

JOANA GERENT VOGES

Qualidade microbiológica da água e do leite e ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto
Co-orientadora: Prof^a Dra Daniele C. da Silva Kazama.

**LAGES
2015**

Voges, Joana Gerent

Qualidade microbiológica da água e do leite e ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina / Joana Gerent Voges - Lages, 2015.

99 p. : il. ; 21 cm

Orientador: André Thaler Neto

Inclui bibliografia

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Bactérias psicrotroficas. 2. Caseinomacropéptido. 3. Alimentação animal. 4. Infra-estrutura da propriedade. 5. Teste do álcool. I. Voges, Joana Gerent. II. Thaler Neto, André. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

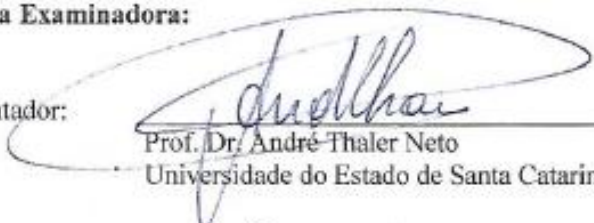
JOANA GERENT VOGES

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E DO LEITE E
OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA) EM
PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR DO
PLANALTO NORTE DE SANTA CATARINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

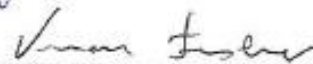
Banca Examinadora:

Orientador:




Prof. Dr. André Thaler Neto
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:



Profª Dra. Vivian Fischer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Membro:



Profª Dra. Lídia Cristina Almeida Picinin
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 29/06/2015

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer primeiramente aos meus pais Salézio e Sandra, que além de me darem a vida, me deram tudo o que sou hoje. Por isso, todas as minhas conquistas serão sempre dedicadas primeiramente a eles, que souberam me dar amor e me ensinar a viver com tanto carinho e dignidade. Agradeço também às minhas irmãs Edoarda e Roberta, que são a base do meu ser, sei que tenho um pouquinho de cada uma em mim. Aos meus cunhados Humberto e Tiago, presentes na minha vida a tanto tempo, me mimando e me apoiando. Família, seus conselhos e apoio foram a minha força para seguir em frente nos momentos difíceis.

Vítor, só agradecer é muito pouco por todo apoio que me destes. Por suportar todos os choros, as irritações e as angústias. Por ser meu porto seguro e sempre estar ali para dizer: “vais conseguir, sim!”. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma e ser tão paciente. Mais do que meu amor e meu companheiro pra tudo, você foi o meu melhor ombro amigo.

Às minhas melhores amigas, Karla, Patrícia, Taymara e Virgínia, que há 13 anos estão comigo pro que der e vier e que me apoiam em qualquer que seja a minha decisão. Mesmo que a vida nos leve pra caminhos diferentes, nosso laço de amizade nos une.

Agradeço também à minha colega e amiga Nadine, pois, sem ela, meu projeto não existiria. Obrigada por todo esforço e dedicação para que o experimento desse certo, mesmo com todos os problemas que surgiram. Aprendi muito com você, não só na parte acadêmica, sua generosidade me inspira. Obrigada por todas as estadias, por ceder o teu tempo, as tuas férias e até a tua casa por essa pesquisa. Aproveito para agradecer à família da Nadine, em especial à sua mãe, por toda a disponibilidade e carinho. Agradeço à minha colega e amiga Natália, que sempre me incentivou e sempre esteve disposta a me ajudar em tudo. Obrigada por todas as boas idéias que me destes e pelos caminhos que me abristes. O resultado deste projeto não seria o mesmo sem a sua ajuda. Meninas me desculpem por dar tanto trabalho a vocês, sei que trabalhar na neve não é fácil!

Obrigada, Angela, pelas estadias, por todas as conversas e por me auxiliar em tudo o que eu te pedi até hoje. Agradeço também aos outros colegas da UDESC, Fernando, Deise e Guilherme, que foram

essenciais nas coletas, pela disponibilidade e comprometimento com o trabalho. Agradeço também à colega Dileta pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas da UFSC, Luan, Nathália, Bruna, Camila, Guilherme, Ana, e todos os outros que se envolveram neste projeto e entenderam a importância da inclusão da minha dissertação no todo. Obrigada em especial ao Luan, que tornou o trabalho em sua companhia sempre agradável e divertido.

À Sissi e à Fernanda, minhas companheiras de Porto Alegre, que me incentivaram nesta última etapa de dissertação, em especial à Fernanda que conseguiu fazer com que eu recuperasse os dados do computador nesta reta final.

Obrigada à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento do estudo e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Um agradecimento especial aos produtores rurais das cooperativas CAFLEMAV, COAFAPA e COOPERLEITE pela colaboração no estudo e pelo propósito de se aperfeiçoarem a partir dos resultados da pesquisa. À pesquisadora Ana Lúcia Hanisch, da Epagri de Canoinhas, pela mediação com as cooperativas e com a Epagri para alojamento e locais para realizar as análises laboratoriais.

Obrigada ao pesquisador Heitor Daguer do MAPA por possibilitar a realização de análises importantes ao trabalho e ao pessoal do LANAGRO pelo monitoramento na realização das mesmas.

Muito obrigada à professora Loredana D'Ovidio, que fez parte do trabalho desde as ideias iniciais, que me repassou as técnicas laboratoriais, e que sempre esteve disposta a solucionar os dilemas e problemas que apareciam pelo caminho. Agradeço também à professora Lidia Picinin, sempre muito solícita a me atender e ajudar em minhas dúvidas.

Agradeço à minha co-orientadora, professora Daniele Cristina da Silva Kazama, por me despertar o interesse pela área e por me ajudar a chegar onde estou. Obrigada por aceitar nossas ideias e pela coragem de acreditar na nossa proposta. Aproveito pra pedir desculpas por qualquer transtorno e agradecer por todo carinho.

Por último agradeço ao maior apoiador deste trabalho, meu orientador, professor André Thaler Neto, que durante todo o meu mestrado foi mais do que um orientador, foi um exemplo a ser seguido, tanto como pessoa quanto como profissional. Obrigada por acreditar em

mim, por aceitar as minhas ideias, e por ser sempre tão compreensivo e otimista. Obrigada por todo o tempo despendido para resolver o que fosse necessário e por não medir esforços para estar disponível a nos atender. Tenho muito a agradecer por ter tido a sorte de conseguir um orientador que me ensinou tanto e que tentou fazer tudo parecer mais fácil do que realmente era. Muito obrigada de todo o meu coração!

RESUMO

VOGES, Joana Gerent. **Qualidade microbiológica da água e do leite e ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina.** 2015. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

A produção de leite é uma importante fonte de renda para agricultura familiar, mas para atuar de modo competitivo no mercado o setor lácteo precisa elevar a qualidade da sua matéria-prima. O estudo objetivou avaliar os fatores que influenciam na qualidade da água e do leite e na ocorrência de leite instável não ácido (LINA) em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina. O trabalho também objetivou verificar a influência da qualidade da água utilizada na propriedade sobre a qualidade do leite produzido, além de estabelecer a relação entre a contaminação bacteriana e a concentração de caseinomacropéptido (CMP) no leite. As propriedades foram caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado. Foram coletadas amostras de leite para analisar sua composição, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), e contagem de bactérias psicrófilas (CBP). Realizou-se o teste do álcool, análises de acidez titulável e pH, e determinou-se o índice CMP por cromatografia líquida de alta eficiência. Na água, foram realizadas análises de CBP, *Escherichia coli*, coliformes a 35°C e aeróbios mesófilos. Também foram analisados os alimentos oferecidos aos animais. Os dados foram submetidos à análise fatorial e de agrupamento, e regressão segmentada (broken-line) utilizando o pacote estatístico SAS. As estratégias mais adequadas de alimentação animal, com conseqüente melhoria da produtividade e aumento do teor de lactose no leite, tiveram influência na menor ocorrência de LINA, que por sua vez apresentou pouca relação com a infra-estrutura das propriedades e com as estações do ano. A infra-estrutura das propriedades também teve pouca relação com a qualidade microbiológica do leite. Já o manejo de ordenha mostrou influência na contaminação bacteriana, que relacionou-se com a concentração de CMP no leite. A qualidade da água utilizada nas propriedades leiteiras

não apresentou relação com a qualidade do leite. A precipitação pluviométrica e a origem da água afetaram a sua contaminação microbiológica.

Palavras-chaves: Bactérias psicotróficas. Caseinomacropéptido. Alimentação animal. Infra-estrutura da propriedade. Teste do álcool.

ABSTRACT

VOGES, Joana Gerent. **Microbiological quality of water and milk and occurrence of unstable non-acid milk (UNAM) in family farms of Planalto Norte of Santa Catarina.** 2015. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Milk production is an important income for family farmers, but to act competitively in the market the dairy sector needs to raise the quality of its raw material. The study aimed to evaluate the factors that influence water quality and milk quality and unstable non-acid milk (UNAM) occurrence in family farms of Planalto Norte of Santa Catarina, Brazil. The study also aimed to assess the influence of water quality used in farm on the milk quality, and to establish relation between bacterial contamination and concentration of CMP in milk. The farms were characterized by a semi-structured questionnaire guide. Samples were collected for analysis of milk composition, somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC) and psychrotrophic bacterial count (PBC). It carried out the alcohol test, titratable acidity and pH, and CMP index was determined by high-performance liquid chromatography. Analyzes performed in water were CBP, *Escherichia coli*, coliforms at 35°C and mesophilic aerobic. The food offered to animals also were analyzed. Data were subject to factor and cluster analysis, and broken-line model analysis using SAS statistical package. The most appropriate strategies of animal feed, with consequent improvement of animal productivity and increase of lactose content in milk were related to a lower occurrence of UNAM, which had little relation with farm structure and with season. The farm structure also had little influence on milk microbiological quality. Already the milking management influenced the bacterial contamination, and these were related to CMP concentration in milk. The water quality used in dairy farms was not related to milk quality. Rainfall and water source affected the microbiological contamination in water.

Keywords: Psychrotrophic bacteria. Caseinomacropéptide. Animal feed. Farm structure. Alcohol test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Dispersão das cargas fatoriais de total de animais, estrutura da sala de ordenha, tipo de ordenha, ocorrência de LINA e produção de leite/vaca/dia. 43
- Figura 2 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis de alimentação dos animais e composição do leite dos dois primeiros fatores que afetam a ocorrência de LINA. 46
- Figura 3 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis relacionam manejo de ordenha e infra-estrutura da propriedade com a qualidade do leite. 69
- Figura 4 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis relacionadas a qualidade do leite. 71
- Figura 5 – Regressão segmentada da concentração de CMP em função de CBP (a) e CBT (b) (variáveis transformadas para \log_{10}). 73
- Figura 6 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de qualidade do leite e de qualidade da água. 76
- Figura 7 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis de qualidade microbiológica da água, precipitação pluviométrica e origem da água. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatística descritiva das variáveis utilizadas nas análises fatoriais.....	41
Tabela 2 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona ocorrência de LINA com a estrutura da propriedade.....	42
Tabela 3 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona ocorrência de LINA com alimentação dos animais e composição do leite.....	44
Tabela 4 – Grupos formados pela análise de agrupamento das variáveis que relacionam ocorrência de LINA com alimentação dos animais e composição do leite.....	48
Tabela 5 - Estatística descritiva das variáveis utilizadas para as análises fatoriais.....	65
Tabela 6 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona o manejo de ordenha e infra-estrutura da propriedade com a qualidade do leite.....	67
Tabela 7 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis relacionadas a qualidade do leite utilizadas na análise fatorial.....	70
Tabela 8 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a qualidade da água com a qualidade do leite.....	75
Tabela 9 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona qualidade da água com sua origem e a precipitação pluviométrica.....	77
Tabela 11 – Percentual de propriedades leiteiras que estão em conformidade com os critérios de potabilidade da água pela Portaria nº	

2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b), de acordo com a
estação do ano. 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Aeróbios mesófilos
APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
CAFLEMAV	Cooperativa da Agricultura Familiar de leite do município de Major Vieira
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBP	Contagem de bactérias psicrotróficas
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMP	Caseinomacropéptido
COAFAPA	Cooperativa da Agricultura Familiar do município de Papanduva
COOPERLEITE	Cooperativa de Leite da Agricultura Familiar do município de Monte Castelo.
DP	Desvio padrão
FAPESC	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina
FDN	Fibra em detergente neutro
IN	Instrução normativa
LINA	Leite instável não ácido
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA	Ministério da agricultura pecuária e desenvolvimento
NUL	Nitrogênio ureico no leite
PARL	Laboratório do Programa de Análises do Rebanho Leiteiro
UDESC	Universidade do estado de Santa Catarina
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UHT	Ultra High Temperature
UNAM	Unstable non-acid milk

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	INFRA-ESTRUTURA DA PROPRIEDADE, ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS E LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NO PLANALTO NORTE DE SANTA CATARINA: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA.....	33
2.1	RESUMO	33
2.2	ABSTRACT	34
2.3	INTRODUÇÃO.....	34
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.4.1	Coleta de amostras e análises laboratoriais do leite.....	37
2.4.2	Avaliação nutricional dos alimentos.....	38
2.4.3	Análise estatística	38
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.6	CONCLUSÃO.....	48
2.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
3	QUALIDADE DA ÁGUA E DO LEITE EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO PLANALTO NORTE DE SANTA CATARINA	55
3.1	RESUMO	55
3.2	ABSTRACT	56
3.3	INTRODUÇÃO.....	56
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59

3.4.1	Coleta de amostras e análises laboratoriais do leite.....	59
3.4.2	Coleta de amostras e análises laboratoriais da água	61
3.4.3	Determinação do índice caseinomacropéptido (CMP) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	62
3.4.4	Análise estatística	63
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.6	CONCLUSÕES	79
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

1 INTRODUÇÃO

A produção de leite é uma importante geração de renda para agricultura familiar, mas para atuar de modo competitivo nos mercados nacional e internacional, o setor lácteo precisa elevar a qualidade da sua matéria-prima. Essa exigência vem dos consumidores, que estão cada vez mais preocupados com a origem e a qualidade dos produtos agropecuários, e também da indústria de laticínios, devido à influência da qualidade da matéria prima sobre o rendimento e qualidade do produto final. Assim, toda a cadeia de produção deve garantir que o leite possa satisfazer as exigências do consumidor final, assumindo um compromisso com a saúde da população.

Um dos fatores indispensáveis para se obter leite de qualidade é a utilização de água potável na produção, pois o leite entra em contato direto com a superfície dos equipamentos de ordenha higienizados com água e com a água residual dos equipamentos. Porém, apesar da importância da água na atividade leiteira, ainda são poucos os estudos que verificam a influência da qualidade da água na qualidade do leite.

A Instrução Normativa 62/2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamenta que deve ser realizado o teste do álcool antes do recolhimento do leite cru refrigerado e que este deve apresentar estabilidade na concentração mínima de 72% v/v, ou seja, não deve haver precipitação do leite em concentrações menores que esta. O teste serve para simular o tratamento térmico que o leite sofre na indústria, e a precipitação do leite não é desejada por dificultar a higienização dos equipamentos industriais e poder diminuir o rendimento dos produtos. Neste teste o chamado leite instável não ácido (LINA) apresenta coagulação sem ter acidez elevada. O LINA pode ter relação, dentre outros fatores, com o manejo nutricional inadequado, que faz com que ocorram alterações nas propriedades físico-químicas do leite.

O leite é um meio nutritivo e, por isso, é facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens. Portanto, a implantação do resfriamento em propriedades leiteiras tem o intuito de minimizar a proliferação de microrganismos mesófilos, que se caracterizam pela fermentação da lactose do leite em ácido lático. Porém, no ambiente refrigerado há o crescimento de outro grupo de microrganismos, denominados psicrotróficos, os quais produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termo resistentes que podem interferir negativamente no rendimento industrial e gerar sabor e aroma anormais no leite e seus

derivados. As enzimas proteolíticas afetam principalmente a caseína, proteína mais abundante do leite, deteriorando a fração κ -caseína, que é determinante para a estabilidade da micela de caseína do leite. A perda dessa estabilidade é a responsável pela precipitação que ocorre no leite UHT e, por isso, há o interesse em pesquisar sobre a relação dessas contagens com a ocorrência de LINA.

A legislação (Instruções Normativas 68 e 69/2006 do MAPA) também exige a determinação do índice CMP em leite para identificar fraudes por adição de soro de queijo ao leite. O caseinomacropéptido (CMP) é um péptido oriundo da ação da enzima quimosina sobre a κ -caseína durante o processamento tecnológico de produção de queijos. Entretanto, as enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicotróficas podem clivar a caseína de forma similar à quimosina, liberando um péptido que se difere do CMP por apenas um aminoácido e é quantificado como CMP pela análise oficial, denominado de "pseudo-CMP".

