid chromatographic and high efficiency. proteolysis. unstable non acid milk..

5.1 INTRODUÇÃO

A utilização do resfriamento, combinado com longos períodos de estocagem do leite, inibe a microbiota mesófila acidificante e favorece a seleção e multiplicação de microorganismos psicotróficos, os quais têm ação proteolítica e lipolítica. A proteólise por bactérias psicotróficas, segundo Celestino (1997), é significativa quando sua população excede 10^6 UFC/mL, afetando principalmente a caseína, a qual representa aproximadamente 80% da proteína total do leite (BONIZZI;BUFFONI;FELIGINI, 2009). A micela de caseína é composta por submicelas com interações hidrofóbicas (α e β -caseína) e hidrofílicas (κ -caseína) unidas por um “cimento” de fosfato de cálcio coloidal (FOX;MCSWEENEY, 1998).

As proteases das bactérias psicotróficas podem agir sobre diversos sítios de clivagem na caseína, tendo preferência pela fração κ da caseína (NÖMBERG;TONDO;BARNDELLI, 2009), atuando de forma semelhante à quimosina, liberando o pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP)(MOTTA, 2013), a qual afeta principalmente o rendimento na produção de queijos e propriedades sensoriais do leite UHT (DATTA;DEETH, 2001; NÖRNBERG et al., 2010).

O teste do álcool é ainda o principal método de triagem utilizado para avaliar a estabilidade térmica da micela de caseína, uma vez que o aumento na concentração alcoólica reduz a constante dielétrica da solução coloidal, determinando uma menor capacidade de repulsão entre as micelas de caseína, as quais precipitam (NEGRI, 2002). A caseína pode ter sua estabilidade afetada mesmo com uma acidez adquirida considerada normal, síndrome conhecida como leite instável não ácido (LINA), o qual é um problema de origem multifatorial com informações científicas ainda escassas (RIBEIRO;BARBOSA, 2009).

Recentemente, Barbosa et al. (2012), observaram que as micelas de caseína das amostras positivas para LINA apresentavam em sua composição menor concentração de κ -caseína e maiores concentrações de β -caseína e de proteínas totais. Visto que a κ caseína é a parte hidrofílica responsável pela estabilidade da micela na solução coloidal, a degradação desta

resulta na exposição da parte hidrofóbica da micela podendo ser um fator desencadeador de LINA.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite em tanques de resfriamento por expansão e da contagem de bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado sobre a estabilidade da caseína ao teste do álcool.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta das amostras

As avaliações foram conduzidas em 12 propriedades leiteiras em duas mesorregiões de Santa Catarina (Meio-oeste e Serrana), as quais possuíam equipamentos de refrigeração do leite através de expansão direta com taxa de ocupação variando de 60% a 100% da sua capacidade nominal.

As amostras de leite para análise de caseína, CBP e, físico-químico foram coletadas após a 1^o ordenha e consecutivamente antes e após a 2^o, 3^o e 4^o ordenhas, totalizando sete coletas de amostras em cada propriedade, e, um conjunto total de 84 amostras de leite. Em sequência as amostras foram acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável até chegarem ao laboratório.

No laboratório as amostras para CBP, acidez, álcool e pH foram imediatamente analisadas, enquanto que as amostras de composição e caseína foram respectivamente, acondicionadas em geladeira até o momento de envio para o laboratório da Universidade do Contestado (UnC/CIDASC) em Concórdia – SC e armazenadas a -20°C em congelador.

5.2.2 Análises Físico-químicas

A determinação da acidez titulável, pH e estabilidade da caseína ao álcool seguiu a metodologia preconizada pela IN 68 (BRASIL, 2006). No teste de estabilidade da caseína na presença de álcool etílico foi realizada concentrações crescentes de álcool etílico de 64-84° GL com intervalos de 2°GL, foi considerado LINA o leite que precipitou em concentração $\leq 72^\circ$ GL. As amostras para avaliação da composição e CCS do leite foram determinadas respectivamente pelos métodos de infravermelho (equipamento: *Bentley Combisystem e Delta Combiscope*) e citômetria de fluxo

(*Equipamento Bentley Combisystem e Delta Combiscope*) no laboratório da Universidade do Contestado (UnC/CIDASC) em Concórdia – SC.