A região do Planalto Norte de Santa Catarina tem como principal atividade agrícola o cultivo de fumo. Porém, devido às várias dificuldades atreladas a este cultivo, o fumo vem sendo substituído por outras atividades, com destaque para a produção leiteira. Entretanto, poucas informações sobre os métodos de produção e sobre o manejo dos rebanhos leiteiros na região, com suas consequências sobre a qualidade do leite, estão disponíveis na literatura.

Visando uma produção de qualidade para obter maior lucratividade e dar continuidade ao crescimento da atividade na região, os produtores estão preocupados em se adequar às exigências das normativas de qualidade do leite. Por isso, a identificação das variáveis relacionadas à alimentação e ao manejo nutricional nas pequenas propriedades fará com que problemas como a prevalência de LINA possam ser diminuídos, minimizando prejuízos aos produtores de leite. Além da carência de estudos identificando a ocorrência do LINA na Região Norte de Santa Catarina, os produtores pouco sabem sobre a qualidade da água que utilizam para a sua produção, sendo esta, na maioria das vezes, a mesma utilizada para o consumo da família. Portanto, existe a demanda por estudos que identifiquem a ocorrência de LINA e a qualidade da água da região.

Com a produção de leite estável e de alta qualidade microbiológica, as indústrias da região terão menos perdas por descarte de produto, melhor rendimento na confecção dos produtos, além de maior tempo de vida de prateleira dos mesmos. Assim, os produtores poderão melhorar seus índices de produção, ter mais volume para

comercializar e ser mais bem remunerados pelo seu produto, culminando na sua permanência na atividade e melhorando também sua qualidade de vida.

O estudo objetivou avaliar os fatores que influenciam na qualidade da água e do leite e na ocorrência de LINA em propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina. O trabalho também objetivou verificar a influência da qualidade da água utilizada na propriedade sobre a qualidade do leite produzido, além de estabelecer a relação entre a contaminação bacteriana total e de psicrotróficas e a concentração de CMP no leite.

2 INFRA-ESTRUTURA DA PROPRIEDADE, ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS E LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO NO PLANALTO NORTE DE SANTA CATARINA: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA

FARM STRUCTURE, ANIMAL FEED AND UNSTABLE NON-ACID MILK OCCURRENCE IN PLANALTO NORTE OF SANTA CATARINA: MULTIVARIATE APPROACH

2.1 RESUMO

O teste do álcool é amplamente utilizado na recepção dos laticínios para a verificação da estabilidade do leite cru. O leite que não é estável no teste do álcool, sem apresentar acidez elevada, é definido como leite instável não ácido (LINA). A sua ocorrência tem característica multifatorial podendo ser relacionada ao manejo nutricional inadequado. O estudo objetivou avaliar a influência da alimentação dos animais e da infra-estrutura da propriedade sobre a ocorrência de LINA em propriedades da agricultura familiar. A pesquisa foi desenvolvida em propriedades leiteiras do Planalto Norte Catarinense visitadas no inverno de 2013 e no verão de 2014, quando foram coletadas amostras de leite e os alimentos oferecidos aos animais e as propriedades foram caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado. Nas amostras de leite analisou-se o teor de gordura, lactose, proteína, nitrogênio ureico no leite e caseína, por leitura de absorção infravermelha, e o teste do álcool, acidez titulável e pH. Nos alimentos determinou-se o teor de fibra em detergente neutro. Os dados foram avaliados através de técnicas de análise fatorial e de agrupamento utilizando o pacote estatístico SAS. Das amostras analisadas, 25% foram LINA, com precipitação do leite no teste do álcool na concentração alcoólica média de 73,06%. O uso de suplementos alimentares volumosos e concentrados, com consequente melhoria da produtividade animal e maior teor de lactose no leite foram relacionadas com menor ocorrência de LINA nas condições das propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina. A ocorrência de LINA apresentou pouca relação com a infra-estrutura das propriedades e com a estação do ano.

Palavras-chave: Estabilidade do leite. Teste do álcool. Agricultura familiar. Produtividade.

2.2 ABSTRACT

Alcohol test is largely used in the dairy reception platform in order to verify the thermal stability of the raw milk. Milk that loses casein stability when subjected to the test alcohol, without showing high acidity, is set to unstable non-acid milk (UNAM). Its occurrence has multifactorial characteristic and most of studies indicates relation with inadequate nutritional management. The study aimed to evaluate influence of animal feed and farm structure on the occurrence of UNAM in family farms. The study was conducted in dairy farms of Planalto Norte Catarinense region, visited in winter of 2013 and in summer of 2014, when milk samples were collected and the foods offered to the animals and farms were characterized by means of a questionnaire semi-structured guide. In milk samples was analyzed fat, lactose, protein, milk urea nitrogen and casein by infrared absorption, and alcohol test, titratable acidity and pH. In food was determined neutral detergent fiber. Data were evaluated using factor analysis techniques and grouping using SAS statistical package. Of the samples analyzed, 25% were UNAM, with milk precipitation at alcohol test in concentration alcoholic mean of 73.06%. The use of bulky and concentrated food supplements, with consequent improvement of animal productivity and higher lactose content in milk were associated with lower occurrence of UNAM under the conditions in family dairy farms of the Planalto Norte Catarinense. The occurrence of UNAM had little relation with the farm structure and was with season.

Keywords: Milk stability. Alcohol test. Family agriculture. Productivity

2.3 INTRODUÇÃO

A região do Planalto Norte de Santa Catarina tem como principal atividade agrícola o cultivo de fumo. Porém, devido às várias dificuldades atreladas a este cultivo, ele vem sendo substituído, com destaque para a produção leiteira. De 2010 a 2013 a Microrregião de Canoinhas, a mais expressiva da região, apresentou um crescimento em produção de mais de 53%, com 74 milhões de litros de leite produzidos, 2,5% do total produzido no estado (IBGE, 2013; EPAGRI/CEPA, 2014). De 2000 a 2012 a produção catarinense de leite de vaca cresceu

de 1 bilhão para 2,7 bilhões de litros (aumento de 171%). Este aumento é explicado pela melhoria nos indicadores de produtividade, que decorre da melhoria dos pastos e sistemas de produção (EPAGRI/CEPA, 2014).

A Instrução Normativa 62/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) estabelece, como parâmetros físico-químicos de qualidade do leite, que este deve apresentar acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g ácido láctico/100 mL de leite. Também estabelece a obrigatoriedade da realização do teste do álcool antes da coleta de leite cru refrigerado, devendo apresentar estabilidade na concentração mínima de 72% (v/v). O leite que precipita neste teste não deve ser coletado (BRASIL, 2011).

O teste do álcool é amplamente utilizado nas plataformas de recepção dos laticínios visando à verificação da estabilidade térmica do leite cru. A prova avalia a estabilidade da caseína submetida à desidratação provocada pelo álcool simulando o tratamento térmico (OLIVEIRA et al., 2011). A caseína, proteína mais importante do leite bovino, é secretada em agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons, como o fosfato de cálcio, formando as micelas de caseína. As principais variantes genéticas pertencentes ao grupo são $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e κ -caseína e ocorrem numa proporção quantitativa de aproximadamente 4:1:4:1 (FARRELL et al., 2006; FOX e BRODKORB et al., 2008; BONIZZI et al., 2009). A κ -caseína constitui a fração hidrofílica da micela de caseína, impedindo a agregação das micelas. Porém, quando, por algum motivo, há degradação desta fração da caseína, ocorre a desestabilização das micelas, que coagulam (FOX e BRODKORB et al., 2008; HIDALGO et al., 2010; KRUIF et al., 2012), podendo originar o leite instável não ácido (LINA).

O LINA apresenta perda da estabilidade da caseína quando submetido ao teste do álcool sem apresentar acidez elevada, ou seja, possui acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g ácido láctico/100 mL e pH entre 6,6 e 6,8 (FISCHER et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011). O LINA não é desejado pela indústria, pois acredita-se que ele não resista ao processamento térmico, especialmente Ultra High Temperature (UHT), podendo comprometer o funcionamento e a limpeza dos equipamentos na indústria, e provocando prejuízos a cadeia produtiva do leite. (MARQUES et al., 2007; DOMARESKI, et al., 2010; FISCHER et al., 2012).

A ocorrência de LINA tem característica multifatorial, e a maior parte dos estudos realizados indica relação com o manejo nutricional inadequado (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2010;

OLIVEIRA e TIMM 2007). O efeito da sazonalidade na frequência de LINA varia dependendo da região do país e da produção de alimentos e é associado a períodos de baixa disponibilidade de pastos e de forragens de baixa qualidade (BATTAGLINI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011; BARCHIESI-FERRARI et al., 2007). Isso normalmente ocorre na rebrota das pastagens, época em que há maiores chances de ocorrer restrição alimentar (BATTAGLINI et al., 2013). Assim, os componentes da dieta e o equilíbrio entre eles são importantes para manter a estabilidade do leite.

Outros fatores que podem influenciar na estabilidade do leite são a hidrólise enzimática da caseína por micro-organismos psicrotóxicos proteolíticos, a alta contagem de células somáticas, o excesso de íons cálcio, o pH do leite, o desequilíbrio entre sais e, ainda, fatores que alteram o equilíbrio ácido-base de animais, tais como distúrbios gastrointestinais, distúrbios renais, dietas desequilibradas e o insucesso dos mecanismos fisiológicos compensatórios (O'CONNELL et al. 2006; BAGLINIÈRE et al., 2012; BATTAGLINI et al., 2013; SILVA et al., 2013; FAGNANI et al., 2014).

O presente estudo objetivou avaliar a influência da alimentação dos animais e da infra-estrutura da propriedade sobre a ocorrência de LINA na região do Planalto Norte de Santa Catarina.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em propriedades leiteiras do Planalto Norte Catarinense. Participaram da pesquisa as propriedades dos cooperados de três cooperativas de leite da agricultura familiar dos municípios de Major Vieira, Papanduva e Monte Castelo. Foram avaliadas 66 propriedades leiteiras no inverno e 69 no verão, resultando um total de 135 amostras analisadas, sendo as diferenças no número de propriedades de uma coleta para a outra devido à entrada ou saída de produtores das cooperativas.

As propriedades participantes foram visitadas duas vezes, uma no inverno (julho de 2013) e outra no verão (fevereiro de 2014). Em cada visita foram coletadas amostras de leite diretamente dos tanques resfriadores e o alimento fornecido aos animais, incluindo pastagens, silagens e alimentos concentrados. Nas duas estações, as propriedades foram caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado (Anexo A), aprovado no Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 12185013.6.0000.0121,

abordando manejo alimentar e caracterização da propriedade e da produção leiteira, por perguntas objetivas direcionadas ao produtor ou por visualização do entrevistador, principalmente quando relativas às instalações e equipamentos.

2.4.1 Coleta de amostras e análises laboratoriais do leite

O leite foi homogeneizado antes de cada coleta ligando a agitação do tanque de expansão por cinco minutos ou, no caso de refrigeradores de imersão, utilizando um agitador manual para homogeneizar os tarros por, pelo menos, dez segundos (DIAS e ANTES, 2012). A coleta do leite foi feita com concha coletora de aço inoxidável, flambada com álcool 96%, imediatamente antes de cada coleta. No caso de refrigeradores de imersão, com mais de um tarro, foram coletados números iguais de amostras de cada tarro que foram misturadas em um recipiente de aço inoxidável para depois serem acondicionadas nos frascos de coleta. Os frascos foram identificados com o número do produtor e colocados em caixa isotérmica com gelo reciclável para mantê-los em temperatura máxima de 7°C.

Em cada propriedade foram coletadas duas amostras de leite: uma para composição (gordura, lactose, proteína, nitrogênio ureico no leite (NUL) e caseína) e outra para a realização das análises físico-químicas do leite (teste do álcool, acidez titulável e pH).

As amostras de leite para análise de gordura, lactose, proteína, NUL e caseína foram acondicionadas em frascos-padrão para coleta contendo o conservante bronopol. As amostras foram analisadas por leitura de absorção infravermelha (equipamento BENTLEY - 2000) (IDF, 2000) pelo Laboratório do Programa de Análises do Rebanho Leiteiro (PARL) da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba - PR, participante da Rede Brasileira de Qualidade do leite. As amostras para as análises físico-químicas do leite foram coletadas em frascos de 100 mL e analisadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade do Contestado – Campus Canoinhas, Marcílio Dias (na coleta de verão), ou no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Santa Catarina - Campus Canoinhas (na coleta de inverno).

No teste de estabilidade do leite ao álcool foi avaliada a concentração de álcool etílico em que ocorre a precipitação do leite. Para tal, foram pipetadas soluções alcoólicas crescentes de 58 a 80% (v/v), com intervalos de 2% em uma placa de Petri com o mesmo

volume de leite e, após homogeneização, foi avaliada a presença de grumos na placa. Foram consideradas como leite instável não ácido (LINA) as amostras de leite que precipitaram em concentração de álcool menor ou igual a 72%, com acidez e pH normais (entre 14 e 18°D e entre 6,6 e 6,8, respectivamente) (BRASIL, 2011). A determinação da acidez titulável foi feita através do teste de Dornic descrito pela IN 68 (BRASIL, 2006). O pH do leite foi medido com um peagâmetro portátil (Sanxin SX711) (BRASIL, 2006).

2.4.2 Avaliação nutricional dos alimentos

As amostras de alimentos secos foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao laboratório, e as amostras de alimentos úmidos foram acondicionadas em caixas de isopor em temperatura em torno de 7°C e levadas ao laboratório. As amostras de pastagens foram coletadas por meio da técnica do quadrado de 0,25 m² (SALMAN et al., 2006) lançado nos piquetes em que as vacas se encontravam, sendo cinco pontos coletados em cada piquete. O pasto foi cortado rente ao solo em toda a área do quadrado, pesado e acondicionado em sacos de papel para transporte até o laboratório.

As silagens, pastagens e demais alimentos úmidos foram pré-secos em estufa com ventilação forçada a 55°C por 72 horas e, posteriormente, assim como os alimentos secos, moídos com peneiras com crivos de 1 mm, e acondicionados em potes plásticos em freezer - 20°C para posterior análises químicas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Rural da Universidade Federal de Santa Catarina. A determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada de acordo com Van Soest et al. (1991).

2.4.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio de técnicas de análise multivariada (análise fatorial e de agrupamento), utilizando-se o pacote estatístico SAS[®] (SAS Institute, 2002). Os dados foram previamente padronizados pelo procedimento STANDARD. A análise fatorial foi realizada utilizando o procedimento FACTOR, com rotação Promax. Para a análise de agrupamento foram utilizados os procedimentos FASTCLUS, DISCRIM e CLUSTER, empregando-se o método de Ward, baseado na distância Euclidiana. A comparação entre os grupos formados foi realizada por análise multivariada de variância

(MANOVA), utilizando o procedimento GLM, sendo as médias dos grupos comparadas pelo teste Tukey-Kramer, ao nível de significância de 5%.

A infra-estrutura das propriedades foi caracterizada pelas seguintes variáveis: estrutura da sala de ordenha (estrutura de madeira, de alvenaria sem azulejo e de alvenaria com azulejo), tipo de ordenha (ordenha manual, equipamento mecanizado balde ao pé e totalmente mecanizado) e número de animais. A produção de leite/vaca/dia ajudou na caracterização da especialização dos animais. A alimentação das vacas foi caracterizada pela quantidade e o tipo de concentrado fornecido (não suplementa, suplementa só com energético e suplementa com energético e protéico), pela quantidade de suplementação volumosa e pelo FDN da pastagem. Por fim, para descrever a qualidade do leite foram selecionadas as variáveis concentração de álcool, ocorrência de LINA, gordura, caseína, lactose e NUL. Para fins estatísticos algumas variáveis foram divididas em classes com intuito de auxiliar na análise dos resultados. A variável produção de leite/vaca/dia foi dividida em até 10 L, de 10 a 15 L e acima de 15 L; e a quantidade de volumoso em não suplementa, até 15 kg/dia e acima de 15 kg/dia.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estações inverno e verão foram bem definidas na região durante a execução do trabalho, com temperatura média de 8,3°C e amplitude térmica de 3,9°C a 13,8°C no inverno e temperatura média de 23,7°C com amplitude de 17,2°C a 31,8°C no verão. A precipitação pluviométrica média diária foi de 9,5 mm no inverno e de 1,1 mm no verão (dados meteorológicos disponibilizados pela EPAGRI/CIRAM).