5.2.3 Análise microbiológica

No laboratório do NUTA/UEDESC as amostras para contagem de bactérias psicrotróficas (CBP) foram diluídas em solução salina a 0,9%, sendo que de cada diluição seriada, uma alíquota de 0,1mL foi plaqueada, em triplicata, através do espalhamento em superfície no Ágar padrão para contagem (PCA) com o auxílio de uma alça de Drigaslky (FAGAN et al., 2010). As placas inoculadas foram incubadas a 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias. Após este período, as colônias formadas foram enumeradas, o valor obtido foi multiplicado pela recíproca da diluição correspondente e os resultados finais expressos em UFC/mL.

5.2.4 Quantificação de caseína

As análises foram realizadas no laboratório Lanagro RS/SLAV/POA do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em São José, Santa Catarina. A metodologia utilizada foi a proposta por Bonizzi (2009), com pequenas adaptações. Inicialmente foi construída uma curva de calibração, para a qual foi realizada a dissolução das frações padrões purificadas da marca Sigma Aldrich, sendo 62,5 mg de α -caseína, 62,5 mg de β -caseína e 12,5 mg de K-caseína, dissolvidas em 2,5 mL de solução de desnaturação composta de uréia 8 M, Tris 165 mM, citrato de sódio 44 mM e de β -mercaptoetanol 0,3% (v/v). Na sequência uma solução padrão mista foi preparada com 1 mL de cada solução padrão simples de α , β e K caseína somada a 2 mL de solução de desnaturação, aplicando-se um fator de diluição 5 para cada fração de caseína. Para montar a curva de calibração foram utilizados 4 pontos seguindo a diluição apresentada na tabela 2, sendo que o valor final da concentração dos padrões foram corrigidos conforme a pureza apresentada, a qual foi de 70%, 98% e 70% para α , β , K, respectivamente.

Tabela 2 Curva de calibração e concentração final do padrão de κ , α e β caseína.

Curva	Esquema de diluição (mL)		Concentração das frações de caseína (g/L)		
	Solução padrão	Solução Desnaturante	κ (70%)	α (70%)	β (98%)
1	0,2	0,8	0,14	0,56	0,784
2	0,4	0,6	0,28	1,12	1,568
3	0,6	0,4	0,42	1,68	2,352
4	0,8	0,2	0,56	2,24	3,136

Fonte: produção do próprio autor

As amostras de leite foram descongeladas em temperatura a 25°C em banho-maria e a gordura foi removida após centrifugação de 1000 x g por 10 min na temperatura de 4°C, em sequência uma alíquota de 0,2mL do leite desnatado foi diluído em 0,8 mL de solução de ureia e filtrada em membrana de celulose com poro de 0.45- μ m.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo as leituras realizadas em arranjo de fotodiodos com comprimento de onda 214 nm. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna C8 (250 mmx 4.6 mm, 5 μ m; Thermo Scientific) em temperatura de 20°C, na qual foi injetada 20 μ l da amostra.

A fase móvel foi composta por meio de um perfil de misturas binárias de solventes A e (B grau HPLC), sendo A, constituído de água com ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e B, de acetonitrila com ácido trifluoroacético 0,1% (v/v). A eluição foi programada com fluxo de 0,8 mL/min seguindo a seguinte programação de 0–1 min 30% de B; 1–40 min 50% de B; 40–43 min 100% de B; 43–46 min 30% de B, seguido de 5-min da condição inicial, com duração de 51 min por avaliação.

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, com medidas repetidas no tempo dentro de cada rebanho, utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS, 2005). A normalidade dos resíduos foi previamente testada, empregando-se o teste de Shapiro Wilks. Foram avaliados as concentrações dos componentes do leite a partir de aproximadamente 12 horas de armazenamento (antes da segunda ordenha) e as concentrações das amostras coletadas na primeira ordenha consideradas como contaminação inicial para CBT e CBP, sendo as mesmas utilizadas como covariável. No modelo estatístico para percentagem de caseína e suas frações, proteína total, relação caseína/proteína, de gordura e lactose foram incluídas as variáveis explanatórias tempo de armazenamento (12, 24 ou 36 horas), momento de coleta (antes ou após a ordenha) e sua interação com tempo de armazenamento, além das covariáveis concentração de cada componente antes do armazenamento (imediatamente após a primeira ordenha), CCS (\log_{10}) e contagem de bactérias psicrotróficas (\log_{10}). Para a análise da estabilidade ao teste do álcool foram incluídas no modelo as variáveis tempo de armazenamento, momento de coleta e sua interação com tempo de armazenamento e as covariáveis concentração de álcool antes do armazenamento, CCS (\log_{10}), contagem de bactérias psicrotróficas (\log_{10}) e as concentrações das frações de caseína no leite (α , β ou κ caseína).

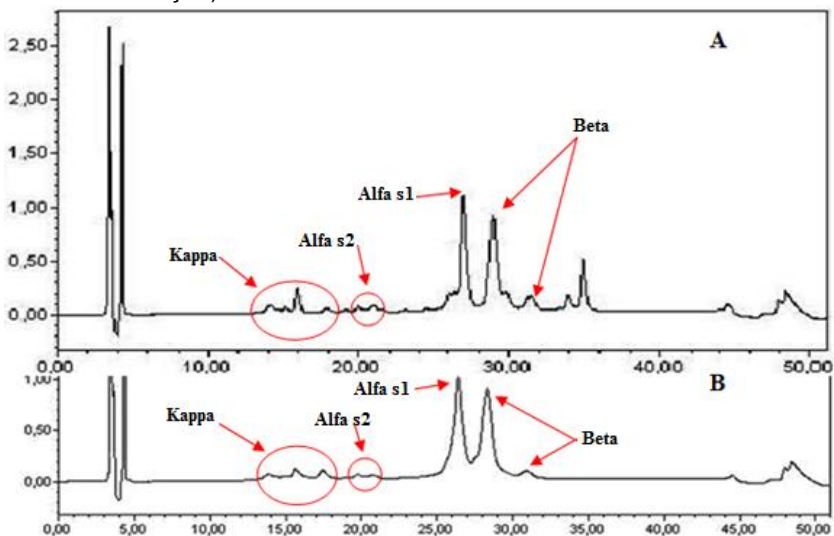
As análises para a variável binária LINA foi avaliada através de um modelo linear generalizado, com distribuição binomial (regressão logística), utilizando-se o procedimento GENMOD do pacote estatístico SAS. Os modelos estatísticos foram análogos aos empregados para avaliar a estabilidade ao teste do álcool.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tempos de retenção padrão obtidos para α_1 , α_2 , β e κ -caseína por CLAE foram 26,02 min, 20,52 min, 28,46 min e 13,9 min, respectivamente (Figura 5). As concentrações médias de α , β e κ caseína em relação à caseína total das amostras de leite foram de 35,57%, 51,29% e 13,13%, respectivamente, sendo que a caseína representou em média 83% da proteína total, valor que

está em acordo com o relatado por outros autores (aproximadamente 80%) (SGARBIERI, 2005; BONIZZI;BUFFONI;FELIGINI, 2009). Essa relação é de suma importância, uma vez que a redução da caseína nem sempre cursa com a redução da proteína total (SANTOS;FONSECA, 2007; FREITAS et al., 2009). Desta forma, o pagamento de incentivos de qualidade do leite pelo aumento do valor da composição no leite deveria estar vinculado a quantificação da caseína.

Figura 5 Cromatograma A - amostra de leite cru; Cromatograma B - curva padrão a partir do mix de κ , α , e β caseína na concentração de 0,6 mL para 0,4 mL de solução desnaturante (ponto 4 da curva de calibração).