As propriedades possuíam entre 1 e 50 vacas em lactação, com média de 8 animais, apresentando produção diária de 5 a 1100 litros de leite, com média de 105 litros por dia. A área média das propriedades era de 25 ha, variando de 5 a 145 ha. Os animais eram em sua maioria mestiços Jersey e Holandês, porém, havia também vacas mestiças com Gir e Pardo Suíço. O tempo em que os produtores envolvidos no estudo trabalhavam na atividade leiteira variava de 1 a 35 anos, com média de 10 anos na atividade.

As propriedades participantes apresentavam, em média, um pequeno número de vacas com baixa produção de leite/vaca/dia (Tabela 1), um indicativo de pequenas unidades produtoras, com baixo nível de tecnificação. Poucas propriedades utilizavam a suplementação volumosa

(geralmente silagem de milho) além das pastagens, e a utilização de suplementação concentrada era variada, com média de 3,34 kg/vaca/dia, o que pode ajudar a explicar a baixa produtividade leiteira. A qualidade das pastagens se mostrou bem variada, com uma média de 46,93% de FDN. Segundo Moreira et al. (2008), existe uma relação inversa entre o conteúdo de fibras dos alimentos e o seu valor energético, sendo inverso também ao consumo voluntário dos animais, porém, ele é essencial para o funcionamento normal do rúmen e o aporte de energia. Do total de amostras analisadas, 25% eram de LINA, sendo que, em média, a precipitação do leite no teste do álcool ocorreu em concentração alcoólica de 73,06% (Tabela 1).

A ocorrência de LINA é menor ou próxima a relatada em outros estudos do país, como o de Battaglini et al. (2013) que relataram que das 353 amostras de leite coletadas diretamente de resfriadores em seis municípios da microrregião de Ivaiporã e Sapopema - PR 43,6% eram LINA. Das 334 amostras de leite a granel coletadas de fazendas que forneciam leite para um laticínio localizado no nordeste do estado de São Paulo no outono, inverno e primavera, 23% foram instáveis ao álcool 72% (OLIVEIRA et al., 2013). Ao verificar a qualidade do leite armazenado nos silos para leite cru de uma usina de beneficiamento da região metropolitana da Porto Alegre - RS nos meses de agosto e setembro de 2008, Ciprandi et al. (2012) classificaram 34% das 92 amostras coletadas como LINA. Em um estudo realizado em 51 propriedades leiteiras da região do Vale do Braço do Norte – SC, a ocorrência de LINA foi de 29% (WERNCKE, 2012).

Tabela 1 - Estatística descritiva das variáveis utilizadas nas análises fatoriais.

Grupo	Variável	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Estrutura da propriedade	Número de vacas	11,71 ± 7,66	2,00	60,00
	Estrutura sala ordenha ¹	0,20 ± 0,51	0,00	2,00
	Tipo ordenha ²	2,01 ± 0,40	1,00	3,00
Produtividade	L/vaca/dia	12,03 ± 4,67	2,50	27,50
	Classes ³	1,97 ± 0,78	1,00	3,00
Alimentação das vacas	Concentrado (kg/vaca/dia)	3,34 ± 2,54	0,00	14,40
	Tipo de concentrado ⁴	1,47 ± 0,64	0,00	2,00
	Suplementação volumosa ⁵	0,34 ± 0,69	0,00	2,00
	FDN da pastagem (%) ⁶	46,93 ± 9,90	25,69	63,33
Qualidade do leite	Concentração de álcool (°GL) ⁷	73,06 ± 5,16	58,00	80,00
	Ocorrência de LINA ⁸ (%)	25,00 ± -	-	-
	Gordura (%)	3,88 ± 0,47	2,64	5,10
	Caseína (%)	2,49 ± 0,22	1,79	3,13
	Lactose (%)	4,46 ± 0,18	3,59	4,81
	NUL (mg/dL) ⁹	12,77 ± 4,27	3,26	26,42

¹ 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. ² 1 = ordenha manual, 2 = equipamento mecanizado balde ao pé e 3 = equipamento totalmente mecanizado. ³ 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L. ⁴ 0 = não suplementa, 1 = suplementa só com energético e 2 = suplementa com energético e protéico. ⁵ 0 = não suplementa, 1 = até 15 kg/dia e 2 = acima de 15 kg/dia. ⁶ Fibra em detergente neutro da pastagem. ⁷ Graduação alcoólica em que ocorreu a precipitação do leite no teste do álcool. ⁸ Leite Instável não Ácido. ⁹ Nitrogênio ureico do leite.

Fonte: Próprio autor.

Em uma primeira análise fatorial foi relacionada a ocorrência de LINA com a infra-estrutura da propriedade, sendo que a soma dos dois primeiros fatores explicou 58,48% da variação total. A relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada numericamente e graficamente na Tabela 2 e na Figura 1, respectivamente. O fator 1 representa a relação positiva entre as variáveis de estrutura da propriedade (número de vacas, estrutura da sala de ordenha e tipo de ordenha), demonstrada pela igualdade de suas cargas fatorais. O fator 2 representa a relação inversa entre a produção de leite/vaca/dia nas diferentes propriedades e a ocorrência de LINA, demonstrada pela oposição de suas cargas fatorais. As elevadas comunalidades demonstraram a alta relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 2 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona ocorrência de LINA com a estrutura da propriedade.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Número de vacas	0,7616	-0,0493	59,29
Estrutura sala ordenha ¹	0,7321	0,1555	52,85
Tipo ordenha ²	0,7289	-0,1438	58,11
Ocorrência de LINA ³	0,1012	0,9245	83,90
Produção/vaca/dia ⁴	0,3574	-0,4577	38,25
% Variância	38,21	20,27	

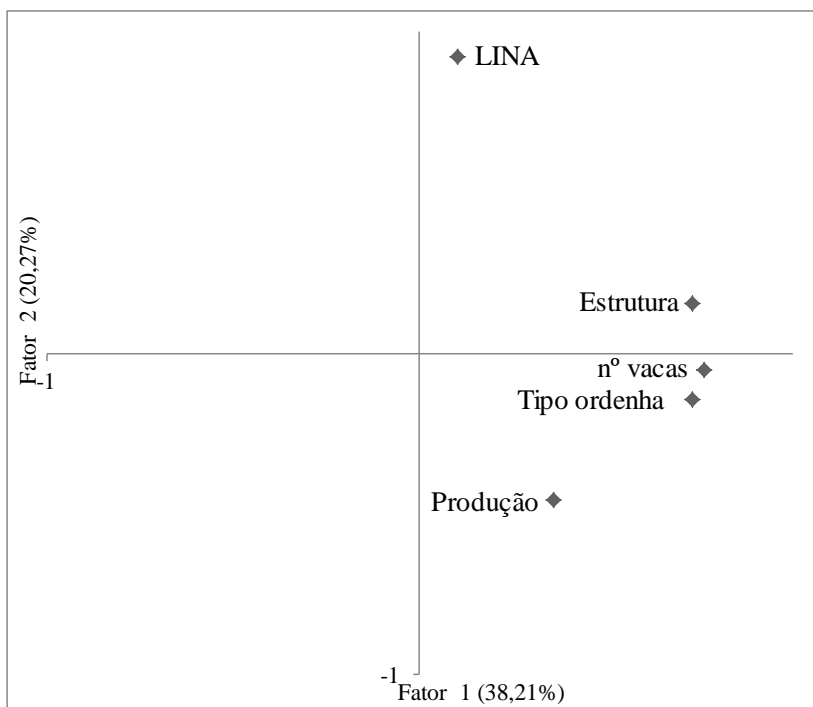
¹ 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. ² 1 = ordenha manual, 2 = ordenha balde ao pé e 3 = ordenha canalizada ou semi-canalizada. ³ Leite Instável não Ácido. ⁴ 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L.

Fonte: Próprio autor.

O primeiro fator relaciona número de vacas, infra-estrutura da sala de ordenha e tipo de ordenha (Figura 1), indicando que as propriedades com menos animais apresentam menores investimentos em estrutura e tecnologia, assim como as propriedades maiores podem investir mais nesses pontos. Ao avaliar a eficiência produtiva das propriedades leiteiras, Nero et al. (2009) perceberam que a maioria dos produtores tinham pequena quantidade de animais em lactação, baixa produção e produtividade por vaca. As variáveis relacionadas à infra-

estrutura da propriedade não apresentaram relação com a ocorrência de LINA, a qual, por sua vez, apresentou relação negativa à produção de leite/vaca/dia, indicando que propriedades com animais menos produtivos tendem a apresentar maior ocorrência de LINA. Isso pode estar relacionado aos fatores nutricionais, já que a subnutrição pode aumentar a apoptose das células epiteliais mamárias e reduzir a capacidade produtiva dos animais, modificar a composição e o pH sanguíneos, causando mudanças na composição do leite relacionadas à sua capacidade de resistir à desidratação alcoólica (MARQUES et al., 2010).

Figura 1 - Dispersão das cargas fatoriais de total de animais, estrutura da sala de ordenha, tipo de ordenha, ocorrência de LINA e produção de leite/vaca/dia.



Estrutura: 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. Tipo ordenha: 1 = ordenha manual, 2 = ordenha balde ao pé e 3 = ordenha canalizada ou semi-canalizada. LINA: Leite

Instável não Ácido. Produção: 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L. n° vacas: número de vacas.

Fonte: Próprio autor.

Em uma segunda análise fatorial foram avaliadas as relações entre a ocorrência de LINA com alimentação dos animais e composição do leite, sendo que a soma dos dois primeiros fatores explicou 42,98% da variação total (Tabela 3). No fator 1 as variáveis com maior carga fatorial foram estação do ano e teor de FDN da pastagem e, com representatividade um pouco menor, nitrogênio ureico no leite (NUL), suplementação volumosa e teor de lactose. No fator 2, as variáveis com maior carga fatorial foram os teores de gordura e caseína, a suplementação com concentrado, a produtividade e ocorrência de LINA. As comunalidades demonstraram a relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 3 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona ocorrência de LINA com alimentação dos animais e composição do leite.

Variáveis	Fatores		Comunalidades
	Fator 1	Fator 2	
Teor de FDN da pastagem ¹	0,8660	0,1474	73,75
Estação do ano ²	0,8589	-0,1525	79,59
Teor de lactose	-0,3373	-0,2903	17,18
NUL ³	-0,4949	-0,4036	35,44
Suplementação volumosa ⁴	-0,5582	0,1770	36,93
Gordura	0,0524	0,7287	52,36
Caseína	-0,2610	0,5396	39,70
Ocorrência de LINA ⁵	0,1205	0,4420	19,57
Produção/vaca/dia ⁶	-0,1291	-0,5608	31,18
Suplementação concentrada ⁷	0,2249	-0,5936	43,86
% Variância	24,01	18,95	

¹Fibra em detergente neutro da pastagem. ² 1 = inverno e 2 = verão. ³ Nitrogênio ureico do leite. ⁴ 0 = não suplementa, 1 = até 15 kg/vaca/dia e 2 = acima de 15 kg/vaca/dia. ⁵ Leite Instável não Ácido. ⁶ 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L. ⁷ 0 = não suplementa, 1 = suplementação somente energética e 2 = suplementação energética e protéica.

Fonte: Próprio autor.

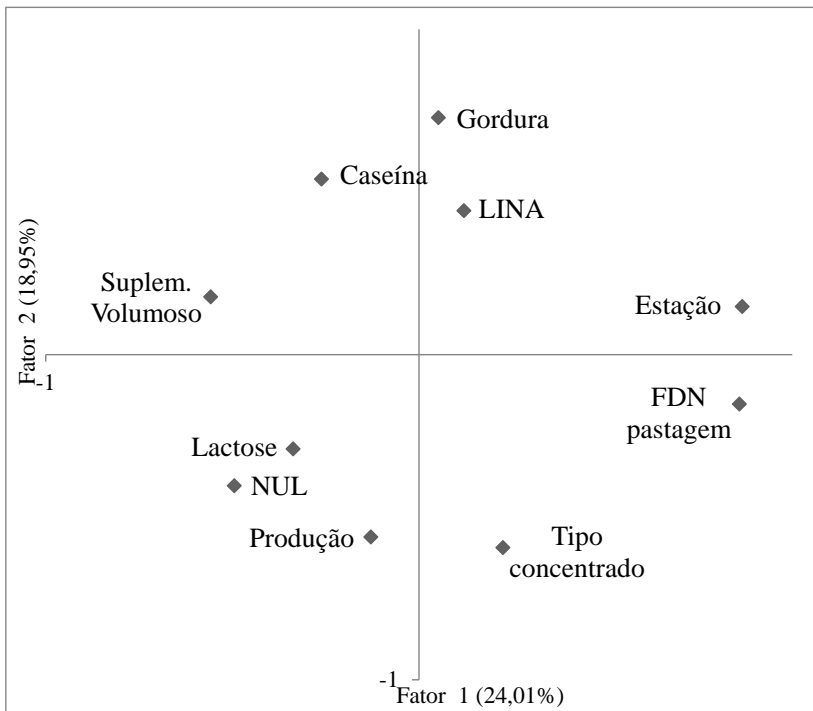
A relação entre as variáveis do fator 1 (Figura 2) mostra que no verão as pastagens apresentaram maior teor de FDN. O FDN elevado é característico das forragens tropicais, sendo que, segundo Gerdes et al. (2000), em algumas espécies os teores aumentam ainda mais no verão. Observa-se também que no verão houve menor utilização de suplementação volumosa. As características dos alimentos volumosos disponíveis nesta época do ano (pastagem mais fibrosa e menor utilização de forragem conservada) apresentaram relação com menores teores de lactose no leite. Já no inverno, a presença de pastagens com maior teor de proteína bruta, como aveia e azevém, pode ter influenciado no maior teor de NUL, assim como pode ter influência a falta de sincronização entre as taxas de degradação de carboidratos e proteínas, com consequente baixa produção de proteína microbiana (FIGUEIROA et al., 2013). Ao estudar fatores que influenciam a concentração de NUL, Meyer et al. (2006) constataram que a lactose e a produção média diária de leite influenciaram positivamente a concentração de NUL, efeito fundamentado pela elevada correlação entre a produção de leite e a relação proteína/energia na dieta.

No fator 2, maior produção de leite está relacionado a menores teores de sólidos do leite, como a gordura e a caseína, e o contrário também é verdadeiro. Dietas com elevada energia e consequente elevado consumo de MS e NDT estão relacionadas à um maior teor de lactose no leite, e à maior produção e estabilidade do leite ao teste do álcool, que por sua vez estão relacionadas negativamente ao teor de gordura (SCHMIDT, 2014) possivelmente devido ao efeito de diluição desse componente pelo aumento na produção de leite. Esta maior produção de leite/vaca/dia foi obtida, na sua maioria, em propriedades que utilizavam suplementação concentrada, principalmente energética e proteica, a qual, por sua vez, estava associada às amostras de leite estável, com menor ocorrência de LINA. Marques et al., (2010) mostram que os animais que receberam suplementação concentrada com melhor balanço nos níveis de energia e proteína produziram leite mais estável.

As amostras de LINA apresentaram maiores teores de gordura e caseína e menor teor de lactose no leite. Ao analisar o perfil eletroforético de proteínas do leite, Barbosa et al. (2012) concluíram que amostras de leite instáveis ao teste do álcool apresentam menor concentração de κ -caseína e maiores concentrações de β -caseína e de proteínas totais. Outros autores também relatam que as amostras de leite

LINA apresentam menores teores de lactose e maiores teores de gordura quando comparado com leites estáveis (OLIVEIRA e TIMM, 2006; FISCHER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). A redução da lactose é um efeito mediado, parcialmente, pela restrição alimentar, embora o efeito da CCS de diminuição do teor de lactose seja reconhecido e possível (MARQUES, et al., 2010).

Figura 2 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis de alimentação dos animais e composição do leite dos dois primeiros fatores que afetam a ocorrência de LINA.



FDN: Fibra em detergente neutro da pastagem. Estação: 1 = inverno e 2 = verão. NUL: Nitrogênio ureico do leite. Suplem. Volumoso: 0 = não suplementa, 1 = até 15 kg/vaca/dia e 2 = acima de 15 kg/vaca/dia. LINA: Leite Instável não Ácido. Produção: 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L. Tipo concentrado: 0 = não suplementa, 1 = suplementação somente energética e 2 = suplementação energética e protéica.

Fonte: Próprio autor.