Fonte: produção do próprio autor

A CCS (média de 505.000 cél/mL) não afetou ($P > 0,05$) as frações de caseína α , β e κ e os demais componentes do leite ao longo do tempo de armazenamento. Esses resultados corroboram com Corassin; Rosim e Oliveira (2010), os quais não encontram relação entre a CCS e atividade de plasmina e plasminogênio em leite UHT (CORASSIN;ROSIM;OLIVEIRA, 2010). Mas contrariou os trabalhos que demonstraram relação entre o aumento da CCS e a redução da β -caseína e α S1-caseína

da caseína (FOX;KELLY, 2006; FERNANDES et al., 2008; CORASSIN et al., 2013). Da mesma forma, FOX e KELLY (FOX;KELLY, 2006), descreveu o efeito da CCS sobre a caseína como oriundo da atividade da plasmina, plasminogênio e fatores de ativação, os quais se encontram em maior concentração na glândula mamária durante processos mastíticos e na lactação avançada (FERNANDES et al., 2008), sendo a plasmina é uma protease sanguínea com ação proteolítica (DATTA;DEETH, 2003;).No presente trabalho a coleta após a primeira ordenha foi avaliada como covariável na análise estatística, o efeito da CCS média no tanque de expansão direta está relacionado somente ao período de estocagem do leite, excluindo o efeito a nível de célula secretora da glândula mamária.

A contagem de bactérias psicotróficas (média de 31.300 UFC/mL) não afetou ($P > 0,05$) as concentrações de α , β e κ da caseína, visto que a atividade proteolítica pode ser consequência da ação de determinadas linhagens de bactérias psicotróficas, as quais podem ter apresentado alto potencial proteolítico mesmo que numericamente reduzidas. Resultados que corroboram ao estudo realizado com leite cru refrigerado em laticínios no Rio Grande do Sul, no qual a CBP não apresentou relação com a atividade proteolítica (NÖRNBERG;TONDO;BRADELLO, 2009).

Entretanto, de acordo com Celestino et al. (1997), a proteólise por micro-organismos psicotróficos é significativa quando sua população excede 10^6 UFC/mL, fator o qual pode ter determinado ausência de relação entre CBP e redução da caseína no presente trabalho, visto que a média de CBP foi de apenas 31.300 UFC/mL. A redução da vida de prateleira do leite UHT vem sendo relacionada com a alta contagem inicial de micro-organismos psicotróficos presentes no leite cru, visto que essa microbiota é capaz de produzir enzimas extracelulares, as quais permanecem ativas após o tratamento térmico (ZENI et al., 2013). Da mesma forma a avaliação de leite UHT estocado por 120 dias demonstrou relação direta entre a CBP e a degradação de κ -caseína (FERNANDES et al., 2012).

O tempo de estocagem do leite cru afetou o teor de κ e β -caseína do leite ($P < 0,05$) (Tabela 3), evidenciando que o tempo disponível para ação de enzimas proteolíticas sobre a β -caseína e κ -caseína é mais importante do que o valor da CCS ou da quantidade de bactérias psicotrófica presentes. Corassin et al. (2010), em um estudo realizado com conservação de leite UHT,

observaram que o tempo de estocagem afeta a atividade da plasmina e do plasminogênio independente da valor da CCS. Assim como a degradação da κ -caseína pode estar relacionada ao tempo de ação das enzimas proteolíticas, visto que a algumas cepas de micro-organismos psicrotróficos apresentam alta capacidade proteolítica mesmo que numericamente reduzida.

A degradação das frações de caseína em função do tempo de estocagem refletiu na redução ($P < 0,05$) da caseína total e da proteína total do leite. Observa-se na Tabela 3 que a intensidade de degradação da caseína foi consideravelmente superior à da degradação da proteína total. Em função disto observou-se uma tendência ($P = 0,07$) em reduzir a proporção de caseína em relação a proteína total. A redução da caseína gera perda nutritiva ao leite e prejuízo econômico à indústria láctea, especialmente devido à redução do rendimento industrial em derivados lácteos (SGARBIERI, 2005).

O tempo de armazenamento não afetou ($P > 0,05$) os teores de gordura e lactose do leite (Tabela 3), demonstrando que os efeitos do armazenamento foram restritos às frações protéicas.

Tabela 3 Médias dos quadrados mínimos±erros-padrão para percentagem de caseína e suas frações, proteína total, relação caseína/proteína, de gordura e lactose em função do tempo de estocagem do leite cru em tanques de expansão direta.

Variável	Tempo de armazenamento (horas)		
	12	24	36
α -Caseína	0,96±0,029 a	0,97±0,029 a	0,95±0,029 a
β -Caseína	1,30±0,034 a	1,27±0,034 ab	1,22±0,035 b
κ -Caseína	0,36±0,013 a	0,36±0,013 ab	0,34±0,013 b
Caseína total	2,61±0,051 a	2,59±0,051 ab	2,51±0,052 b
Proteína total	3,26±0,013 a	3,25±0,013 ab	3,24±0,013 b
Relação Caseína/ Proteína	80,51±1,374 a	79,75±1,380 ab	77,60±1,399 b
Gordura	3,76±0,032 a	3,74±0,032 a	3,72±0,032 a
Lactose	4,49±0,016 a	4,51±0,016 a	4,51 a

Fonte: produção do próprio autor

O tempo de estocagem do leite afetou a concentração de álcool em que o leite coagulou no teste do álcool (Tabela 4). Observou-se uma tendência de redução na concentração de álcool com o avanço do tempo de armazenagem, mas apenas o leite com 24 horas de armazenamento diminuiu significativamente a concentração de álcool em relação ao leite com 12 horas de armazenamento, demonstrando uma menor estabilidade térmica, sendo que o percentual de amostras positivas para LINA não foi afetado pelo tempo de armazenamento (Tabela 3).

A coleta realizada depois da ordenha (leite recém ordenhado) reduziu a estabilidade do leite ao teste do álcool ($P < 0,05$). O leite recém-ordenhado apresenta maior concentração de dióxido de carbono (CO_2), o qual tem ação acidificante (RISSI, 2007) resultando em aumento da atividade do íon cálcio (Ca^{2+}) que reduz a repulsão entre caseínas carregadas negativamente (PAULA et al., 2012). Entretanto a concentração de CO_2 no leite recém ordenhado não justifica a perda de estabilidade nesse estudo, visto que o pH e a acidez do leite não foram afetados pelo tempo de estocagem e momento da coleta .

Tabela 4 Efeito do tempo de estocagem do leite e momento da coleta sobre a prova do álcool.

Variável	Classe	Concentração de álcool (° GL)	LINA (%)	Acidez	pH
Tempo de armazenamento	12 horas	79,15±0,550 a	12,50 a	15,13 a	6,81 a
	24 horas	77,64±0,538 b	8,33 a	15,09 a	6,83 a
	36 horas	78,90±0,539 a	8,33 a	15,03 a	6,84 a
Coleta da amostra	antes da ordenha	79,12±0,504 a	8,33 a	15,05 a	6,83 a
	depois da ordenha	78,01±0,509 b	11,11 a	15,12 a	6,82 a

Fonte: produção do próprio autor

A caseína e suas frações α , β e κ não afetaram a estabilidade do leite cru ao teste do álcool. Divergindo de um estudo recente, no qual as micelas de caseína das amostras positivas para LINA apresentavam em sua composição menor concentração de κ - caseína e maiores concentrações de β - caseína e de proteínas totais (BARBOSA et al., 2012). Desta forma, apesar da estocagem do leite cru reduzir a quantidade de caseína total e suas frações β e κ e o leite recém ordenhado apresentar menor resistência ao teste do álcool, existem outros fatores afetando a estabilidade da caseína ao teste do álcool, os quais não foram identificados no presente estudo.