Foram formados três grupos distintos na análise de agrupamento ($P < 0,05$) pelas variáveis estrutura da sala ordenha, tipo de ordenha, número de vacas, produção/vaca/dia, suplementação volumosa, teor de FDN da pastagem, ocorrência de LINA, e teores de caseína, lactose e gordura (Tabela 4). De acordo com esta análise, o grupo 2, com apenas 5 observações, é formado pelos maiores produtores com características distintas dos demais, que possuíam melhor estrutura de sala de ordenha, equipamento de ordenha mecanizado, maior número de vacas e maior produção/vaca/dia. Estas propriedades possuíam forragens com menor FDN, o que indica melhor qualidade das pastagens. Este grupo não apresentou ocorrência de LINA. Propriedades leiteiras com produção em escala maior utilizam-se de maior quantidade de alimentos de melhor qualidade, com nível tecnológico produtivo superior e, provavelmente, um melhor desempenho de ordenha e manejo sanitário, com efeitos positivos sobre a produção e composição do leite (SMITH et al., 2002; GABBI et al., 2013). O menor teor de sólidos no leite do grupo 2 é provavelmente efeito da diluição destes componentes, visto que este grupo se difere dos demais pela maior produção.

Os grupos 1 e 3, formados por propriedades menores e com infra-estrutura de produção mais modesta, distinguem-se pela ocorrência de LINA, sendo que o primeiro apresentou ocorrência em 37% das propriedades contra 9% no grupo 3. Estes grupos não diferiram quanto à estrutura de ordenha, número de vacas e produção/vaca/dia, porém, o grupo 1 possuía menor tecnificação do equipamento de ordenha. Embora a análise fatorial não tenha apresentado relação direta entre a ocorrência de LINA e a estrutura da propriedade (Tabela 2 e Figura 1), a análise de agrupamento demonstrou que as condições relacionadas à maior instabilidade do leite são mais comuns em propriedades com ordenha menos tecnificadas.

Se comparado ao grupo 1, o grupo 3, que apresenta menor ocorrência de LINA, era o que mais utilizava suplementação volumosa na alimentação dos animais, além de ter pastagens com um menor teor de FDN. O grupo 3 possuía também maior teor de caseína, lactose e gordura no leite produzido. Isso pode estar associado a um melhor manejo nutricional, manutenção da qualidade e da constância dos alimentos durante o ano (ZANELA et al., 2006). Estratégias de alimentação envolvendo o uso de silagem, suplementos vitamínicos e minerais, calcário, sal e disponibilidade de pasto relacionam-se positivamente com a concentração de lactose, sendo estas estratégias principalmente utilizadas por propriedades com maior número de vacas

e maior produtividade (GABBI et al., 2013). Oliveira et al. (2013) pesquisando sobre a composição do leite constataram que o leite estável apresentava maiores teores de caseína e lactose que o instável. A porcentagem mais elevada de caseína é possivelmente causada pelo maior aporte de nutrientes e por maiores teores de proteína bruta no volumoso e nos concentrados fornecidos (ZANELA et al., 2006).

Tabela 4 – Grupos formados pela análise de agrupamento das variáveis que relacionam ocorrência de LINA com alimentação dos animais e composição do leite.

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	P
Estrutura sala ordenha ¹	0,17 b	1,25 a	0,16 b	<0,0001
Tipo ordenha ²	1,86 c	2,75 a	2,14 b	<0,0001
Número de vacas	10,91 b	60,19 a	11,01 b	<0,0001
Produção/vaca/dia ³	1,89 b	3,00 a	2,02 b	=0,0163
Suplementação volumosa ⁴	0,13 b	1,01 a	0,65 a	<0,0001
Tipo concentrado ⁵	1,44	2,00	1,47	=0,3313
FDN da pastagem (%) ⁶	48,82 a	40,12 b	44,17 b	=0,0279
Ocorrência LINA ⁷	0,37 a	0,00 b	0,09 b	<0,0007
Caseína (%)	2,42 b	2,28 b	2,62 a	<0,0001
Lactose (%)	4,38 b	4,51 ab	4,60 a	<0,0001
Gordura (%)	3,80 b	3,34 b	4,22 a	<0,0001
NUL (mg/dL) ⁸	12,39	12,52	13,41	=0,4274
Número de observações	84	5	49	

¹ 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. ² 1 = ordenha manual, 2 = equipamento mecanizado balde ao pé e 3 = equipamento totalmente mecanizado. ³ 1 = até 10 L, 2 = de 10 a 15 L e 3 = acima de 15 L. ⁴ 0 = não suplementa, 1 = até 15 kg/dia e 2 = acima de 15 kg/dia. ⁵ 0 = não suplementa, 1 = suplementa só com energético e 2 = suplementa com energético e protéico. ⁶ Fibra em detergente neutro da pastagem. ⁷ Leite Instável não Ácido. ⁸ Nitrogênio ureico do leite.

Fonte: Próprio autor.

2.6 CONCLUSÃO

O uso de suplementos alimentares volumosos e concentrados, com consequente melhoria da produtividade animal e maior teor de

lactose no leite foram relacionadas com menor ocorrência de LINA nas condições das propriedades de agricultura familiar do Planalto Norte de Santa Catarina. A ocorrência de LINA apresentou pouca relação com a infra-estrutura das propriedades e com a estação do ano.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGLINIÈRE, F.; TANGUY, G.; JARDIN, J.; MATÉOS, A.; BRIARD, V.; ROUSSEAU, F.; ROBERT B.; BEAUCHER E.; HUMBERT G.; DARY A.; GAILLARD J. L.; AMIEL C.; GAUCHERON, F. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2593-2603, 2012.

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. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 621-628, 2012.

BARCHIESI-FERRARI, C. G.; WILLIAMS-SALINAS, P. A.; SALVO-GARRIDO, S. I. Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n. 12, p. 1785-1791, dez. 2007.

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

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, n. 1, p. 165-168, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dez. 2011.

CIPRANDI, A.; PEREIRA, B. P.; PINTO, A. T. Ocorrência de leite instável não ácido (LINA) em uma usina de beneficiamento da região metropolitana de Porto Alegre/RS. **Veterinária em Foco**, v. 9, n. 2, p. 128-133, jan./jun. 2012.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. **Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibiótico**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2012. 15 p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103 9865; 150).

DOMARESKI, J. L.; BANDIERA, N. S.; SATO R. T.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 60, n. 3, p. 261-269, 2010.

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2013-2014**. Florianópolis: Epagri/Cepa, 2014. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2014.pdf. Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398-402, 2014.

FARRELL, H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2, p. 135-147, 2006.

FIGUEIROA, F. J. F.; DE MARCHI, F. E.; SANTOS, G. T. D.; SANTOS, W. B. R. D.; KAZAMA, D. C. D. S.; LEITE, L. C.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C. Production, composition and fatty acid profile of milk and butter texture of dairy cows fed ground or pelleted concentrate with sunflower and/or lignosulfonate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 10, p. 743-750, 2013.

FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; MARQUES, L. T.; STUMPF JR., W.; VIDAL, L. E. B. Prevalência, indução e tratamento do leite instável não ácido (LINA) no sul do Brasil. In: **Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico**. DIAZ GONZÁLEZ, F.; PINTO, A. T.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. (Org.). Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2011.

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

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

GABBI, A. M.; MCMANUS, C. M.; SILVA, A. V.; MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; STUMPF, M. P.; FISCHER, V. Typology and physical-chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies. **Agricultural Systems**, v. 121, p. 130-134, 2013.

GERDES, L.; WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; POSSENTI, R. A.; SCHAMMASS, E. A. Avaliação de características de valor nutritivo das gramíneas forrageiras Marandu, Setária e Tanzânia nas estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 955-963, 2000.

HIDALGO, María Eugenia; PIRES, Miryam S.; RISSO, Patricia H. A study on bovine kappa-casein aggregation after the enzymatic action of chymosin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 556-563, 2010.

IBGE. **Produção Pecuária Municipal 2012**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf. Acesso em: 29 de janeiro de 2015.

IDF - International Dairy Federation 141C – **Determination of milkfat, protein and lactose content** – Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels, Belgium, 2000. 15p.

KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171, p. 36-52, 2012.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELLA, M.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; 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, n. 12, p. 2724-2730, 2010.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JÚNIOR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 1, p. 91-97, 2007.

MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; COELHO, K. O.; RODRIGUES, P. H. M. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio uréico no leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1114-1121, 2006.

MOREIRA, P. C.; DE CAMARGO WASCHECK, R.; DUTRA, A. R.; GRANDSIRE, C.; DE ALMEIDA, O. C. Influências Edafoclimáticas, Hormonais e Nutricionais na Produção de Vacas Leiteiras em Lactação. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 481-500, maio/jun. 2008.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 386-390, abr./jun. 2009.

O'CONNELL J.E.; SARACINO P.; HUPPERTZ T.; UNIAKE T.; DE KRUIF C.G.; KELLY A.L; FOX P.F. Influence of ethanol on the rennet- induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 312- 317, 2006.

OLIVEIRA, C. A. F. D.; LOPES, L. C.; FRANCO, R. C.; CORASSIN, C. H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p.508-515, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F.; LOPES, L. C.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M.; CORASSIN, C. H. Composition, somatic cell count and casein fractions of ethanol unstable milks. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 1, p. 153-156, jan./mar., 2013.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 259-263, abr./jun. 2006.

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.17-22, 2007.

SALMAN, A. K. D.; SOARES, J. P. G.; CANESIN, R. C. **Métodos de amostragem para avaliação quantitativa de pastagens**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006. (Circular Técnica 84).

SAS Institute. **SAS/STAT. Guide for personal computers**. Cary, 1v. 2002.

SCHMIDT, F. A. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool**. 2014. 78 p. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do estado de Santa Catarina, Lages, 2014. 78 p.

SILVA, N. N.; PIOT, M.; CARVALHO, A. F.; VIOLLEAU, F.; FAMEAU, A. L.; GAUCHERON, F. pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 2, p. 322-330, 2013.

SMITH, R.; MOREIRA, L.; LATRILLE, L. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X región de Chile mediante análisis multivariable. **Agricultura Técnica**, v. 62, n. 3, p. 375-395, 2002.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

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**. 2012. 63f. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do estado de Santa Catarina, Lages, 2012. 63f.

ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; JUNIOR, W. S.; ZANELA, C.; MARQUES, L. T.; MARTINS, P. R. G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.1, p. 153-159, 2006.

3 QUALIDADE DA ÁGUA E DO LEITE EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO PLANALTO NORTE DE SANTA CATARINA

WATER AND MILK QUALITY IN DAIRY FARMS OF PLANALTO NORTE OF SANTA CATARINA

3.1 RESUMO

O estudo objetivou avaliar os fatores que influenciam na qualidade do leite de propriedades da agricultura familiar no Planalto Norte Catarinense e identificar a qualidade da água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha. O trabalho objetivou também objetivar estabelecer a relação entre a contaminação bacteriana (CBP e CBT) e a concentração de CMP no leite. A pesquisa foi desenvolvida em propriedades leiteiras do Planalto Norte Catarinense visitadas no inverno de 2013 e no verão de 2014, caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado. Nas amostras de leite foi realizado teste do álcool, acidez titulável, pH, análise de contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), contagem de bactérias psicrotróficas (CBP) e índice CMP por cromatografia líquida de alta eficiência. Nas amostras de água foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: *Escherichia coli*, coliformes a 35°C e aeróbios mesófilos e CBP. Os dados foram avaliados por análise fatorial e regressão segmentada. O manejo de ordenha influenciou a qualidade microbiológica do leite, porém a estrutura da propriedade pouco influenciou. A contaminação bacteriana e a concentração de CMP no leite estão relacionadas, sendo o aumento destas aumentou linearmente concentração de CMP no leite. Em 84% das propriedades a água que abastecia a produção era a mesma que abastecia a casa da família. As concentrações dos diferentes indicadores de qualidade microbiológica da água analisados estão relacionadas entre si, assim como as concentrações dos indicadores de qualidade do leite. Entretanto, a qualidade da água utilizada nas propriedades leiteiras não teve relação com a qualidade do leite e foi influenciada pela precipitação pluviométrica.

Palavras-chave: Bactérias psicrotróficas. Manejo de ordenha. CBT. Caseinomacropéptídeo

3.2 ABSTRACT

The study aimed to evaluate the factors that influence the milk quality of family farms of Planalto Norte of Santa Catarina and identify the quality of water used in the cleaning of milking equipment. The study aimed also to establish the relation between bacterial contamination and caseinomacropéptide (CMP) concentration in milk. The research was conducted in dairy farms of Planalto Norte of Santa Catarina visited in winter 2013 and summer 2014, characterized by a semi-structured questionnaire guide. In milk samples were analyzed alcohol test, titratable acidity, pH, total bacterial count analysis (TBC) somatic cell count (SCC), psychrotrophic bacteria count (PBC) and CMP index by high-performance liquid chromatography. Data were evaluated using factor analysis and linear regression. Milking management influenced microbiological quality of milk, but the farm structure had little influence. Bacterial contamination and CMP concentration in milk are related, where increase of both increased linearly CMP concentration in milk. In 84% of water production in farms was the same as that supplied the family home. Concentrations of different indicators of water microbiological quality analyzed are highly related, as well as the concentrations of milk quality indicators. Nevertheless, water quality used in dairy farms was not related to milk quality and was influenced by rainfall.

Keywords: Psychotropic bacteria. Milking management. TBC. Caseinomacropéptide.

3.3 INTRODUÇÃO

O leite pode ser definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011a). Devido a sua composição rica em nutrientes, o leite é facilmente colonizado por bactérias de diferentes origens. Assim, práticas de higiene e limpeza no momento de ordenha são de grande importância para a manutenção da qualidade microbiológica do leite (GUERREIRO et al., 2005).

As bactérias psicotróficas são conhecidas pela sua ação deteriorante, que se deve principalmente à produção de enzimas termorresistentes proteases e lipases, que degradam respectivamente a proteína e a gordura do leite (ARCURI et al., 2008; HANTSIS-

ZACHAROV e HALPERN, 2007). Sua síntese enzimática ótima ocorre entre 20 e 30°C, porém, continua ocorrendo a temperaturas consideravelmente baixas, como as de refrigeração (NIELSEN, 2002). Embora o tratamento térmico elimine a grande maioria dos microrganismos psicrotróficos, a atividade das enzimas termorresistentes continua e resulta em alterações organolépticas do produto final, como a gelatinização e o desenvolvimento de sabor amargo (NÖRNBERG et al., 2009; HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007).

O número de bactérias psicrotróficas que irá se desenvolver após o recolhimento do leite depende da contaminação inicial e está relacionado às condições higiênicas na produção e ao tempo e à temperatura de armazenamento (HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007; ARCURI et al., 2008; NIELSEN, 2002). A superfície de tetos e o equipamento de ordenha são as principais fontes de contaminação do leite por esse grupo de bactérias e a sua variação sazonal têm relação direta o meio ambiente (SILVA M. et al., 2010; SILVA V. et al., 2010).

As caseínas, são fosfoproteínas específicas do leite que, em sua forma natural, apresentam-se formando agregados (micelas) e representam 80% do total das proteínas no leite de vaca. Elas são formadas por frações insolúveis, que abrangem α e β caseínas, e fração solúvel, que é formada pela κ -caseína (SGARBIERI, 2005; FOX E BRODKORB, 2008). Por ser solúvel a κ -caseína está localizada na superfície da micela de caseína e garante a sua estabilidade, sendo mais susceptível a ação das proteases (GAUCHER et al., 2008; BONIZZI et al., 2009). A sua degradação provoca a desestabilização das micelas, que coagulam (NÖRNBERG et al., 2009; FOX E BRODKORB, 2008), podendo ser um possível fator para a ocorrência de leite instável não ácido (LINA). O LINA é uma síndrome multifatorial em que ocorre a perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool sem a haver alteração na acidez adquirida do leite (FISCHER et al., 2011).

Na fabricação de queijos utiliza-se da enzima quimosina para a coagulação do leite, ação que libera o peptídeo terminal da κ -caseína, que permanece solúvel no soro do leite e é denominado Caseinomacropéptido (CMP) (BRASIL, 2010). As proteases produzidas pelas psicrotróficas agem de forma semelhante à quimosina, dando origem ao pseudo-CMP, que difere do CMP por apenas um aminoácido (CAMPOS MOTTA et al., 2014). Como é incapaz de distinguir estes dois peptídeos, o método analítico quantitativo oficial de detecção de adição de soro em leite por cromatografia líquida de alta

eficiência pode ser usado também para monitorar a formação de pseudo-CMP (SANTOS et al., 2009). Até a validação do método de reconhecimento e diferenciação do pseudo-CMP por Campos Motta et al. (2014) a atividade causada pela proteólise das bactérias psicrotróficas no leite não era considerada nos métodos CMP. O leite pode ser destinado ao abastecimento direto quando apresenta concentrações de CMP inferiores a 30 mg/L, pode ser destinado a fabricação de derivados lácteos quando encontra-se com concentrações de CMP entre 30 e 75 mg/L, ou ser destinado à alimentação animal ou à indústria química quando apresentar concentração de CMP acima de 75 mg/L (BRASIL, 2006b).