5.4 CONCLUSÃO

O tempo de estocagem reduz a concentração de caseína total e de suas frações κ e β no leite. Entretanto, a redução da caseína total e de suas frações κ e β não alterou a estabilidade do leite ao teste do álcool.

Amostras de leite coletadas antes da ordenha apresentam maior estabilidade ao teste do álcool comparado às amostras após a mistura do leite recém ordenhado.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S.D. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.621-628, 2012.
- BARROS, L.; DENIS, N.; NÚÑES, A.; GONZÁLEZ, O.; GALAIN, C.; DE TORRES, E.; GONZÉLEZ, P. Variations of milk and alcohol test. In: XXI WORLD BUIATRICS CONGRESS2000. Punta del Este. **CD-ROM...** 2000.
- BONIZZI, I.; BUFFONI, J.N.; FELIGINI, M. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p.165-8, 2009.
- BRASIL. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Instrução normativa Nº 68, de 12 dezembro de 2006. In: BRASIL (Ed.). **Diário Oficial da União**. Brasília. 2006. p.141
- CELESTINO, E.L.; LYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted UHT-treated Milk: Effects of Raw Milk, Powder Quality and Storage Conditions of UHT Milk on its Physico-Chemical Attributes and Flavour. **International Dairy Journal**, v. 7, p.129-140, 1997.
- CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; KOBASHIGAWA, E.; FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Relação entre atividade de plasmina e frações de caseína durante o armazenamento do leite longa vida. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p.29-33, 2013.
- CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Atividade de plasmina e plasminogênio no leite longa vida com alta e baixa contagem de células somáticas durante o armazenamento. **Ciência Rural**, v. 40, p.2588-2592, 2010.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Age gelation of UHT milk: a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p.197-210, 2001.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 36, 2003.

FAGAN, E.P.; JOBIM, C.C.; CALIXTO JUNIOR, M.; SILVA, M.S.; SANTOS, G.T. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas leiteiras no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 32, n. 3 Maringá, p.309-316, 2010.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; PELUQUE, E.R., ROICE ELIANA; OLIVEIRA, C.A.F.D. Relação entre psicrotróficos e frações de caseína do leite longa vida durante o armazenamento. **UNOPAR Científica**, v. 4, p.227-230, 2012.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; ROSIM, R.E.; DE LIMA, C.G.; DE OLIVEIRA, C.A.F. Casein fractions of ultra high temperature milk with different somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, p.149-152, 2008.

FOX, P.; MCSWEENEY, P. **Dairy chemistry and biochemistry**. New York: Chapman & Hall. 1998. 470 p.e-book
<<http://books.google.com.br/books?id=6Q8mX8DsDe4C&prints=ec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>>.

FOX, P.F.; KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. **International Dairy Journal**, v. 16, p.500-516, 2006.

FREITAS, J.R.D.; FREITAS, W.R.; LIMA, R.D.S.; SILVA, M.S.J.D.; LIMA, R.T.; SOUZA, H.B.; LIMA, V.A.M. Avaliação do teor de caseína e albumina no leite de vacas da raça girolanda. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, p.42-49, 2009.

MOTTA, T.M.C. **Implementação de metodologia analítica para avaliação de adulteração de leite bovino por adição de soro de queijo por CLAE-EM/EM**. Química UFRGS, Porto Alegre, 2013. (Dissertação)

NEGRI, L.M.R. **Estudio de los factores físicos-químicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica**. Faculdade de Ingeniería Química, Universidade Nacional del Litoral, Santa Fé - Argentina, 2002. 180 p.

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

NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p.41-46, 2010.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-562, p.17-2, 2007.

PAULA, J.; CARVALHO, A.; RGB, C.; SOBRAL, D. O dióxido de carbono (CO₂) e seus efeitos tecnológicos no leite e em produtos lácteos. **Revista Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 67, p.11-21, 2012.

RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S. Avanços nas pesquisas do leite instável não ácido no Brasil. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL, 1. 2009. Passo Fundo. **CD-ROM...** 2009.