A qualidade microbiológica da água pode afetar a qualidade do leite e, assim, inviabilizar a obtenção de alimentos que atendam aos padrões microbianos exigidos pela legislação em vigor (GUERRA et al., 2011). Visto que a qualidade microbiológica da água utilizada na limpeza e sanificação do equipamento de refrigeração e dos utensílios em geral constitui um ponto crítico no processo de obtenção e refrigeração do leite, as instalações de ordenha devem ter ponto de água corrente de boa qualidade, adequadamente clorada e com controle diário da taxa de cloro (BRASIL, 2011a).

Bactérias do trato entérico são utilizadas como indicadores primários da qualidade da água. Elas colonizam o trato gastrointestinal, tanto do homem como de outros animais de sangue quente, e são eliminadas através da matéria fecal. O grupo de microrganismos coliformes é usado como indicador primário da presença potencial de patógenos por ser contaminante comum do trato gastrointestinal, onde está presente em grande quantidade, por permanecer mais tempo na água que as bactérias patogênicas e se comportar de maneira semelhante aos patógenos nos sistemas de desinfecção. Os microrganismos que formam o grupo dos coliformes totais vivem como saprófitos independentes ou como bactérias intestinais, e os coliformes fecais (*Escherichia coli*) são de origem intestinal (PULIDO et al., 2005; LARSEN et al., 1994). O padrão de potabilidade da água fixado pela Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b) define o limite de até 500 UFC/mL de bactérias heterotróficas e ausência em 100 mL de coliformes totais e *E. coli*.

O estudo objetivou avaliar os fatores que influenciam na qualidade do leite de propriedades da agricultura familiar no Planalto Norte Catarinense e identificar a qualidade da água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha. O trabalho objetivou

também objetivou estabelecer a relação entre a contaminação bacteriana (CBP e CBT) e a concentração de CMP no leite.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em propriedades leiteiras do Planalto Norte Catarinense. Participaram da pesquisa as propriedades dos cooperados de três cooperativas de leite da agricultura familiar dos municípios de Major Vieira, Papanduva e Monte Castelo. Foram avaliadas 66 propriedades leiteiras no inverno e 69 no verão, resultando um total de 135 amostras analisadas, sendo as diferenças no número de propriedades de uma coleta para a outra devido à entrada de produtores nas cooperativas.

As propriedades participantes foram visitadas duas vezes, uma no inverno (julho de 2013) e outra no verão (fevereiro de 2014). Em cada visita foram coletadas amostras de leite diretamente dos tanques resfriadores e amostras da água que era utilizada para a limpeza dos equipamentos de ordenha. Nas duas estações, as propriedades foram caracterizadas por meio de um questionário guia semi-estruturado (Anexo A), aprovado no Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 12185013.6.0000.0121, abordando manejo alimentar e caracterização da propriedade e da produção leiteira por perguntas objetivas direcionadas ao produtor ou por visualização do entrevistador, principalmente quando relativas às instalações e equipamentos.

Foram disponibilizados pela EPAGRI/CIRAM os dados de precipitação pluviométrica total diária em milímetros de todos os dias de coleta das estações de pesquisa localizadas nos municípios de Major Vieira, Papanduva e Monte Castelo. Para as análises estatísticas foram usadas a soma da precipitação pluviométrica total diária em milímetros do dia da coleta e do dia anterior a coleta, ocorridas no respectivo município.

3.4.1 Coleta de amostras e análises laboratoriais do leite

O leite foi homogeneizado antes de cada coleta ligando a agitação do tanque de expansão por cinco minutos ou, no caso de refrigeradores de imersão, utilizando um agitador manual para homogeneizar os tarros por, pelo menos, dez segundos (DIAS e

ANTES, 2012). A coleta do leite foi feita com concha coletora de aço inoxidável, flambada com álcool 96%, imediatamente antes de cada coleta. No caso de refrigeradores de imersão, com mais de um tarro, foram coletados números iguais de amostras de cada tarro que foram misturadas em um recipiente de aço inoxidável para depois serem acondicionadas nos frascos de coleta. Os frascos foram identificados com o número do produtor e colocados em caixa isotérmica com gelo reciclável para mantê-los em temperatura máxima de 7°C.

As amostras para as análises físico-químicas do leite foram coletadas em frascos de 100 ml e encaminhadas em caixa isotérmica ao Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade do Contestado – Campus Canoinhas, Marcílio Dias (na coleta de verão) ou ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Santa Catarina - Campus Canoinhas (na coleta de inverno), assim como as amostras para análise de CBP no leite.

No teste de estabilidade do leite ao álcool foi avaliada a concentração de álcool etílico em que ocorre a precipitação do leite. Para tal, foram pipetadas soluções alcoólicas crescentes de 58 a 80% (v/v), com intervalos de 2% em uma placa de Petri com o mesmo volume de leite e, após homogeneização, foi avaliada a presença de grumos na placa. Foram consideradas como leite instável não ácido (LINA) as amostras de leite que precipitaram em concentração de álcool menor ou igual a 72%, com acidez e pH normais (entre 14 e 18°D e entre 6,6 e 6,8, respectivamente) (BRASIL, 2011a). A determinação da acidez titulável foi feita através do teste de Dornic descrito pela IN 68 (BRASIL, 2006a). O pH do leite foi medido com um peagâmetro portátil (Sanxin SX711).

As amostras para CBP no leite (coletadas em frascos estéreis, sem conservante) foram diluídas a partir de 1 ml da amostra de leite em 9 ml de solução salina peptonada estéril a 0,1% (ISO, 1999), seguida de homogeneização, em quatro diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 10^{-4} . De cada diluição seriada, uma alíquota de 0,1mL foi plaqueada, em duplicata, através de plaqueamento em superfície (Spread Plate) em Ágar padrão para contagem (PCA) com o auxílio de uma alça de Drigalski (SILVA N. 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.

Para a análise de CCS as amostras de leite foram acondicionadas em frascos-padrão para coleta contendo o conservante bronopol, e para análise de CBT em frascos contendo o conservante

azidiol. As amostras para CBT e CCS foram analisadas por citometria de fluxo (IDF, 2004; IDF, 2006) através dos contadores eletrônicos BACTOCOUNT – IBC e SOMACOUNT 500 (Bentley Instruments Inc.), respectivamente. Estas análises foram realizadas pelo Laboratório do Programa de Análises do Rebanho Leiteiro (PARL) da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), em Curitiba – PR, participante da Rede Brasileira de Qualidade do leite.

3.4.2 Coleta de amostras e análises laboratoriais da água

Foram coletadas amostras da água que era usada para a limpeza dos equipamentos de ordenha, estando ela disponível no interior da sala de ordenha ou não. Para a coleta das amostras de água, a região interna da torneira, ou outra extremidade de saída de água, foi higienizada com algodão embebido em álcool 70% e, após a higienização, aguardou-se o escoamento da água por 2 min para realizar a coleta da amostra em saco para coleta de alimentos estéril (APHA, 2005). As amostras de água foram transportadas em caixa isotérmica com gelo reciclável (temperatura máxima de 7°C) até o Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade do Contestado – Campus Canoinhas, Marcílio Dias (na coleta de verão) ou o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Santa Catarina – Campus Canoinhas (na coleta de inverno) para as seguintes análises microbiológicas da água: *Escherichia coli*, coliformes a 35°C, aeróbios mesófilos e bactérias psicrotróficas.

As amostras para quantificação de *Escherichia coli*, coliformes à 35°C e aeróbios mesófilos (AM) foram processadas em Agar desidratado (Placas 3M Petrifilm™), para Contagem de E.coli e Coliformes, e para Contagem de Aeróbios. Cada inoculação utilizou duas placas: uma inoculada com 1 mL da amostra integral de água e outra com 1 mL da diluição de 1 mL da amostra integral em 9 mL de solução salina peptonada estéril a 0,1% (ISO, 1999), seguida de homogeneização. Após a inoculação as placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 h para posterior contagem (AOAC 990.12; AOAC 991.14). Na quantificação de *Escherichia coli* e coliformes a 35°C foram contabilizadas apenas as colônias que produziram gás.

Para a CBP as amostras de água foram processadas a partir da amostra integral e de duas diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) da diluição de 1 mL da amostra de leite em 9 mL de salina peptonada estéril a 0,1%

(ISO, 1999), seguida de homogeneização. A análise foi realizada do mesmo modo descrito para a CBP do leite (SILVA N. et al., 2010).

3.4.3 Determinação do índice caseinomacropeptídeo (CMP) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras de leite cru permaneceram congeladas (temperatura média de -20°C) até o momento da análise realizada no Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA), em São José – SC, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguindo a metodologia oficial do MAPA para quantificação de CMP (BRASIL, 2006a; 2010). As amostras foram descongeladas em banho-maria e logo após, para cada alíquota de 10 mL da amostra, foram adicionados 5 mL de ácido tricloroacético a 24% (m/v), sob agitação constante. Após repouso de 60 min a temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e injetadas em cromatógrafo HPLC Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). A coluna de filtração em gel utilizada foi a Zorbax GF-250 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), pN 884973-901, 250 mm de comprimento, 9,4 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 4 μm .

A fase móvel constituiu-se de solução tampão fosfato pH 6,0 (3,48 g de K_2HPO_4 ; 24,74 g de KH_2PO_4 e 42,82 g de Na_2SO_4 dissolvidos em 1500 mL de água deionizada destilada). O pH da solução foi ajustado para 6,0, usando a solução de K_2HPO_4 0,1 M. A solução foi filtrada a vácuo no sistema de filtração de solventes com membrana de 0,45 μm .

Construiu-se uma curva de calibração em matriz, com seis diferentes pontos de concentração de CMP, sendo um “branco” (0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e os demais pontos com concentrações de 15, 30, 45, 70 e 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Essas concentrações foram obtidas dispensando diretamente sobre a amostra branca o volume apropriado da solução-estoque de CMP (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A amostra branca (leite em pó) foi previamente analisada para CMP, apresentando resultado negativo. Também foi preparada uma amostra para avaliação da recuperação, adicionando 9700 μL de branco e 300 μL de solução-padrão estoque de CMP. A concentração dessa amostra era de 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que corresponde ao limite regulatório para que o leite possa ser destinado para abastecimento direto (BRASIL, 2006b).

3.4.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados por análise multivariada fatorial e por regressão segmentada (*broken-line*) usando o pacote estatístico SAS[®] (SAS Institute, 2002).

A análise fatorial foi realizada pelo procedimento FACTOR, considerando dois fatores e a rotação da matriz (Promax), sendo os dados previamente padronizados pelo procedimento STANDARD. Foi estudada a relação do manejo de ordenha e estrutura da propriedade com a qualidade do leite através das variáveis tipo de equipamento de ordenha (manual, equipamento mecanizado balde ao pé e totalmente mecanizado), tipo de tanque resfriador (tanque de imersão e de expansão), estrutura sala ordenha (estrutura de madeira, de alvenaria sem azulejo e de alvenaria com azulejo), detergente para higienização do equipamento de ordenha (usa ou não), água quente na limpeza de equipamentos (usa ou não), pré-dipping (realiza ou não), fornecimento de alimentação durante ordenha (fornece ou não), CBP e CBT. Foi analisada a relação das variáveis relacionadas a qualidade do leite através da CBT, CBP (transformados para \log_{10}), CMP e concentração de álcool. A influencia do nível de contaminação bacteriana (logaritmo 10 de CBP e CBT) no aumento da concentração de CMP no leite foi estimada por regressão segmentada (*broken-line*) utilizando-se o procedimento NLIN.

Para avaliar a relação entre os indicadores de qualidade microbiológica da água e do leite, da contagem de células somáticas do leite, da precipitação pluviométrica e da origem da água utilizada para limpeza dos equipamentos (originária de nascente ou poço comum e de poço artesiano ou semi-artesiano) também foi empregada análise fatorial. Os dados de AM, CBP e Coliformes a 35°C na água, e de CBP, CBT e CCS no leite foram previamente transformadas para logaritmo de base 10. Para fins estatísticos a variável *Escherichia coli* na água foi dividida ausência e presença de *E. coli* com intuito de auxiliar na análise dos resultados.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores mínimos para os indicadores de qualidade do leite (Tabela 5) demonstram que houve amostras (6%) com ausência de CBP no leite, que pode ser efeito de boa higiene ou da presença de antimicrobianos no leite. A concentração de CMP nas amostras de leite

teve grande variação com números entre $1,29 \text{ mg.L}^{-1}$ e $114,25 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo a média de $10,71 \text{ mg.L}^{-1}$. A precipitação do leite no teste do álcool ocorreu, em média, na concentração alcoólica de 73%. Os valores de CBT e CCS apresentaram média de $5,02 \log_{10} \text{ UFC/mL}$ ($1,0 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$) e $5,42 \log_{10} \text{ UFC/mL}$ ($2,6 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$), respectivamente, que ficaram abaixo do exigido pela legislação atual de $3 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ para CBT e $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ para CCS (BRASIL, 2011a).

Em relação ao manejo de ordenha, 54% das propriedades declaravam fazer pré-dipping e 76% alimentavam os animais durante a ordenha. No procedimento de limpeza dos equipamentos de ordenha, 65% usavam detergente específico e 87% possuíam água quente. A ação dos produtos de limpeza está relacionada ao uso conjunto de detergente e água quente, já que a máxima eficiência detergente alcalino clorado é alcançada com temperatura próxima a 70°C , sendo sua eficiência muito baixa em temperatura ambiente (WINCK E THALER NETO, 2009).

Tabela 5 - Estatística descritiva das variáveis utilizadas para as análises fatoriais.

Grupo	Variável	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Manejo de ordenha	Detergente equipamento ordenha ¹	0,65 ± 0,48	0,00	1,00
	Uso água quente limpeza ²	0,87 ± 0,34	0,00	1,00
	Alimentação durante ordenha ³	0,76 ± 0,43	0,00	1,00
	Pré-dipping ⁴	0,54 ± 0,50	0,00	1,00
Qualidade do leite	CBP (log ₁₀ UFC/mL) ⁵	4,73 ± 1,51	0,00	7,17
	CBT (log ₁₀ UFC/mL) ⁶	5,02 ± 0,79	3,30	7,00
	CCS ⁷ (log ₁₀ cel/mL)	5,42 ± 0,43	4,26	6,19
	CMP (mg.L ⁻¹) ⁸	10,71 ± 15,16	1,29	114,25
	Concentração de álcool (°GL) ⁹	73,06 ± 5,16	58,00	80,00
Estrutura da propriedade	Estrutura sala ordenha ¹⁰	0,20 ± 0,51	0,00	2,00
	Tipo equipamento de ordenha ¹¹	2,01 ± 0,40	1,00	3,00
	Tipo de tanque resfriador ¹²	1,68 ± 0,47	1,00	2,00
Qualidade da Água	Origem da água ¹³	0,09 ± 0,29	0,00	1,00
	Uso da água ¹⁴ (%)	84,37 ± 36,45	0,00	100,00
	AM ¹⁵ (log ₁₀ UFC/mL)	2,69 ± 0,79	0,00	4,64
	CBP ¹⁶ (log ₁₀ UFC/mL)	1,80 ± 1,24	0,00	4,61
	Coliformes 35°C (log ₁₀ UFC/mL)	1,04 ± 0,65	0,00	3,09
	<i>E. coli</i> ¹⁷	0,48 ± 0,50	0,00	1,00

¹ 0 = não higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico e 1 = higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico. ² 0 = não

higieniza os equipamentos de ordenha com água quente e 1 = higieniza os equipamentos de ordenha com água quente. ³ 0 = não alimenta no momento da ordenha e 1 = alimenta no momento da ordenha. ⁴ 0 = não realiza pré-dipping e 1 = realiza pré-dipping. ⁵Contagem de bactérias psicotróficas. ⁶Contagem bacteriana total no leite. ⁷Contagem de células somáticas do leite. ⁸ Concentração de Caseinomacropéptido no leite. ⁹Gradação alcoólica em que ocorreu a precipitação do leite no teste do álcool. ¹⁰ 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. ¹¹ 1 = ordenha manual, 2 = equipamento mecanizado balde ao pé e 3 = equipamento totalmente mecanizado. ¹² 1 = tanque de imersão e 2 = tanque de expansão. ¹³ 0 = originária de nascente ou poço comum e 1 = originária de poço artesiano ou semi-artesiano. ¹⁴Propriedades em que a água que abastecia a casa tinha a mesma origem da utilizada para a higienização dos equipamentos de ordenha. ¹⁵Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na água. ¹⁶Contagem de bactérias psicotróficas na água. ¹⁷*Escherichia coli* na água: 0 = ausência de *E.coli* e 1 = presença de *E. coli*.

Fonte: Próprio autor.

A água da maioria das propriedades (91%) era originária de nascente ou poço comum. Em 84% das propriedades a água que era usada na produção era a mesma que abastecia a casa da família, sendo utilizada em todas as tarefas domésticas, inclusive beber e cozinhar. Os valores mínimos para os indicadores de qualidade microbiológica da água (Tabela 5) demonstram que, mesmo sem acesso ao saneamento básico, algumas propriedades apresentaram amostras de água ausente de qualquer contaminação microbiológica, sendo que em 2% das propriedades foi verificado o tratamento de água com cloro.

As estações inverno e verão foram bem definidas na região durante a execução do trabalho, com temperatura média de 8,3°C e amplitude térmica de 3,9°C a 13,8°C no inverno e temperatura média de 23,7°C com amplitude de 17,2°C a 31,8°C no verão. A precipitação pluviométrica média diária foi de 9,5 mm no inverno e de 1,1 mm no verão (dados meteorológicos disponibilizados pela EPAGRI/CIRAM).

Em uma primeira análise fatorial relacionou-se o manejo de ordenha e infra-estrutura da propriedade com a qualidade do leite e a soma dos dois primeiros fatores explicou 43,93% da variação total. A relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada numérica e graficamente na tabela 6 e figura 3, respectivamente. No fator 1 as variáveis com maior carga fatorial positiva foram: detergente, equipamento, ordenha, tipo de tanque, resfriador e uso água quente, limpeza; e de carga fatorial negativa: alimentação durante ordenha, CBP e CBT. No fator 2 as variáveis pré-dipping, tipo equipamento de

ordenha e infra-estrutura sala ordenha tiveram maior carga fatorial e estão relacionadas positivamente. Estas relacionam-se também com a CBT, mas com carga fatorial menos representativa. As elevadas comunalidades demonstraram a alta relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 6 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona o manejo de ordenha e infra-estrutura da propriedade com a qualidade do leite.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Detergente equipamento ordenha ¹	0,6732	0,1861	54,00
Tipo de tanque resfriador ²	0,5405	0,1776	36,37
Uso água quente limpeza ³	0,5146	0,2367	37,15
Alimentação durante ordenha ⁴	-0,5668	0,2127	31,63
CBP (log ₁₀ UFC/mL) ⁵	-0,6325	-0,0064	40,17
CBT (log ₁₀ UFC/mL) ⁶	-0,6785	0,3613	48,89
Pré-dipping ⁷	-0,0207	0,7207	51,36
Tipo equipamento de ordenha ⁸	0,2460	0,7061	63,14
Estrutura sala ordenha ⁹	-0,1645	0,5829	32,69
% Variância	28,04	15,89	

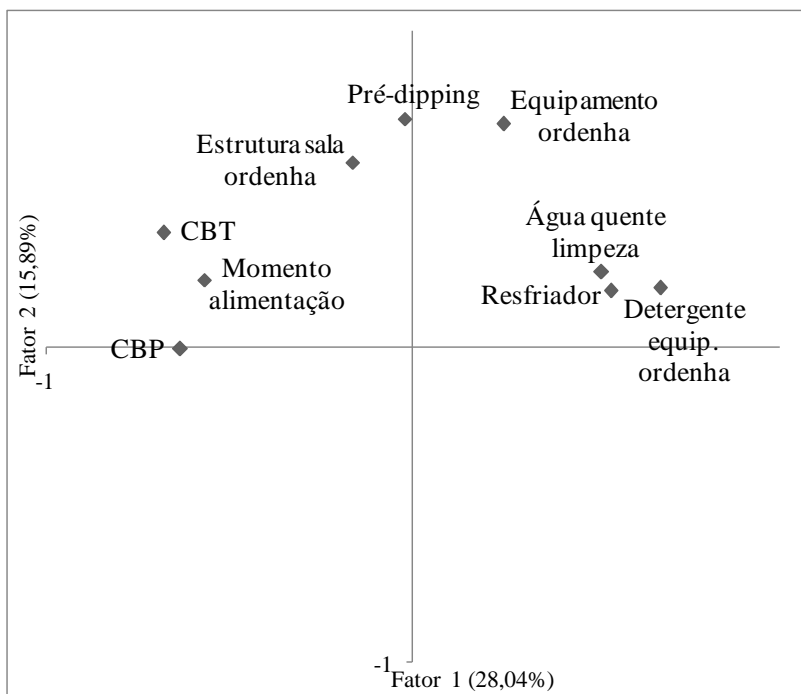
¹ 0 = não higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico e 1 = higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico. ² 1 = tanque de imersão e 2 = tanque de expansão. ³ 0 = não higieniza os equipamentos de ordenha com água quente e 1 = higieniza os equipamentos de ordenha com água quente. ⁴ 0 = não alimenta no momento da ordenha e 1 = alimenta no momento da ordenha. ⁵ Contagem de bactérias psicrotóxicas. ⁶ Contagem bacteriana total no leite. ⁷ 0 = não realiza pré-dipping e 1 = realiza pré-dipping. ⁸ 1 = ordenha manual, 2 = equipamento mecanizado balde ao pé e 3 = equipamento totalmente mecanizado. ⁹ 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo. Fonte: Próprio autor.

A partir das relações entre as variáveis da Figura 3, observa-se que a maioria dos produtores que utilizavam tanque resfriador de expansão direta também utilizava água quente e detergente específico para limpeza do equipamento de ordenha. Estas propriedades apresentavam menor CBT e CBP no leite. Por serem mais fáceis de limpar os tanques de expansão têm menor contribuição no aporte de

carga bacteriana para o leite cru (MCPHEE E GRIFFITHS, 2011). Mas, deve-se considerar que o equipamento de ordenha é uma fonte importante de contaminação do leite, por isso, os procedimentos de limpeza e higienização desse componente podem influenciar diretamente no índice de contaminação microbiana do leite (GUERREIRO et al., 2005). Altas contagens bacterianas no leite podem estar associadas a falhas na higienização destes equipamentos, envolvendo concentrações de produtos de limpeza ou temperaturas incorretas (SANTANA et al., 2001). Limpeza de rotina e desinfecção da máquina de ordenha eficientes minimizam o risco de contaminação bacteriana, porém, sua eficácia também depende das instalações e da qualidade da água (MCPHEE E GRIFFITHS, 2011; ESTÉVEZ et al., 2011). A maioria dos proprietários que não faziam as práticas anteriormente citadas alimentavam os animais durante a ordenha e possuíam leite com alta CBP e CBT.

A relação positiva entre pré-dipping, tipo equipamento de ordenha e estrutura sala ordenha foi mais representativa que suas relações com a CBT do leite, indicando que a influência dessas variáveis nas contagens bacterianas não é tão alta. Assim, propriedades mais tecnificadas e com melhor infra-estruturas são as que mais realizavam pré-dipping no manejo de ordenha. Além da aquisição de equipamentos (ordenhadeira mecânica e resfriadores), necessita-se de mudança na atitude do produtor quanto à adoção de técnicas adequadas de higiene de ordenha para a melhoria da qualidade microbiológica do leite (WINCK E THALER NETO, 2009). Matsubara et al. (2011) constataram que, após a utilização do pré-dipping, ocorreu uma redução de 85,3% da CBP no teto que poderia ser incorporada ao leite no processo de ordenha, porém, no presente trabalho não houve relação entre a prática de pré-dipping e a contaminação de psicotróficas no leite.

Figura 3 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis relacionam manejo de ordenha e infra-estrutura da propriedade com a qualidade do leite.



Detergente equip. ordenha: 0 = não higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico e 1 = higieniza o equipamento de ordenha com detergente específico. Resfriador: 1 = tanque de imersão e 2 = tanque de expansão direta. Água quente limpeza: 0 = não higieniza os equipamentos de ordenha com água quente e 1 = higieniza os equipamentos de ordenha com água quente. Momento alimentação: 0 = não alimenta no momento da ordenha e 1 = alimenta no momento da ordenha. CBP: Contagem de bactérias psicotróficas. CBT: Contagem bacteriana total no leite. Pré-dipping: 0 = não realiza pré-dipping e 1 = realiza pré-dipping. Equipamento ordenha: 1 = ordenha manual, 2 = equipamento mecanizado balde ao pé e 3 = equipamento totalmente mecanizado. Estrutura sala ordenha: 0 = estrutura de madeira, 1 = estrutura de alvenaria sem azulejo e 2 = estrutura de alvenaria com azulejo.

Fonte: Próprio autor.

Em uma segunda análise fatorial foram avaliadas as relações entre as variáveis indicadoras de qualidade do leite, sendo que a soma dos dois primeiros fatores explicou 67,51% da variação total (Tabela 7).

No primeiro fator as variáveis com maior carga fatorial foram CMP, CBT e CBP. No segundo, apenas a variável concentração de álcool. As comunalidades demonstraram a relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 7 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis relacionadas a qualidade do leite utilizadas na análise fatorial.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
CBT (\log_{10} UFC/mL) ¹	0,8553	0,0039	73,12
CMP (mg.L-1) ²	0,7111	0,0286	50,46
CBP (\log_{10} UFC/mL) ³	0,6803	-0,0352	46,63
Concentração de álcool (°GL) ⁴	-0,0016	0,9991	99,83
% Variância	42,64	24,87	

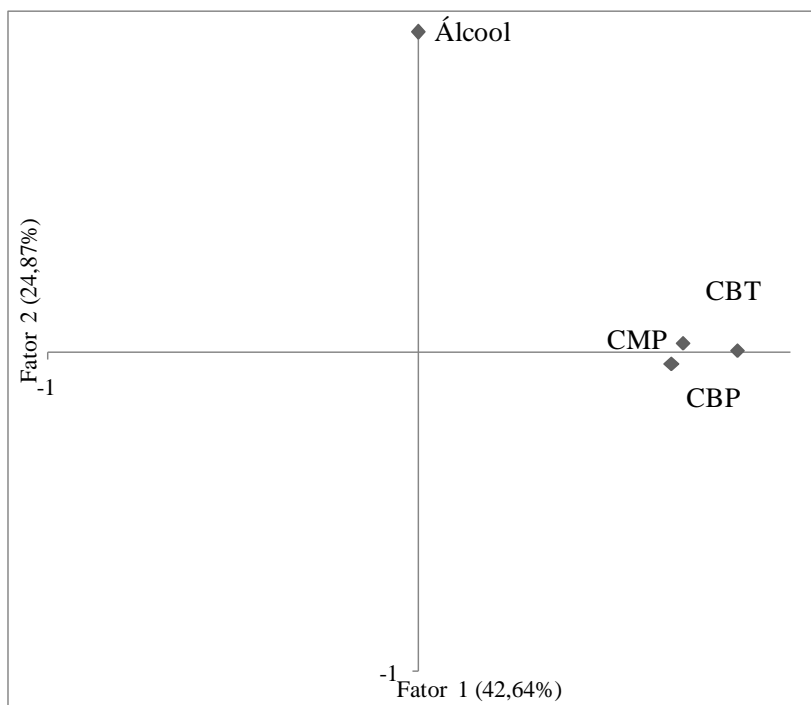
¹ Contagem bacteriana total no leite. ² Concentração de Caseinomacropéptido no leite. ³ Contagem de bactérias psicrotróficas. ⁴ Gradação alcoólica em que ocorreu a precipitação do leite no teste do álcool.

Fonte: Próprio autor.

A Figura 4 mostra que as contagens bacterianas (CBT e CBP) possuem relação positiva com a concentração de CMP no leite, e que estas não estão relacionadas com a estabilidade do leite ao teste do álcool. A CBP não afetou a estabilidade das micelas de caseína quando submetidas ao teste do álcool, sugerindo baixo efeito proteolítico das enzimas.

Closs e Souza (2011) verificaram que as amostras de leite cru refrigerado com maior formação de CMP foram as que apresentaram maior CBP. Já Oliveira et al. (2009) ao pesquisar a atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas perceberam que o leite, mesmo adicionado de 30% de soro de queijo, apresentou concentrações de CMP inferiores ao leite contaminado com *P. fluorescens* e mantido durante 5 dias a 7°C.

Figura 4 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis relacionadas a qualidade do leite.



CBT: Contagem bacteriana total no leite. CMP: Concentração de Caseinomacropéptido no leite. CBP: Contagem de bactérias psicrotólicas. Álcool: Graduação alcoólica em que ocorreu a precipitação do leite no teste do álcool.

Fonte: Próprio autor.

Ainda em relação a influência das contagens bacterianas na formação do CMP no leite observou-se regressão segmentada (*broken line*) significativa da concentração de CMP em função da CBP ($P = 0,0111$) e da CBT ($P < 0,0001$). As respectivas equações de regressão estimadas foram $\log_{10}CBP = 0,7876 - 0,1498 (4,4564 - \log_{10}CMP)$ ($R^2 = 0,0972$) e $\log_{10}CBT = 0,7219 - 0,2419 (4,3241 - \log_{10}CMP)$ ($R^2 = 0,2293$).

A concentração de CMP no leite aumentou linearmente com o aumento tanto da CBP quanto da CBT (Figura 5), a partir do ponto de quebra das regressões, que foi de $4,4564 \log_{10}$ UFC/mL ($2,8 \times 10^4$ UFC/mL) e de $4,3241 \log_{10}$ UFC/mL ($2,1 \times 10^4$ UFC/mL), para CBP e

para CBT, respectivamente. Visto isso, o presente trabalho mostra que contagens em torno de 10^4 já influenciam na formação de CMP no leite, resultado da ação proteolítica das bactérias. Os valores de ponto de quebra foram bem próximos para as duas contagens, o que pode indicar uma dinâmica semelhante nas duas populações, como observado por Hantsis-Zacharov e Halpern (2007) que encontraram relação positiva entre a dinâmica populacional psicrotóxicos e mesófilos.

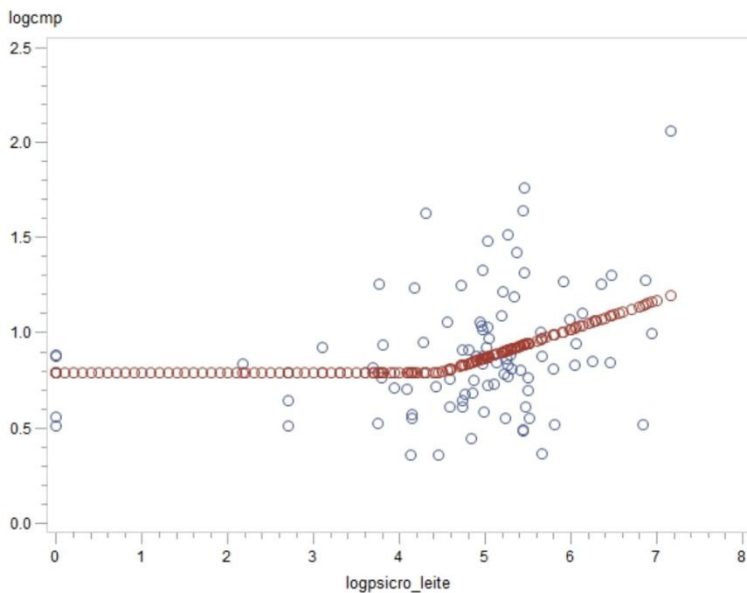
Nornberg et al. (2009) não conseguiram estabelecer uma relação entre atividade proteolítica e a CBP, mesmo reconhecendo o potencial deteriorante das proteases de bactérias psicrotóxicas. Isto sugere que o fenômeno da proteólise está principalmente associado a linhagens específicas de bactérias psicrotóxicas com elevada capacidade de proteólise. Ainda, algumas espécies de microrganismos psicrotóxicos seriam os principais responsáveis pela produção de enzimas termorresistentes (NORNBERG ET AL., 2009).

Embora a regressão tenha sido significativa nos dois casos, a proporção da variação dos dados de concentração de CMP que foi explicada pelas contagens bacterianas foi baixa. Esta alta variabilidade dos dados pode ser explicada pelo perfil bacteriano original do leite cru, que é resultado das diferentes localizações geográficas das fazendas de onde o leite é originário.

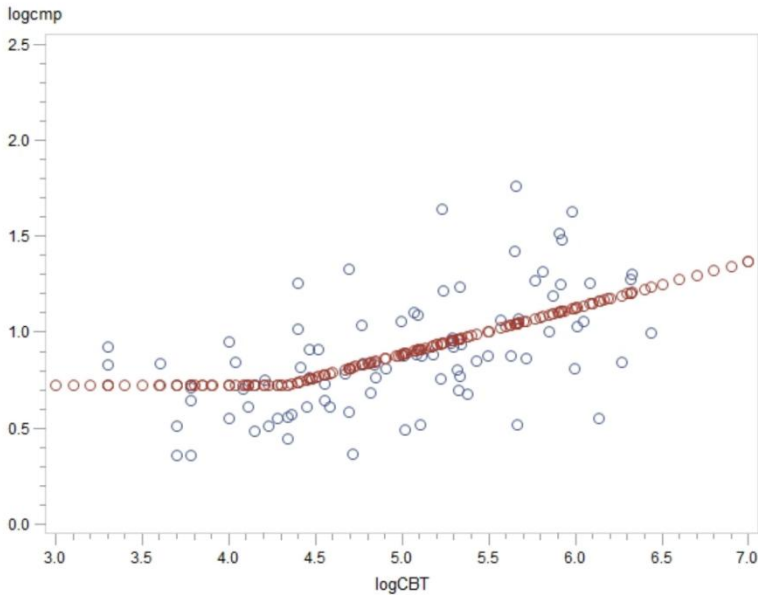
Alguns microrganismos psicrotóxicos exibem baixa capacidade enzimática. Dos que possuem esta capacidade, poucos apresentaram somente atividade proteolítica, já que alguns apresentam apenas atividade lipolítica e outros atividade lipolítica e proteolítica (HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007). Além disso, o CMP pode ter sua origem não apenas da adição de soro de queijo ou a da proteólise bacteriana, pois a ordenha recente de vacas possui uma quantidade variável de CMP endógena no leite. Esse valor basal de CMP é provavelmente originário de erros naturais na síntese de proteínas associadas à proteólise endógena e nas respostas fisiológicas relacionadas à alimentação, do clima e de outros fatores (CAMPOS MOTTA et al., 2014).

Figura 5 – Regressão segmentada da concentração de CMP em função de CBP (a) e CBT (b) (variáveis transformadas para \log_{10}).

a) Regressão segmentada da concentração de CMP em função de CBP.



b) Regressão segmentada da concentração de CMP em função de CBT.



logcmp: Concentração de Caseinomacropéptido (\log_{10} UFC/mL). logpsicro: Contagem de bactérias psicrotóficas (\log_{10} UFC/mL). logCBT: Contagem bacteriana total (\log_{10} UFC/mL).

Fonte: Próprio autor.

Analisou-se a influência da qualidade da água na qualidade do leite através de análise fatorial, sendo que a soma dos dois primeiros fatores explicou 58,29% da variação total. A relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada na Tabela 8 e na Figura 6. O fator 1 representa a relação positiva entre as variáveis que indicam a qualidade microbiológica da água (coliformes a 35°C, *Escherichia coli*, aeróbios mesófilos e psicrotóficos) demonstrada pela igualdade de suas cargas fatorais. O fator 2 representa a relação positiva entre as variáveis que indicam a qualidade do leite (CBT, CCS e psicrotóficos do leite), também com igualdade de suas cargas fatorais. As elevadas comunalidades demonstraram a alta relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 8 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a qualidade da água com a qualidade do leite.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Coliformes 35° C água (log ₁₀ UFC/mL)	0,8640	-0,0873	75,88
<i>E. coli</i> água ¹	0,7998	0,0723	64,12
AM água ² (log ₁₀ UFC/mL)	0,7797	-0,0064	60,83
CBP água ³ (log ₁₀ UFC/mL)	0,7449	0,0507	55,50
CBT leite ⁴ (log ₁₀ UFC/mL)	-0,0229	0,8728	76,36
CCS ⁵ (log ₁₀ cel/mL)	0,0043	0,7106	50,47
CBP leite ⁶ (log ₁₀ UFC/mL)	0,0523	0,4974	24,85
% Variância	36,47	21,82	

¹*Escherichia coli* na água: 0 = ausência de *E.coli* e 1 = presença de *E. coli*.

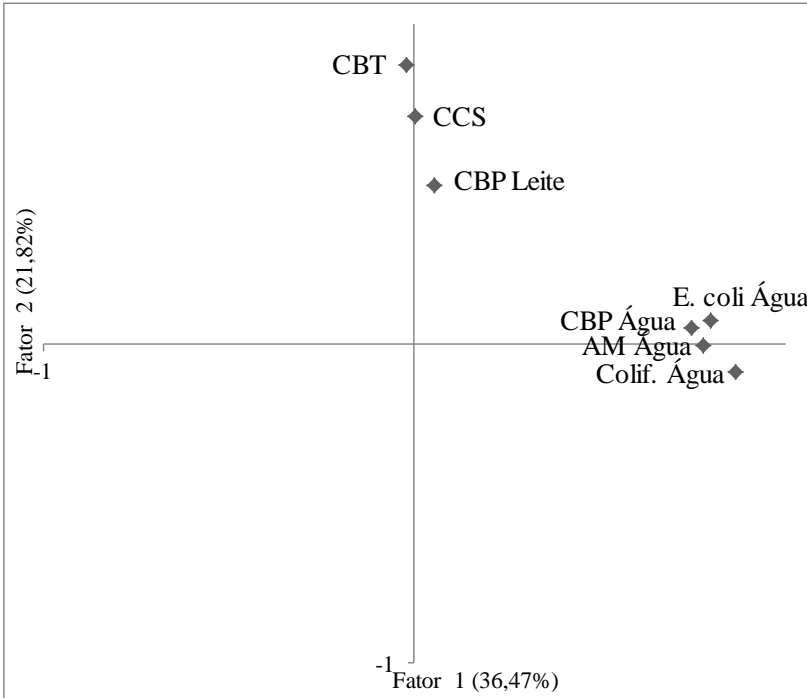
²Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na água. ³Contagem de bactérias psicrotóficas na água. ⁴Contagem bacteriana total do leite. ⁵Contagem de células somáticas do leite. ⁶Contagem de bactérias psicrotóficas no leite.

Fonte: Próprio autor.

A distribuição dos dois primeiros fatores permite visualizar (Figura 6) a alta relação entre os indicadores de qualidade da água e a relação próxima entre as variáveis que indicam a qualidade do leite, porém, não foi demonstrada relação entre a qualidade da água e a qualidade do leite. A falta de associação entre qualidade da água e do leite foi relatada também no trabalho de Ramires et al. (2009), os quais explicaram que a água não foi um fator decisivo para os altos valores de CBT, podendo ser atribuídos às condições de higiene antes, durante e após a ordenha ou ainda na higienização dos tanques, caracterizada pela utilização de produtos de limpeza insuficientes ou não apropriados. Esses mesmos autores também afirmaram que a CCS depende mais de outros fatores, tais como estágio da lactação, idade dos animais, estação do ano, manejo de ordenha, etc., do que da qualidade microbiológica da água. Silva (2014) relatou que a melhoria da qualidade microbiológica da água não repercutiu na qualidade microbiológica do leite, ressaltando

que, tanto os indicadores da qualidade microbiológica do leite como da água, possuem alta relação entre si.

Figura 6 - Dispersão das cargas fatoriais das variáveis de qualidade do leite e de qualidade da água.



E. coli água: 0 = ausência de *E.coli* e 1 = presença de *E. coli*. AM água: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na água. Colif. Água: Contagem de coliformes na água. CBP água: Contagem de bactérias psicotróficas na água. CBT: Contagem bacteriana total do leite. CCS: Contagem de células somáticas do leite. CBP leite: Contagem de bactérias psicotróficas no leite.

Fonte: Próprio autor.

Foram avaliadas as variáveis que influenciam na qualidade da água, sendo que a soma dos dois primeiros fatores explicou 66,81% da variação total. A relação entre as variáveis que compõem cada fator é apresentada na Tabela 9 e Figura 7. No fator 1, as variáveis com maior carga fatorial foram coliformes 35°C, aeróbios mesófilos, presença *E. coli* e origem da água. No fator 2, as variáveis com maior carga fatorial

foram precipitação pluviométrica e CBP. As comunalidades demonstraram a relevância de cada variável utilizada nesta análise e a importância destas para o estudo.

Tabela 9 - Cargas fatoriais, comunalidades e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona qualidade da água com sua origem e a precipitação pluviométrica.

Variáveis	Fatores		Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	
Coliformes 35° C (log ₁₀ UFC/mL)	0,8092	0,1738	75,94
AM (log ₁₀ UFC/mL) ¹	0,8069	0,0043	65,29
<i>E. coli</i> ²	0,6429	0,2934	59,91
CBP (log ₁₀ UFC/mL) ³	0,4009	0,6464	71,57
Origem da água ⁴	-0,7399	0,4376	56,77
Precipitação ⁵	-0,1458	0,8718	71,41
% Variância	46,87	19,94	

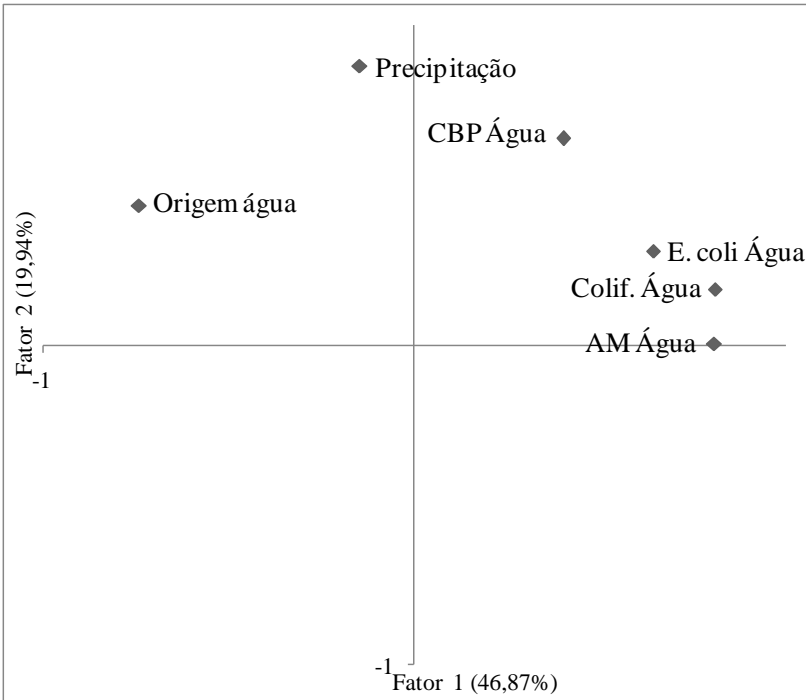
¹Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na água. ²*Escherichia coli* na água: 0 = ausência de *E.coli* e 1 = presença de *E. coli*. ³Contagem de bactérias psicrotróficas na água. ⁴0 = originária de nascente ou poço comum e 1 = originária de poço artesiano ou semi-artesiano. ⁵ Precipitação: acumulado das precipitações pluviométricas ocorridas do dia anterior até o dia da coleta.

Fonte: Próprio autor.

A distribuição dos dois primeiros fatores (Figura 7) permite visualizar, em relação ao fator 1, que uma menor contagem de coliformes a 35°C e de aeróbios mesófilos, e a ausência de *E. coli*, que indicam uma alta qualidade da água, estão relacionados com a água originária de poço artesiano ou semi-artesiano. Amaral et al. (2004) observaram melhor qualidade da água em relação a coliformes totais e *E. coli* nas águas originárias de poços, quando comparados a nascentes. As nascentes muitas vezes são consideradas como ambientes equilibrados e com água potável. Porém, o uso e a ocupação do solo nas áreas de entorno, bem como os impactos derivados, podem alterar substancialmente a qualidade da água das nascentes (FELIPPE e MAGALHÃES JÚNIOR, et al., 2012).

Ao observar a relação entre as variáveis do fator 2, percebe-se que a contaminação da água por psicrotróficos é influenciada pela precipitação pluviométrica. Kostyla et al. (2015) demonstraram haver contaminação fecal mais frequente durante a estação chuvosa em relação a todas as bactérias indicadoras de contaminação fecal, todos os tipos de fontes de água e zonas climáticas pesquisadas

Figura 7 – Distribuição das cargas fatoriais das variáveis de qualidade microbiológica da água, precipitação pluviométrica e origem da água.



E. coli água: 0 = ausência de *E.coli* e 1 = presença de *E. coli*. AM água: Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos na água. Colif. Água: Contagem de coliformes na água. CBP água: Contagem de bactérias psicrotróficas na água. Origem água: 0 = originária de nascente ou poço comum e 1 = originária de poço artesiano ou semi-artesiano. Precipitação: acumulado das precipitações pluviométricas ocorridas do dia anterior até o dia da coleta.

Fonte: Próprio autor.

O percentual de propriedades com a qualidade da água em conformidade ao estabelecido é menor no inverno (Tabela 11). Isso pode ser devido a condição de chuva ter sido mais representativa durante o período de coletas do inverno. Destaca-se o baixo percentual de conformidade para coliformes. Silva et al. (2011), ao rastreamento as fontes de contaminação do leite, constataram que nenhuma das amostras de água estava de acordo com os padrões microbiológicos para coliformes totais e de *E. coli* na água. Ramires et al. (2009), ao analisarem amostras de 162 propriedades leiteiras do Paraná, observaram 62% de não conformidade para coliformes totais, 57% para coliformes fecais e 35% para contagem total de bactérias. Apenas 5% das amostras de água coletadas nas propriedades integrantes de um estudo realizado em propriedades leiteiras de Santa Catarina apresentaram ausência de coliformes totais, sendo que 24% das amostras apresentaram contaminação por coliformes fecais (JOÃO et al., 2011).

Tabela 10 – Percentual de propriedades leiteiras que estão em conformidade com os critérios de potabilidade da água pela Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b), de acordo com a estação do ano.

Microrganismo	Inverno	Verão
<i>Escherichia coli</i>	35,48%	64,61%
Coliformes a 35° C	11,29%	16,92%
Aeróbios Mesófilos	44,44%	52,30%

Fonte: Próprio autor.

3.6 CONCLUSÕES

O manejo de ordenha apresentou influência sobre a qualidade microbiológica do leite, porém a infra-estrutura da propriedade pouco afetou a qualidade. Já a qualidade microbiológica da água utilizada nas propriedades leiteiras não teve relação com a qualidade microbiológica do leite.

A contaminação bacteriana (CBP e CBT) e a concentração de CMP no leite estão relacionadas, sendo que, contagens em torno de 10^4 já influenciaram na formação de CMP no leite.

A precipitação pluviométrica e a origem da água afetaram a sua contaminação microbiológica. A água originária de poço artesiano ou

semi-artesiano apresentou melhor qualidade do que as originárias de nascente ou poço comum, porém estas fontes de água estavam em poucas das propriedades analisadas.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. D.; ROMANO, A. P. M.; NADER FILHO A.; ROSSI JUNIOR, O. D. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 417-421, out./dez. 2004.

AOAC Official Method 990.12: **Aerobic Count Plate, Dry Rehydratable Film, Petrifilm™ Aerobic Count Plate Method** (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA).

AOAC Official Method 991.14: **Coliforms and Escherichia coli Counts in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Count Plate) Methods** (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA).

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington. 2005.

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

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, n. 1, p. 165-168, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dez. 2006a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 de dez. 2006b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7, de 02 de março de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dez. 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, **Diário Oficial da União nº 239**, Brasília, 14 de dezembro de 2011b. Seção 1, página 39/46.

CAMPOS MOTTA, T.; HOFF, R. B.; BARRETO, F.; ANDRADE, R. B. S.; LORENZINI, D. M.; MENEGHINI, L. Z.; PIZZOLATO, T. M.. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 120, p. 498-505, 2014.

CLOSS, E.; SOUZA, C. F. V. 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, n. 2, p. 111-119, jul./dez. 2011.

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. **Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibiótico**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2012. 15 p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103 9865; 150).

ESTÉVEZ, J. N. R.; BOTERO, J. E. R.; RUIZ-CORTEZ, Z. T. Detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 8, n. 121, p. 8-15, 2011.

FELIPPE, M. F.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. P. Impactos ambientais macroscópicos e qualidade das águas em nascentes de parques

municipais em Belo Horizonte-MG. **Geografias (UFMG)**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 8-23, jul./dez. 2012.

FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; MARQUES, L. T.; STUMPF JR., W.; VIDAL, L. E. B. Prevalência, indução e tratamento do leite instável não ácido (LINA) no sul do Brasil. In: **Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico**. DIAZ GONZÁLEZ, F.; PINTO, A. T.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. (Org.). Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2011.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

GAUCHER I.; MOLLÉ D.; GAGNAIRE V.; GAUCHERON F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**. v. 22, p. 130-143, 2008.

GUERRA, M. G.; JÚNIOR, J. G. B. G.; NASCIMENTO RANGEL, A. H.; DE ARAUJO, V. M.; GUILHERMINO, M. M.; NOVAES, L. P. Disponibilidade e qualidade da água na produção de leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 5, n. 3, p. 230-235, set. 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. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and environmental microbiology**, California, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, nov. 2007.

IDF - International Dairy Federation 196 – Milk – **Quantitative determination of bacteriological quality** – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. ISO 21187 Brussels, Belgium, 2004. 13p.

IDF - International Dairy Federation 148-2 – Milk – **Enumeration of somatic cells** – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-

electronic counters. ISO 13366-2 Brussels, Belgium, 2006. 15 p.

ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. 1999.

JOÃO, J. H.; ROSA, C. A. 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**, Lages, v. 10, n. 1, p. 9-15, 2011.

KOSTYLA, C., BAIN, R., CRONK, R., BARTRAM, J. Seasonal variation of fecal contamination in drinking water sources in developing countries: A systematic review. **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 333-343, may 2015.

LARSEN, R. E.; MINER, J. R.; BUCKHOUSE, J. C.; MOORE, J. A. Water-quality benefits of having cattle manure deposited away from streams. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 2, p. 113-118, 1994.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. D. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 277-286, jan./mar. 2011.

MCPHEE, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic bactéria: *Pseudomonas* spp. In: FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of dairy sciences**, 2 ed. Londres: Academic Press, 2011. p. 379-383.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6628-6634, 2002.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta scientiae veterinariae**. v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, G. B.; GATTI, M. D. S.; VALADÃO, R. C.; MARTINS, J. F. P.; LUCHESE, R. H. Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 56-65, mar/jun 2009.

PULIDO, M. D. P. A.; NAVIA, S. L. A.; TORRES, S. M. E.; PRIETO, A. C. G. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. **Nova: Publicação Científica**, v. 3, n. 4, p. 69-79, 2005.

RAMIRES, C. H.; BERGER, E. L.; ALMEIDA, R. Influência da qualidade microbiológica da água sobre a qualidade do leite. **Archives of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, 2009.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. D. A. F.; DE MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 145-154, 2001.

SANTOS, P. A.; DA SILVA, M. A. P.; DE SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; DE OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia – GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, 2009.

SAS Institute. **SAS/STAT. Guide for personal computers**. Cary, 1v. 2002.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005

SILVA, C. G. **Tratamento da água e práticas de manejo na ordenha e sua interferência na qualidade do leite**. 2014. 111p. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; D'OVIDIO, L.; DE MATTOS, M. R.; DE ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, 267-276, jan./mar. 2011.

SILVA, M. A. P.; SANTOS, P. A. D.; SILVA, J. W. D.; LEÃO, K. M.; OLIVEIRA, A. N. D.; NICOLAU, E. S. Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69 n. 1, p. 112-118, 2010.

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.D.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.D.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela. 2010. 632 p.

SILVA, V. A. M.; RIVAS, P. M.; ZANELA, M. B.; PINTO, A. T.; RIBEIRO, M. E. R.; SILVA, F. F. P.; MACHADO, M. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS. **Acta scientiae veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2010.

WINCK, C. A.; THALER NETO, A. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina às normas brasileiras de qualidade do leite. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 164-172, 2009.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias mais adequadas de alimentação animal, com consequente melhoria da produtividade e aumento do teor de lactose no leite, tiveram influência na menor ocorrência de LINA que, por sua vez, apresentou pouca relação com a infra-estrutura das propriedades e com as estações do ano. A infra-estrutura das propriedades também teve pouca relação com a qualidade microbiológica do leite, diferente do manejo de ordenha que mostrou influência na contaminação bacteriana do leite. A contaminação bacteriana e a concentração de CMP estão relacionadas, sendo que, a partir de um certo ponto, o incremento destas aumentou linearmente a concentração de CMP no leite.

A qualidade da água utilizada nas propriedades leiteiras não apresentou relação com a qualidade do leite e foi afetada pela precipitação pluviométrica e pela sua origem. A água originária de poço artesiano ou semi-artesiano apresentou melhor qualidade do que as originárias de nascente ou poço comum, porém estas fontes de água estavam em poucas das propriedades analisadas.

Esses resultados corroboram com estudos já desenvolvidos sobre LINA e destacam a importância do aprofundamento nas pesquisas sobre a influência da nutrição dos animais na estabilidade do leite. A influência das contaminações bacterianas no CMP do leite também requer atenção das pesquisas, para que as diferentes origens deste peptídeo e de peptídeos semelhantes no leite possam ser detectadas e quantificadas de forma diferenciada nas análises de adulteração de leite, e para saber a partir de que ponto a contaminação bacteriana pode influenciar na formação desses peptídeos. Os estudos ainda reforçam a importância do manejo higiênico e da limpeza dos equipamentos de ordenha na qualidade microbiológica do leite. A qualidade da água, mesmo não afetando a qualidade do leite, é um fator que merece destaque pelo potencial de afetar diretamente a saúde da população da região, além de poder transmitir patógenos aos animais do rebanho.

Apesar de alguns resultados obtidos na pesquisa serem semelhantes aos de outros estudos, a região abordada apresentou suas particularidades quanto aos fatores que afetam a qualidade da água e do leite e a ocorrência de LINA, relevantes para o crescimento e aperfeiçoamento da produção leiteira na região.

ANEXO A – Questionários e planilhas de coleta

QUESTIONÁRIO TÉCNICO

ENTREVISTADOR: _____

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

I. CARACTERIZAÇÃO DOS PROPRIETÁRIOS E PROPRIEDADE RURAL:

Nome do casal : _____

Idade: Homem _____

Mulher: _____

Endereço: _____ Telefone _____

1. Área total da propriedade rural (em ha)

2. Área da propriedade destinada à produção de leite (inclusive para a produção de alimentos)

3. Quantas pessoas trabalham na propriedade com o gado de leite?

4. Quantas são as pessoas da família?

5. Alguém trabalha fora da propriedade? _____
Motivo: _____
6. Quais são as principais fonte de renda da propriedade? (em ordem)

Realiza contabilidade ou algum tipo de controle de caixa? ()sim ()não Renda mensal R\$_____

Nome da atividade(s) e percentual da renda.

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

II. CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO LEITEIRA E REBANHO

7. Quais as raças leiteiras que o Sr. possui no rebanho?

- () Holandesa () Pardo suíço () Jersey Puro ()
 Girolando () Gir
 () Mestiça, quais? _____
 () Outras, quais? _____

8. Quantas vacas estão em lactação? _____ E Secas? _____

III. MANEJO ALIMENTAR

9. Como é feito o manejo alimentar das vacas em LACTAÇÃO?

- a) Vacas recebem a maior parte da alimentação do pasto
 () sim () não
- b) Qual o tipo de pastagens
 () perenes de verão: _____
 () anuais de verão: _____
 () anuais de inverno: _____
- c) Qual a importância da pastagem perene de verão
 () Muito importante, é a base da alimentação
 () Importante, mas ainda uso metade com pastagens
 anuais de verão
 () Estou iniciando o uso de pastagem perene de verão
 () Não utilizo pastagem perene de verão
- d) Vacas recebem a maior parte da alimentação volumosa no
 cocho? (Se a questão a for sim, aqui é não e se a questão for
 não aqui será sim para alguma das opções)
 () não () sim, só silagem
 () sim, só pasto cortado
 () sim, pasto e silagem

10. Utiliza forragem conservada? Qual a época?

Nome da forragem	Época do ano

11. Utiliza concentrado ou suplemento para vacas em lactação?

- () Sim, o ano todo () Algumas vezes, _____ () Não

12. Utiliza subprodutos ou restos de culturas agrícolas na
 alimentação animal?

() Sim () Não

Se sim, qual o produto e a época em que é fornecido.

Nome do subproduto	Época do ano

(Ex: polpa cítrica, resíduo de cervejaria, resíduo de fecularia...)

13. Utiliza piqueteamento () sim () não
 14. Se tiver piquetes, quantos? _____ Tempo de ocupação/piquete _____ Área dos piquetes _____

IV. COMERCIALIZAÇÃO

15. Preço médio pago pelo litro do leite NO ÚLTIMO MÊS? _____
 16. Fazem controle de custo de leite () sim () não
 Se sim, qual o custo médio do ano: _____
 17. Qual a frequência de coleta do leite? _____
 18. Quantos litros entrega por dia? _____

V. SANIDADE e HIGIENE

19. O sr. faz uso de algum método alternativo para tratamentos sanitários? (**Fotografar rótulo**)
 a) () Não; () Sim, Qual? () Homeopatia _____
 () Fitoterapia _____

20. (Se sim) Qual a Finalidade?
 () Mastite () Ectoparasitas () Endoparasitas
 () Outros? _____

21. Há quanto tempo utiliza esses métodos? _____
 22. Confia nos métodos utilizados? [1 a 5, onde: 1= não confia e 5= confia plenamente] _____

23. Qual o destino do leite das vacas em tratamento? (Tanto alternativo quanto alopático)

() Descarte

- () Alimentação de bezerras
 () Utiliza normalmente
 () Outro _____

24. Qual origem da água utilizada na propriedade?

- () Rede de distribuição () Poço artesiano () Riacho
 () Cisterna () Fonte protegida () Fonte não protegida () Outro: _____

25. A água passa por algum tratamento?

- () Sim, qual? _____ () Não

26. Já efetuou a limpeza da caixa d'água?

- () Sim, há quanto tempo? _____ () Não
 () Não tem.

27. A água utilizada na sala de ordenha é a mesma consumida pela família?

- () Sim () Não

VI. COMENTÁRIOS SOBRE A APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DESSA FERRAMENTA DE COLHEITA DE DADOS (QUESTIONÁRIO)

Sentiu dificuldade ao aplicar o questionário? Como foi a interação com o entrevistado? Comente e dê sugestões.

VII. INSTALAÇÕES

28. A área de espera das vacas possui água?

- () sim () não () às vezes, quando? _____

De onde vem a água? (bebedouros/limpeza) _____

29. A área de espera das vacas possui sombra?

- a) () Sim, qual? _____

b) () Não.

30. Qual é o piso da área de espera?

- a) () chão batido () com cobertura () sem cobertura

b) () piso de alvenaria () com cobertura () sem cobertura

31. Qual é a forma de resfriamento do leite?

- () Tarro/Freezer com água () Direto no Freezer ()

Expansão

32. Qual a temperatura de armazenagem?

Leite: Temp 1 _____ Temp 2 _____ Temp 3 _____ Água
da imersão: _____

Tempo após a última ordenha: _____

33. Qual é o piso da Sala de ordenha?

chão batido piso de alvenaria

34. Qual é a estrutura da sala de ordenha ?

Madeira Alvenaria, sem azulejo Alvenaria, com
azulejo

35. A sala de ordenha possui algum equipamento para o estresse
calórico?

Não Sim, qual? (ventilador, nebulizador) _____

36. Qual a quantidade de leite produzido (em litros por dia)? _____

Média dos últimos meses _____ Média da semana _____

*Olhar a caderneta de entrega do laticínio.

PLANILHA DE COLETA DE ALIMENTO

PROPRIEDADE: _____

Amostragem de alimentos ofertados no cocho:

Alimento	Quantidade animal/dia ou /trato	Observação
1		
2		
3		
4		
5		
6		

37. Como é determinada a dieta dos animais?
- Um técnico formula a dieta.
 - O próprio produtor balanceia a dieta.
 - A dieta não é balanceada.
- Outro critério? Qual _____
38. Que tipo de concentrado é utilizado? (**FOTOGRAFAR** composição se comercial)
- Mistura comercial;
 - Preparado na propriedade;
 - Outro, qual? _____
- Se preparado na propriedade, quem formulou? _____
39. Utiliza sal mineral na alimentação animal? (**FOTOGRAFAR** – composição)
- Sim, nome _____ Não

MANEJO DE ORDENHA

ENTREVISTADOR: _____ DATA DA

ENTREVISTA: ____/____/____

DADOS CADASTRAIS

Nome do entrevistado: _____

Endereço: _____

1. Qual o horário das ordenhas? _____
2. Usa ordem de entrada dos animais? () sim
() não
3. Lava as mãos? () sim, em que momento? _____ () não
4. Qual o tipo de ordenha o Sr. utiliza?
() Ordenha manual;
() Ordenha mecanizada (balde ao pé);
() Ordenha mecanizada com leite canalizado no estábulo;
() Ordenha mecanizada em sala de ordenha.
5. O Sr. Lava (ou passa algum produto) nos tetos antes da ordenha? () sim () não
6. E o úbere? () sim () não
7. O Sr. faz a Limpeza do conjunto de teteiras (se houver) entre uma vaca e outra?
() Sim; () Não.
8. O Sr. despreza os 3 primeiros jatos de leite antes da ordenha?
() Sim () Não, por que? _____
9. O Sr. faz teste para mastite?
a) Sim, () caneca () CMT/Raquete ()
Caneca + CMT/Raquete
b) Não, por que? _____
10. Qual a freqüência de uso do CMT? _____
11. Realiza pré e pós-dipping?
a) Sim, pré-dipping;
b) Sim, pós-dipping;
c) Sim, ambos (pré e pós-dipping);
d) Não realizo.
12. Há problemas com mastite no rebanho?
() Sim, muito frequente () Sim, frequente () Sim,
pouco frequente () Não
13. Qual o indicativo para começar o tratamento de mastite:
() Caneca positivo () CMT/Raquete positivo () Sinais
visuais

() Outros _____
Produto: _____ Há quanto tempo utiliza? _____

14. Há informação sobre contagem de células somáticas (CCS)?
(Sabe o que significa)

() Sim, qual a situação? _____

() Não;

() Desconheço o que é CCS.

15. Há informação sobre contagem bacteriana total (CBT)? (Sabe o que significa)

() Sim, qual a situação? _____

() Não;

() Desconheço o que é CBT.

16. O Sr. alimenta as vacas *durante ou após as ordenhas*

() Sim, durante a ordenha;

() Sim, após a ordenha;

() Não.

17. Como é feita a higienização do tanque resfriador e do equipamento de ordenha?

() Utiliza detergente específico para ordenhadeira

() Utiliza detergente específico para resfriador

() Utiliza água quente

() Utiliza detergente comum

Mais de uma alternativa pode ser marcada.

QUESTIONÁRIO TÉCNICO

ENTREVISTADOR: _____

DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

ENTREVISTADO: _____

Nº PROPRIEDADE: _____

LINHA: () Papanduva () Monte Castelo () Major Vieira ()
Canoinhas/ Três Barras

18. A quanto tempo trabalha com leite? _____

19. Qual origem da água utilizada na propriedade?

() Rede de distribuição () Riacho () Poço artesiano
() Nascente protegida () Nascente não protegida () Outro: _____

20. A água passa por algum tratamento?

() Não () Sim, qual? () Filtro
() Fervura
() Cloro, a quanto tempo colocou? _____
() Água sanitária, a quanto tempo? _____

21. Já efetuou a limpeza da caixa d'água?

() Sim, há quanto tempo? _____ () Não () Não tem.

22. A água utilizada na sala de ordenha é a mesma consumida pela família?

() Sim () Não

23. Alguma vez o leite foi rejeitado a ser transportado pela indústria?

() Não
() Sim, quantas vezes? _____

Qual foi a alegação? () Leite ácido (Alizarol) () Fraude com () Água
() Soro de leite

24. Como você faz o processo de ordenha (**Pedir para o produtor contar**):

() Lava/ limpa os tetos. Com o que: _____
() Utiliza pré-imersão (pré-dipping). Com o que: _____
() Seca os tetos. Como e com o que: _____
() Elimina os primeiros jatos no caneco de fundo preto.
() Faz o teste da caneca de fundo preto.

- Coloca Teteiras (Processo de Ordenha)
- Desinfeta as tetas após a ordenha (pós-dipping). Com o que:_____

25. Como é feita a higienização do tanque resfriador e do equipamento de ordenha? **(Mais de uma alternativa pode ser marcada)**

- Utiliza detergente específico para ordenhadeira
- Utiliza detergente específico para resfriador
- Utiliza água quente
- Utiliza detergente comum

26. Manutenção de equipamentos de ordenha

- Periódica _____ Eventual/ quando há problema
- Não Faz