RISSI, L. **Estudo da incidência do leite instável não ácido (LINA) na região do vale do rio do sinos**. Centro universitário FEEVALE, Novo Hamburgo, 2007. (Mestrado)

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle de mastite e melhorias da qualidade do leite**. Pirassununga: Manole. 2007

SAS. **INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. Versão 8.2.** Cary NC: Sas Institute, Inc. v. I, II e III., v., 2005.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p.43-56, 2005.

ZENI, M.P.; MARAN, M.H.D.S.; SILVA, G.P.R.D.; CARLI, E.M.D.; PALEZI, S.C. Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência**, v. 4, p.71-75, 2013.

ANEXO**ANEXO I - QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO UTILIZADO NA PESQUISA****UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA –
UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL****Questionário de Pesquisa****Nº identificação propriedade** _____**Cidade** _____**Proprietário** _____ **Data:** __/__/__**Telefone** _____**1- PERFIL DO PRODUTOR/ RESPONSÁVEL PELA PRODUÇÃO****5.1- Número de pessoas que trabalham com o leite?**

- Um Dois três quatro cinco
 mais de cinco

5.2- Quem são as pessoas que efetuam a ordenha?

- Esposa
 Marido
 Esposa e Marido
 Marido e Filho (os)
 Filho (os)
 Outro integrante da família
 Funcionário
 Esposa e filho (os)
 Família

5.3- Há quantos anos trabalha na atividade?

- menos de 1 ano
 1 a 3 anos
 4 a 6 anos
 7 a 9 anos
 mais de 10 anos

5.4- Grau de escolaridade

- Ensino Fundamental completo incompleto
 Ensino médio completo incompleto
 Ensino superior completo incompleto
 Analfabeto

6-EQUIPAMENTOS DE ORDENHA**6.1- Manutenção de equipamentos de ordenha**

- Periódica _____
 Eventual/ quando há problema
 Não Faz

6.2- Modelo do tanque de expansão utilizado

- 2 ordenhas 4 ordenhas

6.3- Capacidade do tanque de expansão:

_____ litros

6.4- Média do volume de leite a cada ordenha:

_____ litros

6.5- Utiliza filtro no equipamento de ordenha?

- sim não

7- LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS

7.1- Há água quente para limpeza dos equipamentos?

() sim () não

7.2- É realizado controle da temperatura da água?

() sim () não

7.3- Qual tipo de aquecedor?

7.4- O equipamento é enxaguado com água morna após a ordenha até que a água sai limpa?

() sim () não

Como _____

7.5- É utilizado detergente alcalino na limpeza com água quente?

() sim () não

7.6- Realiza limpeza com detergente ácido?

() sim () não

Qual o intervalo?

8- DADOS DA PROPRIEDADE

8.1- A coleta de leite é realizada:

- Diariamente A cada 2 dias
 A cada 3 dias Outro: _____

8.2- Recebe bonificação do laticínio por qualidade do leite?

- sim não

8.3- Qual incentivo?

- volume %gordura %proteína
 CCS CBT Outro _____

8.4- Qual origem da água utilizada na propriedade?

- Rede de distribuição Poço artesiano
 Riacho Cisterna
 Outro: _____

8.5- A água passa por algum tratamento?

- sim não

Qual: _____

8.6- Já realizou análise da água?

- sim não

9- Como você faz o processo de ordenha? (usar 0 para o que não for feito)

- Lava as mãos antes de iniciar a ordenha.
- Como: _____
- Faz o teste da caneca de fundo preto.

- () Elimina os primeiros jatos no caneco de fundo preto.
- () Lava/ limpa os tetos.
 - Como: _____
- () Seca os tetos.
 - Como: _____
- () Utiliza pré-imersão (pre-dipping).
 - Qual desinfetante: _____
- () Desinfeta as tetas após a ordenha (pós-dipping).
 - Qual desinfetante: _____
- () Resfria imediatamente o leite.

Observações:
