



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL FAGNANI

LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA):
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CRISTALOGRAFIA
DO LEITE E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE EM VACAS
LEITEIRAS

Londrina
2013

RAFAEL FAGNANI

LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA):
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CRISTALOGRAFIA
DO LEITE E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE EM VACAS
LEITEIRAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof. Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F156L Fagnani, Rafael.

Leite instável não ácido (LINA) : características físico-químicas e cristalografia do leite e equilíbrio ácido-base em vacas leiteiras / Rafael Fagnani. – Londrina, 2013.
79 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Leite – Propriedades físico-químicas – Teses. 2. Cristalografia – Teses. 3. Equilíbrio ácido base – Bovino de leite – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 637.1:54

RAFAEL FAGNANI

LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA):
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CRISTALOGRAFIA DO
LEITE E EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE EM VACAS LEITEIRAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eder Paulo Fagan
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UNOPAR

Prof. Dra. Prof^a. Mara Regina Stipp Balarin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcos Rodrigues de Mattos
Universidade Federal de Lavras – UFLA

Dra. Lucienne G. Pretto Giordano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Vanerli Beloti, pelas oportunidades, orientação e confiança. Obrigado por fazer parte da minha formação em todos esses anos, estimulando cada vez mais o meu interesse pela pesquisa, pelo ensino e pela extensão.

Agradeço também à todos os produtores que se disponibilizaram em ajudar esse trabalho, Sr. Valdevino, Sr. Luis Bezerra Leite, Sr. Israel Tomazi, Sr. Luis Dario e ao Juninho. Muito obrigado! Sem vocês nada disso seria possível.

Aos professores Dr. Alexandre Urbano, Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban e Dra. Mara Regina, por disponibilizarem os equipamentos e pela constante disposição.

Aos colegas do laboratório que de forma direta ou indireta contribuíram para esse resultado. Obrigado Ronaldo, Juliana, Edson, João e Nayara, que em momentos chaves puderam se disponibilizar. Aos estagiários Grafite (Paulo Cesar) e Panda (Erik Ossugui) pelas madrugadas de trabalho.

Aos doutores que gentilmente se disponibilizaram em contribuir com essa tese: Dra. Lucienne, Dra. Kerlei, Dr. Eder, Dra Mara e Dr. Marcos.

E por último, mas desde o começo no meu coração, à Ana Paula Pavão Battaglini. Obrigado por todo o apoio e aos conselhos que me ajudaram a ser um homem melhor.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*
(Albert Einstein)

FAGNANI, Rafael. **Leite instável não ácido (LINA):** características físico-químicas, e cristalografia do leite e equilíbrio ácido-base em vacas leiteiras. 2013. 79f. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O estudo caracterizou os componentes do leite bovino instável não ácido (LINA) e do leite bovino normal, determinando sua ocorrência durante as estações do ano, na micro-região de Ivaiporã e Sapopema. O trabalho também procurou padrões cristalográficos que diferenciem o LINA do leite normal. O trabalho associou a ocorrência de distúrbios metabólicos ácido-base nos animais com a estabilidade alcoólica do leite produzido por eles, procurando também diferenças entre a composição mineral dos dois tipos de leite. Foram coletadas 353 amostras de leite cru e analisadas para pH, porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), prova da fervura, prova do álcool 72° (v/v) e titulação Dornic. Para difratometria de raios X, 17 amostras de leite foram liofilizadas e analisadas pelo difrator de raios X Panalytical X'Pert PRO MPD. Na última etapa do trabalho, a estabilidade do leite de 96 vacas foi associada a distúrbios metabólicos ácido-base. Para isso, o sangue de cada animal foi analisado em hemogasômetro, relacionando os distúrbios encontrados com os seguintes componentes do leite: porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) teores de Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg, PO₄⁻³ e Ca total. Os resultados mostraram que houve variação dos componentes segundo as estações do ano, com exceção do pH, gordura e lactose. A distribuição de LINA foi mais elevada no outono e menor no inverno. Também houve diferença nas médias de lactose, SNG e CBT entre leite normal e LINA. O intervalo de pH do LINA e do leite normal foi semelhante, independente da estabilidade térmica na prova da fervura. A cristalografia originou três grupos distintos, um deles sem a presença de amostras LINA, e outro, com predominância de amostras LINA, sugerindo padrões cristalográficos diferentes. Quanto aos minerais do leite, a média de K⁺ foi maior no LINA. A quantidade média de PO₄⁻³ e Ca total foi inferior nos leites instáveis. Em relação aos distúrbios metabólicos, vacas que produziram LINA possuíam maior proporção de distúrbios ácido-base, principalmente alcalose metabólica compensada. No sangue, as médias de bicarbonato e excesso de bases foram maiores nas vacas que produziram LINA, reforçando maior proporção de alcalose metabólica nesses animais. Assim, os casos de desequilíbrios ácido-base podem estar associados com a instabilidade do leite ao álcool e a composição mineral de leites instáveis pode ser reflexo desses distúrbios.

Palavras-chave: Alizarol. Instabilidade. Álcool. Alcalose. Cristalografia.

FAGNANI, Rafael. **Unstable non acid milk (UNAM):** physico-chemical and crystallography of milk and acid-base balance of dairy cows. 2013. 79p. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

This study characterized the components of bovine unstable non acid milk (UNAM) and normal milk, determining its occurrence during the seasons, in the region of Ivaiporã and Sapopema, Paraná, Brazil. This study also looked for differences in crystallographic patterns of UNAM. Finally, this work associated the occurrence of acid-base disturbances with the alcohol stability of milk, looking also differences in mineral composition. In Ivaiporã and Sapopema, were collected 353 raw milk samples and analyzed for pH, percentage of fat, protein, lactose, total solids (TS), solids not fat (SNF), somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC), clot-on-boiling test, alcohol 72°(v/v) test and Dornic acidity. For X-ray diffraction, 17 milk samples were freeze-dried and analyzed by X-ray diffraction PANalytical X'Pert PRO MPD. In the final stage of the work, milk components of 96 cows were associated with acid-base disturbances. For this purpose, venous blood from each animal was analyzed in hemogasometer and associated with milk to percentage of fat, protein, lactose, total solids (TS), solids not fat (SNF), somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC) and levels of Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg, Ca and PO₄⁻³. The results showed that there was variation of the components analyzed according to the seasons, with exception of pH, fat and lactose. The occurrence of LINA was highest in the fall and lowest in the winter. There was difference in lactose, SNF and TBC averages for normal milk and UNAM. The pH range of normal milk and UNAM was similar, regardless of its stability in clot-on-boiling test. About milk minerals, K⁺ means was higher in LINA. The average amount of Ca and PO₄⁻³ was lower in unstable milk. Regarding metabolic disorders, cows that produced LINA contained higher proportion of acid-base disorders, especially metabolic alkalosis compensated. In blood, bicarbonate and base excess means were higher in cows that produced LINA, reinforcing higher proportion of metabolic alkalosis in these animals. Thus, acid-base imbalances may be associated with alcohol stability and milk mineral composition can be reflection of these disorders.

Key words: Alizarol. Instability. Alcohol. Alkalosis. Crystallography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama da estabilidade alcoólica do leite em relação ao pH e outros tratamentos	23
Figura 2 – Principais fatores que promovem a instabilidade do leite ao álcool.....	24
Figura 3 – Variação do pH no leite ácido, normal e LINA em função da estabilidade na prova da fervura em 281 amostras de leite da microrregião de Ivaiporã e Sapopema, coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011.....	44
Figura 4 – Variação da acidez Dornic no leite ácido, normal e LINA em função da estabilidade na prova da fervura em 281 amostras de leite da microrregião de Ivaiporã e Sapopema, coletadas entre 2009 e 2011	45
Figura 5 – Difratoograma do grupo 1, composto de amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.....	54
Figura 6 – Difratoograma do grupo 2, composto de amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.....	55
Figura 7 – Difratoograma do grupo 3, composto amostras de leite crucoletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.....	55
Figura 8 – Padrão cristalográfico da lactose monohidratada.....	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Variação do pH, da porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de 353 amostras de leite da micro-região de Ivaiporã e Sapopema, entre novembro de 2009 e março de 2011 segundo as estações do ano39
- Tabela 2** – Distribuição de 353 amostras de leite classificadas em leite ácido, leite normal e leite instável não ácido (LINA) segundo as estações do ano na micro-região de Ivaiporã e Sapopema, entre novembro de 2009 e março de 2011.....40
- Tabela 3** – Variação do pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de 353 amostras de leite da micro-região de Ivaiporã e Sapopema, agrupadas conforme as estações do ano, entre novembro de 2009 até março de 2011 e classificadas como LINA e normal.....42
- Tabela 4** – Quantidade média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de lactose e sólidos não gordurosos em diferentes grupos cristalográficos segundo a análise por agrupamento em 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR57
- Tabela 5** – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, gordura, proteína, sólidos totais, uréia, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) em diferentes grupos cristalográficos segundo a análise por agrupamento em 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.58
- Tabela 6** – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, gordura, proteína, lactose, sólidos não gordurosos (SNG), sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) de 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã -

PR, classificadas segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic em: Leite Estável, Leite Instável Não Ácido (LINA) e Leite Ácido59

- Tabela 7** – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) da porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloreto (Cl⁻), magnésio (Mg), cálcio total (CT) e fósforo (PO₄⁻³) em diferentes padrões de estabilidade do leite segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic: Leite Normal e Leite Instável Não Ácido (LINA), observados em 96 amostras da região norte do Paraná.....67
- Tabela 8** – Frequência absoluta e relativa dos distúrbios ácido-básicos observados em 96 vacas da região norte do Paraná segundo a estabilidade* do leite produzido.....69
- Tabela 9** – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂), concentração de bicarbonato (HCO₃⁻), excesso de bases (BE), sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) em 96 amostras de sangue de vacas leiteiras do norte do Paraná segundo diferenças de estabilidade do leite produzido: Normal e Leite Instável Não Ácido (LINA)71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	Associação Paranaense dos Criadores de Bovino da Raça Holandesa
BE	Excesso de bases no sangue
EDTA	Ácido Etileno-diamino-tetracético
HCO ₃ ⁻	Concentração de bicarbonato no plasma
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IPARDES	Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural
LINA	Leite Instável Não Ácido
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
pCO ₂	Pressão parcial de Dióxido de Carbono
pO ₂	Pressão parcial de Oxigênio
SNG	Sólidos Não Gordurosos
ST	Sólidos totais

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	INTRODUÇÃO	13
1.2	SAZONALIDADE DO LINA	15
1.3	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LINA	17
1.4	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	18
1.5	ESTABILIDADE TÉRMICA E ALCOÓLICA.....	21
1.6	LINA, NUTRIÇÃO E EQUILÍBRIO ÁCIDO BÁSICO DOS ANIMAIS	24
2	REFERÊNCIAS	28
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	34
3.1.1	Objetivos Específicos	34
4	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	35
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO EM FUNÇÃO DAS ESTAÇÕES DO ANO	35
4.1.1	Resumo	35
4.1.2	Abstract	35
4.1.3	Introdução.....	36
4.1.4	Material e Métodos	37
4.1.5	Resultados e Discussão	38
4.1.6	Conclusões	46
4.1.7	Referências	47
4.2	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X EM LEITES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS AO ÁLCOOL.....	50
4.2.1	Resumo	50
4.2.2	Abstract	50
4.2.3	Introdução.....	51
4.2.4	Material e Métodos	52
4.2.5	Resultados e Discussão	53
4.2.6	Conclusões	59
4.2.7	Referências	60

4.3	EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DE VACAS LEITEIRAS E COMPOSIÇÃO MINERAL DE LEITES INSTÁVEIS AO ÁLCOOL	62
4.3.1	Resumo	62
4.3.2	Abstract	62
4.3.3	Introdução.....	63
4.3.4	Material e Métodos	64
4.3.5	Resultados e Discussão	66
4.3.6	Conclusões	72
4.3.7	Referências	72
5	CONCLUSÕES FINAIS	76
	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A – Valores de referência para pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), concentração de bicarbonato (HCO_3^-), excesso de bases (BE), sódio (Na^+) e potássio (K^+) em sangue bovino.....	78
	APÊNDICE B – Valores de referência para gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg), cálcio total (CT) e fósforo (PO_4^{-3}) em leite bovino.....	79

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Antes de ser beneficiado em uma indústria de laticínios, o leite deve ter sua estabilidade avaliada pela prova do álcool ou alizarol. Esse primeiro teste é realizado no momento da coleta e transporte ao laticínio. O alizarol também deve ser feito todas as vezes em que houver mistura de leite de locais diferentes, seja de propriedades, resfriadores comunitários ou caminhões isotérmicos (BRASIL, 2011).

Essa prova, baseada na mistura do leite com solução alcoólica, prediz sobre a resistência térmica, revelando se o produto possui condições de suportar o aquecimento ao qual será submetido. A solução alcoólica cria uma condição de estresse à caseína, simulando o efeito do aquecimento provocado pela pasteurização. De acordo com a IN 62, todas as vezes em que houver precipitação do leite na prova do alizarol, a indústria deve rejeitá-lo, uma vez que o mesmo poderá coagular no pasteurizador trazendo transtornos à indústria (BRASIL, 2011).

Vários fatores podem promover a instabilidade da caseína, e o principal é a acidificação adquirida, que ocorre pela produção de ácido láctico por micro-organismos fermentadores da lactose, que são incorporados ao leite a partir da ordenha. Se nesse momento houver falhas de higiene, a incorporação de micro-organismos poderá ser ainda maior. No entanto, a acidificação do leite não é o único fator relacionado à instabilidade dessa proteína (OLIVEIRA; TIMM, 2006). Outras variáveis também podem ser apontadas: hidrólise enzimática da caseína por micro-organismos psicrotróficos, alta temperatura, baixo pH, excesso de íons cálcio, altas contagens de células somáticas e adição de água com etanol estão entre os principais fatores que afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína (O'CONNELL et al., 2006).

Processos inflamatórios na glândula mamária aumentam a contagem de células somáticas (CCS) que possuem enzimas cuja ação proteolítica sobre a caseína reduz sua estabilidade (SANTOS; FONSECA, 2007).

Micro-organismos psicrotróficos produzem enzimas proteolíticas termoestáveis durante seu metabolismo no leite refrigerado e essas enzimas atuam sobre a caseína, resultando na desestabilização das micelas e consequente coagulação do leite (SANTANA et al. 2004). O manejo alimentar foi relatado como

fator que altera a composição do leite podendo afetar sua estabilidade (OLIVEIRA; TIMM, 2006; ZANELLA et al. 2006).

Na prova do álcool, o etanol reduz a estabilidade coloidal da micela de caseína e provoca coagulação dessa fração protéica, conseqüentemente, quanto maior a concentração de álcool utilizada, menor será a estabilidade caseína (O'CONNELL et al. 2001). No Brasil, segundo legislações anteriores, a prova do álcool era realizada utilizando álcool à 68% (v/v) (BRASIL, 1952), atualmente a prova deve ser realizada utilizando álcool à 72% (v/v) (BRASIL, 2011). Grande parte dos laticínios já utiliza álcool à 76, 78 e até à 80%, na tentativa de obter leite com maior estabilidade micelar térmica, o que pode gerar descarte indevido de leite (MOLINA et al. 2001).

Conforme a graduação alcoólica utilizada no teste aumenta, a frequência de amostras instáveis aumenta proporcionalmente. Molina et al. (2001) analisaram 96 amostras de leite, as quais nenhuma era instável ao alizarol 70% (v/v). Ao aumentar a graduação alcoólica do teste para 80% (v/v), 59 (61,5%) amostras foram instáveis. Na maior concentração alcoólica, com 85% (v/v), 91 (94,8%) amostras coagularam no teste. Nesse mesmo experimento, nenhuma amostra estava acima de 17° Dornic.

Têm sido frequentes os relatos de leite instável ao alizarol sem acidez adquirida, inclusive em diferentes países: no Uruguai (BARROS et al., 2000), na Argentina (NEGRI, 2002), em Cuba (PONCE; HERNÁNDEZ, 2001) e no Brasil (ZANELA et al. 2006; MARQUES et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2011). Contudo, as causas da instabilidade do leite sem acidez adquirida ainda não estão totalmente esclarecidas. Esse fenômeno tem sido estudado nas diferentes regiões com duas diferentes situações, a SILA (síndrome do leite anormal) e LINA (leite instável não ácido) (PONCE; HERNANDEZ, 2001).

O LINA tem como principal característica a perda da estabilidade da caseína em contato com o álcool etílico, com acidez titulável entre 14 a 18° D (ZANELA et al. 2006). A SILA, por sua vez, está ligada à transtornos metabólicos no animal e é caracterizada pela instabilidade a prova do álcool, acidez titulável inferior a 13° D, com redução nos sólidos, na estabilidade térmica e na capacidade tamponante do leite (PONCE; HERNANDEZ, 2001).

Em países onde a qualidade microbiológica do leite é melhor, a realidade é oposta à brasileira. Nos Estados Unidos da América o teste do álcool

não é mais utilizado (FDA, 2011), uma vez que a instabilidade ao álcool sofre influências de outros fatores que não os microbiológicos. Ainda, o teste do álcool pode ser um indicador não confiável da estabilidade do leite para transformação em produtos evaporados ou condensados. Frequentemente são encontradas amostras de leite que mesmo apresentando boa qualidade precipitam na prova do álcool (MOLINA, 2001).

A ocorrência de leite sem acidez adquirida, com baixa contagem bacteriana, instável na prova do álcool pode levar à rejeição de leite com boa qualidade, trazendo prejuízo ao produtor, que é penalizado e não sabe como corrigir o problema (DONATELE; VIEIRA; FOLLY, 2003).

Para mascarar a fraude de água no leite, o álcool pode ser adicionado nessa mistura, fazendo seu ponto de congelamento voltar à normalidade. Nesse tipo de fraude, a adição de álcool pode aumentar ainda mais a concentração alcoólica do alizarol, aumentando a probabilidade do leite ser instável nessa prova. A prova para detectar a adição de álcool no leite não é realizada nos laticínios de maneira rotineira. A frequência com que essa fraude ocorre não é conhecida e deve ser melhor investigada (BRASIL, 2006).

Assim, estudos mais detalhados são necessários para avaliar corretamente a ocorrência de leite com instabilidade da caseína não decorrente de acidez adquirida, ajudando a dimensionar o problema e seu impacto econômico.

1.2 SAZONALIDADE DO LINA

Variações na temperatura, luminosidade e pluviosidade exercem efeitos diretos e indiretos sobre a composição e produção do leite. Essas observações estão associadas à fatores fisiológicos da lactação e à disponibilidade e composição alimentar, influenciando o conteúdo de gordura, as proporções da caseína sob o nitrogênio total e diversos outros componentes (BANKS, 2000; TEIXEIRA et al. 2003; BOTARO, 2009).

Diversos autores também relatam o efeito sazonal na frequência de LINA, porém os períodos de maior ocorrência variam dependendo da região do país e da produção de alimentos (TEIXEIRA et al. 2003; BOTARO, 2007; FISHER et al. 2012).

Lacroix, Verret e Paquin (1996) concluíram que os efeitos da sazonalidade sob a composição do leite são dez vezes maiores que os efeitos regionais. Assim, esse fator é importante e deve ser incluído quando se analisa a composição do leite. Paquin e Lacroix (1994) também concluíram que variações sazonais e regionais não apresentam um padrão definido. Esse fato ajuda a compreender porque toda pesquisa que analisa a composição do leite inclui a sazonalidade como fonte de variação, uma vez que pode haver equívocos quando essa informação provém de lugares e épocas distintas.

As variações na estabilidade da caseína em função da estação foi associada por Barros (2001) a dietas ou pastos ricos em cálcio, com deficiências ou desbalanços minerais (Ca, P, Mg) e a mudanças bruscas da dieta. A restrição alimentar, a quantidade e a baixa qualidade nutricional dos alimentos, especialmente os volumosos, podem diminuir a síntese de citratos, aumentando a quantidade de cálcio iônico (livre) no leite, promovendo a instabilidade (HORNE; MUIR, 1990; WILLIAMS, 2002; HERNÁNDEZ; PONCE, 2005; FISCHER et al. 2006; ZANELA et al. 2006; FERRARI et al. 2007).

Oliveira e Timm (2006) levantaram a hipótese de uma alimentação rica em fibras aumentar a ocorrência LINA. Quanto maior o teor de fibra na alimentação, maior o teor de gordura do leite, devido à variação na proporção de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen. Uma maior ingestão de fibra aumenta a produção de ácido acético e reduz a produção de ácido propiônico.

O ácido acético é um dos principais precursores da gordura do leite e seu acréscimo está diretamente relacionado com o aumento desta no leite. A maior produção e absorção de ácido acético no rúmen estão associadas com aumento da concentração de acetato no plasma e com aumento na secreção de água, proteína e gordura, como resultado da função do acetato como fonte de energia. Quando há secreção exacerbada de água, proteína e gordura pode haver desequilíbrio mineral no leite, o que provocariam alterações iônicas, com maiores chances de precipitação em uma solução alcoólica (OLIVEIRA; TIMM, 2006).

A distribuição de LINA não é homogênea durante as estações do ano. Alguns autores observam maior ocorrência no outono e menor no inverno (MARQUES et al. 2007; ZANELA et al. 2009). Essa diferença de distribuição pode estar associada à escassez de alimentos no outono, devido à redução no desenvolvimento das forrageiras nativas.

A maioria das propriedades do norte do Paraná utiliza o pasto como base alimentar dos animais produtores de leite (IPARDES, 2009), assim as variações climáticas e a pluviosidade afetam diretamente a oferta de alimento, que influencia na composição físico-química do leite. A ocorrência de LINA em função da sazonalidade é frequentemente associada à variação na oferta de alimentos aos animais (MARQUES et al. 2007; ZANELA et al. 2009).

1.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LINA

Algumas pesquisas compararam a porcentagem de gordura, lactose, proteína, uréia e outros componentes de leites estáveis ao alizarol com o LINA. Pesquisando esses componentes, Barros, (2001) Ponce e Hernández (2001), Oliveira e Timm (2006), Zanela et al. (2006) e Marques et al. (2007) encontraram maior porcentagem de gordura no LINA. Por sua vez, Ponce e Hernández (2001) e Oliveira e Timm (2006) verificaram menor porcentagem de proteína no LINA quando comparado ao leite normal.

A lactose é um dos elementos mais estáveis do leite. Segundo Ponce e Hernández (2001), a variação da lactose pode estar associada à energia da dieta e a sanidade da glândula mamária. A quantidade média de lactose costuma estar em concentrações inferiores no leite LINA na maioria dos trabalhos. Sobhani et al. (1998), Barros (2001), Ponce e Hernández (2001), Oliveira e Timm (2006), Zanela et al. (2006) e Marques et al. (2007) encontraram no mínimo 0,5 pontos percentuais menor no leite instável.

Esse açúcar atua no equilíbrio osmótico do sangue em conjunto com outros minerais (sódio, potássio e cloro). Assim, menores quantidades de lactose no leite são acompanhadas por maiores quantidades de minerais, os quais aumentam a força iônica, reduzem o pH, aumentam a solubilização de Ca^{++} e por fim, desestabilizam as micelas caseicas (HORNE; MUIR, 1990; GRAET; GAUCHERON, 1999; AGENAS et al. 2003). A mastite e o estresse também promovem esse mecanismo (STELWAGEN et al. 2000).

Donatele et al. (2003) e Zanela et al. (2006) não encontraram relação entre a precipitação do leite e a CCS. Já Negri et al. (2001), encontraram menor contagem células somáticas no leite instável e não encontraram diferenças significativas na lactose e na contagem bacteriana total.

O'Brien et al. (1999) investigaram as condições de pastagem, a taxa de lotação e as características de processamento do leite sobre a sua composição, e concluíram que essas variáveis são afetadas pela sazonalidade e interferem na estabilidade à prova do álcool.

Os dados ainda não são conclusivos e a situação do conhecimento permite a exploração de mais temas relacionados à instabilidade protéica ao álcool, como a difratometria por Rx e diferenças entre pesos moleculares das proteínas do soro e frações de caseína.

1.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A difratometria por Rx é uma das principais técnicas de caracterização micro-estrutural em materiais orgânicos e inorgânicos. A técnica se baseia no espalhamento de raios que colidem com elétrons do material que está sendo analisado. Quando os átomos que geram o espalhamento dos raios X estão arranjados sistematicamente, como em uma estrutura cristalina, verificam-se padrões e periodicidade na intensidade de difração (CULLITY, 1978).

A densidade de elétrons e seus planos de difração são características únicas de cada substância cristalina, portanto o padrão difratométrico de uma substância é análogo a impressão digital em seres humanos. Um banco com mais de 70.000 compostos é mantido pelo *International Center for Diffraction Data* nos EUA (KLUG; ALEXANDER, 1974).

Quanto maior o número de fases cristalinas em uma amostra, maior a dificuldade em identificar compostos. Vários métodos de identificação podem ser usados, porém um dos mais comuns para amostras orgânicas é o método Hanawalt. Esse método é aplicado quando se desconhece os compostos cristalinos de uma amostra e consiste em uma comparação de picos cristalográficos com o banco de dados (BISH; REYNOLDS, 1989).

A difração de raios X em produtos lácteos é mais usada em estudos reológicos de queijos, doces e soro de leite em pó e as principais estruturas que têm seu padrão cristalográfico estudado são a lactose e os triglicerídeos. No leite fluído esses componentes estão amorfos e quando são processados tecnologicamente podem originar cristais. A composição estrutural, o pH, a temperatura, a pressão

atmosférica, a atividade de água e a quantidade de oxigênio são alguns dos fatores que influenciam o processo de cristalização (VEGA; ROOS, 2007).

A cristalografia da caseína aparece em pesquisas não envolvendo o setor alimentício, no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis (VAZ et al. 2003).

A lactose é o principal carboidrato do leite e sua concentração varia conforme a espécie, com média de 4,5% para leite bovino. Em solução, pode ser encontrada sob a forma de α (61,5%) e β -lactose (38,5%), os quais são anômeros. A solubilidade da lactose é afetada pela adição de solventes, entre eles o álcool etílico. Majd e Nickerson (1976) verificaram que a solubilidade diminui conforme a concentração de álcool aumenta, sendo praticamente insolúvel em álcool puro. O pH também interfere na sua solubilidade, sendo esse açúcar mais solúvel em faixas próximas da neutralidade e menos solúvel em meios ácidos e básicos (BRITO, 2007).

O padrão cristalográfico da lactose, seus anômeros, cristais e precipitados pode ser avaliado pela difratometria de raios X, tanto no leite integral liofilizado, como em solução alcoólica, revelando possíveis semelhanças e diferenças entre os picos de difração de leites normais e LINA. (NIJDAM et al. 2007).

A gordura do leite contém mais de 400 diferentes ácidos graxos dos quais 12 estão presentes em proporções superiores a 1%. No leite fluído a gordura está distribuída em glóbulos que variam de 0,1 à 15 μm e em quantidades médias de 4% (FOX; McSWEENEY 2006).

Triglicerídeos têm a capacidade de cristalização, sendo que essa ampla diversidade de compostos resulta em diferentes padrões de cristalização. A raça e alimentação do animal também exercem influência sobre a composição dos ácidos graxos, que tem impacto direto sobre sua cristalização (BERTRAM et al, 2005; SHI; SMITH; HARTEL, 2001).

Segundo Walstra, Kloek e Vliet (2001) existem dois tipos de cristalização de gordura. A primeira é a cristalização do creme e está relacionada à processos tecnológicos na sua transformação em manteiga e sorvetes. Essa cristalização é amplamente estudada em sua cinética e microestrutura, principalmente por difratometria de raios X, e dentre os fatores envolvidos nesse fenômeno, estão a velocidade do resfriamento, a temperatura e a agitação. O segundo tipo é a cristalização da gordura em um glóbulo de gordura, ocorrendo em

temperaturas menores, próximas à zero graus centígrados. Assim, esses cristais não podem ser maiores que o diâmetro do próprio glóbulo. O arranjo desses cristais também é diferente e se houver cristais suficientes em um glóbulo, pode haver floculação, o que é responsável pela rigidez do mesmo, influenciando na sua coalescência e separação da gordura do leite fluído.

Os cristais de gordura podem ser classificados de acordo com sua estrutura em α , β' e β . A forma polimórfica β' é a mais comum na gordura do leite, com forma de esferulito. A maioria das gorduras apresenta polimorfismo monotrópico, isto é, quando ocorre uma transição (por exemplo, de β' para β), o empacotamento das cadeias moleculares do triacilglicerol se torna mais compacto, resultando em maior ponto de fusão (ROUSSEAU; HILL; MARANGONI, 1996).

Mazzanti et al. (2004) analisaram a gordura do leite por difração de raios X e observaram que o resfriamento da gordura do leite a altas velocidades e baixas temperaturas resultou na formação de cristais na forma α metaestável, que posteriormente resultaram na formação de uma mistura de cristais dos tipos β' e β . Ao contrário, a cristalização realizada a baixas velocidades de resfriamento e altas temperaturas finais de cristalização resultou na formação de cristais apenas do tipo β' , sem a presença de cristais dos tipos α ou β .

Em relação à caseína, a difratometria tem seu uso limitado. A sua estrutura micelar possui grande variabilidade e a organização espacial não se repete em padrões. Ainda, há discordância entre autores sobre os variáveis tamanhos que a micela pode assumir. Outras variações estruturais podem ser consideradas: entre as micelas de uma única vaca e entre as micelas de lotes de diferentes animais (WALSTRA; KLOEK; VAN VLIET, 2001). Todas essas características fazem a caseína ser amorfa, inviabilizando estudos sobre seu padrão cristalográfico em leite e derivados.

Porém, há estudos sobre difratometria de raios X em polímeros industriais que utilizam caseína em sua composição, como colas, adesivos e vernizes. Nesses casos há um rearranjo estrutural com outras moléculas, fazendo com que o composto possua uma relativa ordenação e repetição molecular (JIA; DU, 2006).

Sais orgânicos e inorgânicos também podem ter seu padrão cristalográfico explorado pela técnica de difração de raios X. Nem todos os sais estão em solução ou ionizados e quando se apresentam dessa forma são chamados

de coloidais. As moléculas de caseína contém fosfato de cálcio coloidal, além Mg, citrato, Na e K, os quais são amorfos, sem capacidade de trocas iônicas e de composição variada (CULLITY, 1978).

Os sais solúveis estão no soro do leite e apresentam padrão cristalográfico definido. Esses elementos podem estar sob a forma de cátions (K^+ , Na^+ , $CaCl^+$, etc), ânions (Cl^- , Citrato⁻³, SO_4^{-2} , etc) ou neutros (KCl, NaCl, $CaSO_4$, etc). Essa fração dos sais, que pode ser melhor caracterizada pela difração de raios X, também está envolvida na estabilidade protéica (LUCEY; HORNE, 2009).

Todos os sais, coloidais ou em solução, estão em constante equilíbrio dinâmico e interagem entre si. Alterações no pH, temperatura, quantidade de água livre e atividade de cálcio livre podem alterar essa harmonia iônica (LYSTER, 1979). Quando se compara leites sem acidez adquirida estáveis e instáveis ao álcool é possível que haja diferenças na ordenação cristalográfica desses compostos e a difratometria de raios X pode ser uma ferramenta útil para elucidar esse fenômeno.

1.5 ESTABILIDADE TÉRMICA E ALCOÓLICA

A capacidade do leite resistir à altas temperaturas sem apresentar coagulação ou geleificação de proteínas é chamada de estabilidade térmica, sendo definida pelo tempo necessário para que a coagulação seja visível à olho nu em tempo e temperaturas definidas. A baixa estabilidade coloidal é associada à altas temperaturas, baixo pH, maiores teores de uréia, início do período de lactação e às mastites (SINGH; CREAMER, 1992).

Aquecendo o leite sob temperaturas de 130° à 140°C, é possível determinar a sua estabilidade mensurando o tempo para que haja floculação, sedimentação ou coagulação (FOX; McSWEENEY, 1998). Ainda é possível avaliar a resistência térmica pela prova do álcool, porém as correlações entre esses dois métodos são praticamente nulas, sendo que leites instáveis ao álcool podem apresentar uma boa estabilidade térmica (SHILTON; JOHNSON; LEWIS, 1992; MOLINA et al. 2001).

A acidificação afeta a estabilidade térmica do leite, sendo o principal e mais frequente fator envolvido com a instabilidade. Segundo Rose (1961) há dois tipos de leite quanto à estabilidade térmica. O primeiro corresponde à maioria dos

leites e apresenta uma estabilidade máxima com pH próximos a 6,7 . Essa estabilidade diminui progressivamente quando o pH se encontra entre 6,7 até 6,9, voltando a aumentar em pH maiores que 6,9. O segundo tipo tem uma estabilidade crescente quando o pH aumenta.

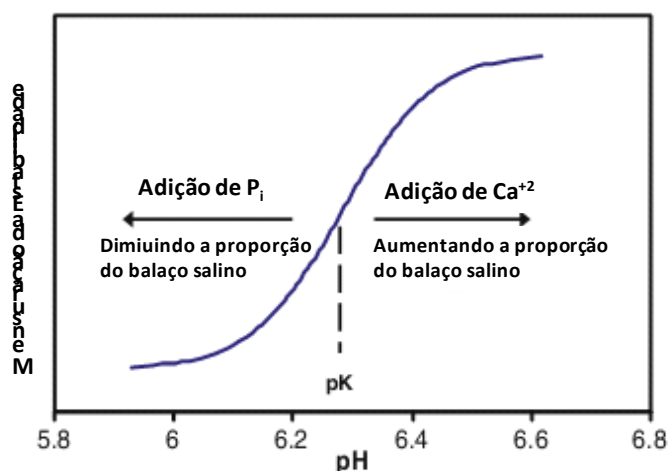
As proteínas do soro são mais sensíveis à temperatura quando comparadas à caseína. Dentre essas, as imunoglobulinas são as mais termolábeis, seguida pela β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Há discordância sobre a cinética de componentes envolvidos na estabilidade térmica. Hambling et al. 1992 afirma que a lactose estabiliza a β -lactoglobulina contra a desnaturação térmica, enquanto que a interação entre a κ -caseína e a β -lactoglobulina desestabiliza a mesma, provavelmente devido ao envolvimento do grupo tiol, as pontes dissulfeto e o íon Ca_2^+ .

Entretanto, de acordo com Imafidon et al. (1991) e Fox e McSweeney (1998), a explicação para a variação da estabilidade térmica e a coagulação está na fração κ -caseína. Esta proteína se separa das micelas quando o leite é aquecido em pH abaixo de 6,7. A β -lactoglobulina reduz a dissociação da κ -caseína, enquanto que em pH acima deste valor, a β -lactoglobulina acentua a dissociação da κ -caseína.

Já de acordo com Singh e Creamer (1992), o comportamento térmico das proteínas do soro tem melhor relação com a fração β -lactoglobulina que, por sua vez, são afetadas pelo pH do meio, concentração de lactose, teor de cloretos e íons de cálcio. Os autores também afirmam que a formação do complexo β -lactoglobulina/ κ -caseína não altera as interações esteáricas e eletrostáticas da superfície micelar e previne a dissociação de toda a micela.

Diferente da estabilidade térmica, a estabilidade ao álcool em relação ao pH apresenta uma mesma curva (Figura 1), com crescente estabilidade conforme o pH aumenta, em leites de diferentes raças e espécies. No entanto, embora a forma da curva seja a mesma para os diversos leites, a sua localização no eixo de pH varia entre raças, entre animais da mesma raça, e durante a lactação da vaca (HORNE; MUIR, 1990).

Figura 1 – Diagrama da estabilidade alcoólica do leite em relação ao pH e outros tratamentos

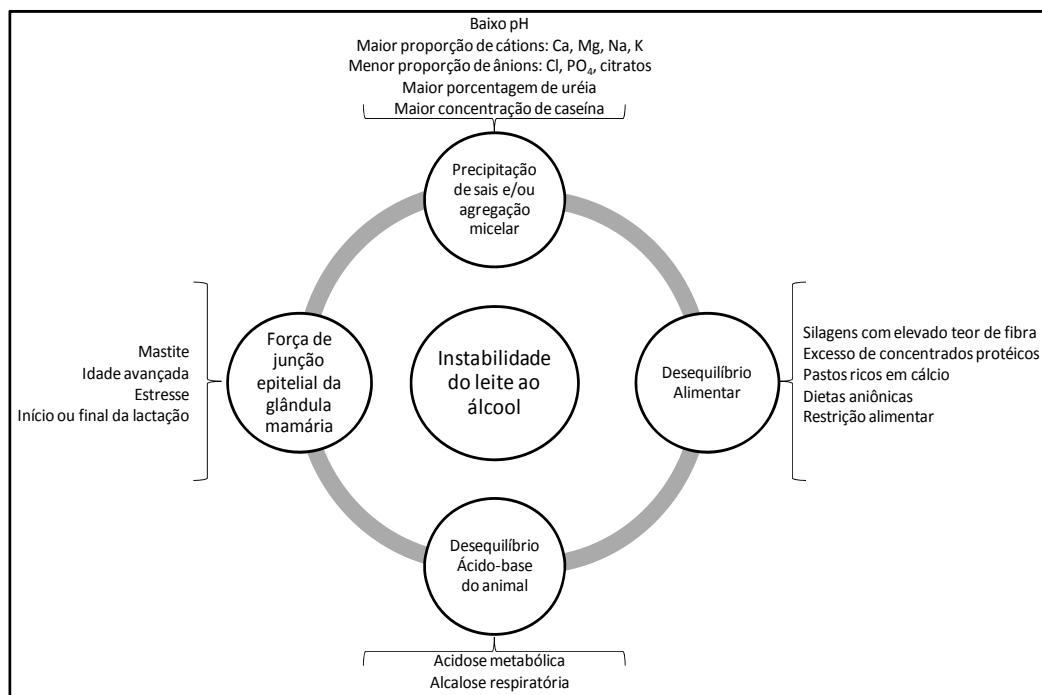


Fonte: (LUCEY; HORNE, 2009)

A dinâmica sigmoide foi proposta por Horne na década de 80 e explica que a adição de Ca^+ ou Mg^+ deslocam a curva para a direita, o que diminui a estabilidade ao álcool em um mesmo pH. Por sua vez, a adição de fosfatos inorgânicos, ânions e/ou sequestrantes, como o EDTA, promovia um deslocamento oposto, aumentando a estabilidade. O fato é explicado uma vez que as micelas caseicas estão afastadas umas das outras em função de suas cargas superficiais negativas. Quando há uma maior proporção de cátions (Na^+ , Ca^+ , etc), a micela interage com esses elementos, neutraliza suas cargas e perde a força repulsiva (HORNE; MUIR, 1990).

Esses mecanismos mostram que nem sempre a estabilidade alcoólica depende exclusivamente do pH, e que as variáveis que promovem a instabilidade ao álcool, nem sempre são as mesmas que promovem a instabilidade térmica. Assim, o teste do álcool pode não ser um indicador confiável para a estabilidade térmica (MOLINA et al. 2001). A figura 2 resume os principais fatores que já foram relacionados à instabilidade do leite ao álcool. Esses fatores podem estar ligados à alterações nas forças iônicas do leite, causando precipitação de sais ou agregação micelar. Também podem estar relacionados à sanidade da glândula mamária, que tem sua permeabilidade alterada em patologias ou estágios da lactação. Por fim, os desequilíbrios ácido-base dos animais também podem promover a instabilidade.

Figura 2 – Principais fatores que promovem a instabilidade do leite ao álcool.



Fonte: (FAGNANI, 2013)

No Brasil, a prova do álcool era realizada à 68% (v/v) (BRASIL, 1952), hoje a prova deve utilizar álcool à 72% (v/v) (BRASIL, 2011). Grande parte dos laticínios utiliza álcool a 76, 78 e até à 80% (v/v), com a intenção de selecionar um leite de melhor qualidade, mas isso pode gerar descarte indevido de leite (MOLINA et al. 2001; FISHER et al. 2012).

O crescimento da produção do leite em pó e UHT estimulam ainda mais a indústria a procurar leites com a maior estabilidade térmica possível, consequentemente aumentando ainda mais a graduação alcoólica do teste. Porém, a relação entre a estabilidade alcoólica e a sedimentação nos equipamentos industriais ainda carece de informações e pode ser uma linha de pesquisa (FISHER et al. 2012).

1.6 LINA, NUTRIÇÃO E EQUILÍBRIO ÁCIDO BÁSICO DOS ANIMAIS

Alguns estudos relacionam a diminuição do aporte nutricional (energia, proteína, minerais) com a redução da estabilidade alcoólica do leite (ZANELA et al. 2006; FRUSCALSO, 2007).

Barros (2001) associou a estabilidade alcoólica do leite com dietas e pastos ricos em cálcio, desequilíbrios minerais (Ca, P, Mg) e mudanças bruscas na

dieta. Ponce e Hernández (2001) relacionaram alterações na estabilidade com desequilíbrios nutricionais e distúrbios fisiológicos dos animais, como exemplo acidose e alcalose metabólica. Zanela et al. (2006) e Fruscalso (2007) verificaram que a restrição alimentar, com redução de 40% das exigências, provocou a diminuição da estabilidade do leite. A sazonalidade, como descrito anteriormente, é frequentemente associada às oscilações na dieta, com maior ocorrência de LINA nos meses de menor oferta de alimentos (FISCHER et al. 2012). O equilíbrio de cargas da dieta, mesmo dentro das exigências nutricionais, também pode influenciar a composição do leite e sua estabilidade ao álcool (MARQUES et al. 2006)

A partir desse raciocínio, pesquisas mais aplicadas buscaram elucidar como a proporção entre energia, proteína e minerais influenciam as características do leite (MARQUES et al. 2010, MARQUES et al. 2011).

Viero (2008) estudou o efeito de diferentes fontes e níveis de Selênio sobre a instabilidade alcoólica do leite, sem encontrar nenhuma diferença significativa. Marques et al (2010) estudaram o efeito de suplementos contendo três combinações de energia e proteína sobre as características físico-químicas do leite, concluindo que suplementos com altos níveis de energia e proteína reduziram a instabilidade do leite na prova do álcool.

Desequilíbrios do rumem podem levar a alterações na composição e no pH sanguíneo, o que influencia no metabolismo de todas as células epiteliais, inclusive as mamas, causando mudanças na composição do leite relacionadas à sua capacidade de resistir à desidratação alcoólica (MARQUES et al. 2010). Esse fato pode estar relacionado às alterações no grau de hidratação das micelas de caseína. A desidratação, além do teor de sais, pH e temperatura, modificam as interações físico-químicas entre as moléculas de caseína, aumentando a reatividade superficial das micelas, levando-as à coagulação (GOFF, 1995).

Em outra pesquisa, Marques et al (2011) avaliaram o efeito de dietas aniônicas sobre as características do leite e metabolismo dos animais. Assim, vacas alimentadas com essa dieta produziram leite com maior teor de cálcio iônico e conseqüentemente, menor estabilidade à prova do álcool. Quanto maiores os teores de cálcio iônico, menores eram os valores de pH do leite e da urina dos animais, e assim, menor era a concentração de etanol necessária para precipitar o leite na prova do álcool.

Ao receberem uma dieta rica em ânions, há uma tendência de queda no pH sanguíneo. Como mecanismo compensatório, os animais reabsorvem Ca e Mg dos ossos, o que explica o aumento da concentração de cálcio iônico no leite (MOORE et al. 2000).

Assim, qualquer outro fator que promova a acidose metabólica, pode influenciar na estabilidade alcoólica do leite. (PONCE; HERNANDES, 2005; MARQUES et al. 2011). A patologia da acidose metabólica é complexa. Esse fenômeno sempre ocorre quando há acumulação ácida além das taxas de eliminação. Os exemplos mais comuns são perda de bicarbonato associada á diarreia; produção e absorção excessiva de ácidos, como na ingestão aguda de carboidratos nos ruminantes; retenção de CO₂ no sangue, como ocorre na pneumonia, enfisema e insuficiência cardíaca, bem como outras patologias que promovam hipóxia celular, incluindo anemia; excesso de ácido láctico, como na intensa atividade muscular, ou prostração avançada por estresse térmico (BLOOD, 1991).

Além da acumulação ácida, a acidose pode ser consequência da incapacidade renal em absorver bicarbonato ou excretar ácido, como ocorre nas insuficiências renais. (COLES, 1984).

A acidose também pode ocorrer como uma resposta compensatória nos casos de alcalose respiratória. Esta última ocorre em função de maiores absorções de álcalis, perdas excessivas de ácido ou então déficits de dióxido de carbono. A hiperventilação na dor e no estresse, ou então em respirações artificiais anestésicas são exemplos de causas primárias da alcalose respiratória. (FETTMAN, 2007).

Para compensar a alcalose respiratória, o organismo manifesta-se diminuindo os teores de bicarbonato sanguíneo, excretando-os pelos rins. Outra resposta compensatória é a depressão dos centros respiratórios bulbares, o que promove a retenção de CO₂. Esses casos são definidos como alcalose respiratória compensada. (FETTMAN, 2007).

Os distúrbios ácido-base podem não só diminuir a produção leiteira, como também desequilibrar os componentes lácteos que estão envolvidos na estabilidade alcoólica. Esses dados ficam claros em experimentos induzidos, onde as variáveis são melhores controladas e influências externas são minimizadas.

Já em pesquisas à campo, a detecção de relação causa-efeito pode ser dificultosa, uma vez que os vieses não estão previstos no delineamento. Porém, não deixam de ser válidas. Assim, reunir as principais variáveis que influenciam a ocorrência do LINA e pesquisá-las em animais à campo, pode melhor relacionar os resultados disponíveis até agora com a realidade.

2 REFERÊNCIAS

- AGENAS, S.; DAHLBORN, K.; HOLTENIUS, K. Changes in metabolism and milk production during and after feed deprivation in primiparous cows selected for different milk fat content. **Livestock Production Science**, v.83, p.153-164, 2003.
- BANKS, J.M. Nutricional factors affecting cheese yield. In: LAWRENCE, R.C. **Practical guide for control of cheese yield**. Bruxelas, Bélgica: International Dairy Federation Publications, Nutritional factors affecting cheese yield, 2000. p.113.
- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W.; FONTANELI R.S. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e Metabolismo de Vacas Leiteiras**. UFRGS, Porto Alegre, 2001. p.44-57
- BARROS, L; DENIS, N; NÚÑEZ, A; GONZALEZ, O; GALAIN,C; DE TORRES, E; GONZALEZ, P. Variaciones de la leche y prueba del alcohol. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21. 2000. Punta del Este. **Abstracts of World Buiatrics Congress**. Punta del Este, 2000. p.577.
- BERTRAM, H.C., WIKING, L., NIELSEN, J.H., ANDERSEN, H.J. Direct measurement of phase transitions in milk fat during cooling of cream - A low-field NMR approach. **International Dairy Journal**, v.15, p.1056–1063, 2005.
- BISH, D.L.; REYNOLDS, R.C. Sample preparation for X-ray difracction. In: **Modern Powder Diffraction**. Mineralogy Society of America, Washington, D.C, 1989. p.214-237.
- BLOOD, D. C. **Clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- BOTARO, B.G. **Variantes genéticas de beta-lactoglobulina em vacas leiteiras e características físico-químicas e de composição do leite**. 2009. 200 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-graduação em Nutrição Animal, Universidade de São Paulo, SP, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 de julho de 1952, Seção 1, 1952.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastec-imento. Instrução Normativa nº68, de 12 de Dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para controle de leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de Dezembro de 2006. Seção 1, 2006.

BRITO, A.B.N. **Estudo da cristalização da lactose em diferentes solventes**. 2002. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, SP, 2007.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.

CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**, 2ed. London: Addison-Wesley Publishing Company, 1978. 555p.

DONATELE, D.M.; VIEIRA, L.F.P; & FOLLY, M.M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite in natura de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Rev. Higiene Alimentar**, v.17, p.95-100, 2003.

FDA. 2011. Food and Drug Administration. U.S. Dep. of Public Health Service. Grade "A", Pasteurized Milk Ordinance, Including Provisions from the Grade "A" Condensed and Dry Milk Products and Condensed and Dry Whey--Supplement I to the Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. **National Conference on Interstate Milk Shipments (NCIMS) Model Documents**, Baltimore, 11 de maio de 2011.

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

FETTMAN, M.J. Metabolismo de Fluidos e Eletrólitos. In: Thrall, D.V.M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca. 2007. 582p.

FISHER, V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; FRUSCALSO, V.; RIBEIRO, M.E.R; STUMPF, W.J.; SILVERA, I.D.B. & BARBOSA, R.S. Chemical composition of unstable non-acid milk. International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista Ciência Veterinária**, n.4, v.4, p.52, 2006.

FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.B.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry 2: Lipids**. Third ed. Springer: New York, 2006. 224p.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Professional & Academic: London, 1998.

FRUSCALSO, V. **Influência da oferta da dieta, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite bovino e a ocorrência do leite instável não ácido**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007. 132p.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p.473-483, 2005.

GOFF, H.D. **Dairy Science and Technology Education Series**. University of Guelph, Canada, 1995. Disponível em: <http://

<http://www.uoguelph.ca/foodscience/dairy-science-and-technology> >. Acesso em: 29 nov. 2012.

GRAET, Y.L.; GAUECHERON, F. pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.215-224, 1999.

HAMBLING, S.G.; MCALPINE, A.S.; SAWYER, L. Beta-lactoglobulin. In: FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry**. Elsevier Applied Science: London, 1992.

HERNÁNDEZ, R. & PONCE, P. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, v.23, p.295-310, 2005.

HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.3, p.433-439, 1990.

IMAFIDON, G.I.; NG-KWAI-HANG.; HARWALKAR, V.R.; MA, C.Y. Effect of genetic polymorphism on the thermal stability of beta-lactoglobulin and kappa-casein mixture. **Jornal of Dairy Science**, v.74, n.6, p.1971-1892, 1991.

IPARDES. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná: sumário executivo**. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. IPARDES, Curitiba, 2009. 29p.

JIA, Z.; DU, S. Grafting of casein onto polyacrylonitrile fiber for surface modification. **Fibers and polymers**, v.7, n.3, p.235-240, 2006.

KLUG, H.P e ALEXANDER, L.E. **X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials**. 2ed. Jonh Willey & Sons: London, 1974. 996p.

LACROIX, C.; VERRET, P.; PAQUIN, P. Regional and seasonal variations of nitrogen fractions in commingled milk. **International dairy Journal**, v.6, n.10, p.947, 1996.

LUCEY, J.A.; HORNE, D.S. Milk Salts: Technological Significance. In:FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. Third ed. Springer: New York, 2009.

LYSTER, R.L.J. The equilibria of calcium and phosphate ions with the micellar calcium phosphate in cow's milk. **Journal of Dairy Research**, v.46, p.343-346, 1979.

MAJD, F.; NICKERSON, T.A. Effect of alcohols on lactose solubility. **Journal of Dairy Science**, v.59, p.1025-1032, 1976.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; FISHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.91-97. 2007.

- MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C.M. Tratamento do leite instável não ácido (LINA) através de dieta balanceada para vacas de raça holandês. In: Congresso Pan-americano do Leite, 2006. Porto Alegre. **Anais do Congresso Pan-americano do Leite**. Porto Alegre, 2006. p. 221-223.
- MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; MANKE, 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.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C.M. Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.40, p.1088-1094, 2011.
- MAZZANTI, G.; GUTHRIE, S.; SIROTA, E. B.; MARANGONI, A. G.; IDZIAL, H. J. Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat. **Crystal Growth and Design**, v.4, p.1303–1309. 2004.
- MOLINA, L.H.; GONZÁLEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B. & PINTO, M. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de um centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, n.2, p.233-240, 2001.
- MOORE, S.J.; VANDEHAAR, M.J.; SHARMA, B.K. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2095-2104, 2000.
- NEGRI, L; CHAVEZ, M; TAVERNA, M; ROBERTS, L; SPERANZA, J. **Factores que afectan la estabilidad térmica y La prueba Del alcohol em leche cruda de calidad higiénica adecuada**. Informe técnico final del proyecto. INTA EEA. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, 2001.
- NEGRI, L. M. N. R. **Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica**. 2002. 180 p. Tese (Doutorado). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, 2002.
- NIJDAM, J.; IBACH, A.; EICHHORNAND, K; KIND, M. An X-ray diffraction analysis of crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, n.342, p. 2354–2364, 2007.
- O'BRIEN, B.; DILLON, P.; MURPHY, J.J.; MEHRA, R.K.; GUINEE, T.P.; CONNOLY, J.F.; KELLY, A.; JOYCE, P. Effects of stocking density and concentrate supplementation of grazing dairy cows on milk production, composition and processing characteristics. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.165-176, 1999.
- O'CONNELL, J. E.; KELLY, A. L.; FOX, P. F.; DE KRUIF, K. G. Mechanism for the ethanoldependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4424–4428. 2001.

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. de; 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, p.508-515, 2011.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n2, p.259-263, 2006.

PAQUIN, P.; LACROIX, C. **Seasonal and regional variations of different milk protein fractions: a survey of Quebec milk**. Protein Definition. Minneapolis, USA: International Dairy Federation, 1994. p.32-39.

PONCE, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. UFRGS: Porto Alegre. 2001. p.58–62.

PONCE, P.C.; HERNÁNDEZ, R. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de transtornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, v.23, n.3, p.295-310, 2005.

ROSE, D. Factors affecting the pH-sensitivity of the heat stability of milk from individual cows. **J. Dairy Sci.** v.44, p.1405-1413, 1961.

ROUSSEAU, D.; HILL, A.R.; MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 2 - Microstructure and polymorphism. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, p.973–981.1996

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; MÜLLER, E.E.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; PEREIRA, M.S.; GUSMÃO, V.V. Milk contamination in different points of the dairy process. II) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.25, n.4, p. 349-358, out./dez. 2004.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Manole: São Paulo, 2007. 314p.

SARGEANT, J.M; SHOUKRI, M.M.; MARTIN, S.W.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K.D. Investigating potential risk factors for seasonal variation: an example using graphical and spectral analysis methods based on the production of milk components in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.36, n.3, p.167-178, 1998.

SHI, Y.; SMITH, C.M.; HARTEL, R.W. Compositional effects on milk fat crystallization. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2392–2401, 2001.

SHILTON, N.; JOHNSON, A.; LEWIS, M.J. An investigation of a possible relationship between the ethanol stability of milk and the fouling of milk in an ultra high

temperature process. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v45, p.9-10, 1992.

SINGH, H.; CREAMER, L.K. Heat stability of milk. In: FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins**. London: Elsevier Applied Science Publisher, 1992. p.621–656.

SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.1, p.58, 1998.

STELWAGEN, K.; HOPSTER, H.; Van Der WERF, J.T.N. Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.48-51, 2000.

TEIXEIRA, N.M.; FREITAS, A.F.; BARRA, R.B. Environmental factors influencing monthly variation of Milk composition and somatic cell counts in herds of State of Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p.491-499, 2003.

VAZ, C.M.; FOSSEN, M.; VAN TUIL R.F.; DE GRAAF, L.A.; REIS, R.L.; CUNHA, A.M. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. **Journal of Biomed Mater Research**, n.65, p.60 –70, 2003.

VEGA, C.; ROOS, Y.O.H. The State of Aggregation of Casein Affects the Storage Stability of Amorphous Sucrose, Lactose and Their Mixtures. **Food Biophysics**, v.2, p10-19, 2007.

VIERO, V. **Efeito da suplementação com selênio no perfil bioquímico sanguíneo e características físico-químicas do leite normal e do leite instável não ácido**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

WALSTRA, P.; KLOEK, W.; VAN VLIET, T. Fat Crystal Network. In: GARTI, N.; SATO, K. **Crystallisation processes in fats and lipid systems**. Marcel Dekker inc: New York, 2001. p 289–312.

WILLIAMS, R.P.W. The relationship between the composition of milk and the properties of bulk milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, p30-44, 2002.

ZANELA, M.B.; FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF JR, W. & ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.835-840, 2006.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISHER, V. & STUMPF JR, W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n4, p.1009-1013, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência do leite instável não ácido (LINA), sua relação com a sazonalidade, com os aspectos físico-químicos do leite e metabólicos dos animais.

3.1.1 Objetivos Específicos

- a) Determinar a ocorrência do LINA no norte central do Paraná, durante as estações do ano;
- b) Caracterizar e relacionar os componentes físico-químicos e microbiológicos do LINA com o leite normal, como pH, porcentagem de gordura, de proteína, de lactose, de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT);
- c) Comparar a estabilidade térmica do LINA, do leite normal e do leite ácido, relacionando-a com o pH e a acidez Dornic;
- d) Estabelecer metodologias alternativas de análise microestrutural de leite fluído;
- e) Analisar a micro-estrutura dos componentes do LINA, procurando padrões cristalográficos que o diferenciem de leites normais e ácidos;
- f) Pesquisar a ocorrência de distúrbios metabólicos (ácido-base) em vacas leiteiras à campo e relacioná-los com o fenômeno do leite instável sem acidez adquirida.

4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE

(MICROBIOLOGY AND PHYSICAL CHEMICAL CHARACTERIZATION OF UNSTABLE NON-ACID MILK ACCORDING TO THE SEASONS)

4.1.1 Resumo

O objetivo do estudo foi caracterizar os componentes do leite bovino instável não ácido (LINA) e do leite bovino normal, determinando sua ocorrência durante as estações do ano, na micro-região de Ivaiporã e Sapopema no estado do Paraná. Foram coletadas 353 amostras de leite cru e analisadas a porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), prova do álcool 72° (v/v), titulação Dornic, prova da fervura e pH. Houve variação dos componentes analisados segundo as estações do ano, com exceção do pH, gordura e lactose. A distribuição de LINA foi mais elevada no outono e menor no inverno. As estações do ano influenciaram a porcentagem de proteína, ST, SNG, CCS e CBT. A lactose e os SNG foram menores no LINA, assim como a CBT, que foi menor quando comparada à do leite normal. O intervalo de pH do LINA e do leite normal foi semelhante, independente da sua estabilidade na prova da fervura. Apenas 10,48% das amostras de LINA foram instáveis à fervura. Nesse trabalho, a sazonalidade e os componentes do leite estão relacionados com a sua estabilidade alcoólica, e a acidez não é o único fator relacionado à termo-estabilidade.

Palavras-Chave: Estabilidade do leite. Prova do álcool. Prova da fervura.

4.1.2 Abstract

The objective was to characterize the components of unstable non-acid bovine milk (UNAM) and normal bovine milk, as well to determine the occurrence of UNAM in the north region of Paraná State, Brazil, according to the seasons. Were collected 353 raw milk samples and analyzed for percentage of fat, protein, lactose, total solids (TS) and solids nonfat (SNF), somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC), alcohol test 72° (v/v), titrated acidity Dornic, clot-on-boiling test and pH. There was variation of the components analyzed according to the seasons, with exception of pH, fat and lactose. The occurrence of LINA was highest in the fall and lowest in the winter. The seasons influenced the percentage of protein, TS, SNF, SCC and TBC. The behavior of the milk (normal or UNAM) had effect on lactose, SNF and TBC. About the clot-on-boiling test, there was highest frequency of precipitation in acid milk samples and lowest in normal milk samples. The pH range of normal milk and UNAM was similar, regardless of its stability in clot-on-boiling test. In this study, seasonality

and the behavior of milk had influence on its components, also, acidity is not the only factor related to thermal stability.

Key Words: Milk stability. Alcohol test. Clot-on-boiling test.

4.1.3 Introdução

O teste do álcool é utilizado para verificar a estabilidade do leite bovino, determinando seu aceite ou rejeição pela indústria no momento da coleta (BARROS, 2001). A precipitação da proteína pela instabilidade no teste do álcool pode ocorrer devido à redução de pH pela fermentação da lactose e produção de ácido láctico, causada por micro-organismos. No caso do leite instável não ácido (LINA), a perda da estabilidade não está associada à contaminação bacteriana e não é causada pela acidez elevada (DONATELE et al. 2003). O LINA pode gerar prejuízos tanto para a indústria quanto para o produtor, uma vez que pode haver rejeição de leite que está apto para ser processado (MARQUES et al. 2007).

A ocorrência de LINA tem característica multifatorial, porém ainda não totalmente esclarecida. Alguns autores consideram como responsáveis pela ocorrência de LINA a composição e a estrutura das micelas, o pH do meio, a força iônica ou balanço de sais de cálcio iônico, citrato e fosfatos, a concentração de gordura, de lactose e de proteína, a contagem de células somáticas, a restrição e a relação entre energia e proteína na alimentação e também a genética do animal (OLIVEIRA; TIMM, 2006; ZANELA et al. 2006; MARQUES et al. 2007).

A sazonalidade pode estar relacionada à ocorrência de LINA, porém os períodos com maior número de casos variam dependendo da região do país e da alimentação. As variações na estabilidade da caseína em função da estação do ano foi associada por Barros (2001) a dietas ou pastos ricos em cálcio, com deficiências ou desbalanços minerais (Ca, P, Mg), e a mudanças bruscas da dieta. A restrição alimentar, a quantidade e a baixa qualidade nutricional dos alimentos, especialmente os volumosos, podem interferir na síntese de citrato, aumentando os níveis de uréia e cálcio iônico no leite, porém diminuindo os teores de fósforo, combinação que promove maior instabilidade (HORNE; MUIR, 1990; WILLIAMS, 2002; HERNÁNDEZ; PONCE, 2005, FISCHER et al. 2006; ZANELA et al. 2006; FERRARI et al. 2007).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros do LINA, do leite normal e ácido, relacionando o pH com sua estabilidade térmica, além de

determinar a ocorrência de LINA na micro-região de Ivaiporã e Sapopema, no norte central do Paraná, durante as estações do ano.

4.1.4 Material e Métodos

Entre novembro de 2009 e março de 2011 foram coletadas 353 amostras de leite cru diretamente de latões e resfriadores de imersão ou expansão em seis municípios da micro-região de Ivaiporã e Sapopema, no estado do Paraná, nas quatro estações do ano assim distribuídos: Primavera (n=76), Verão (n=74), Outono (n=102) e Inverno (n=101).

A logística de amostragem obedecia a dinâmica da coleta à granel dos laticínios locais. Todas as propriedades (102) utilizadas no estudo foram caracterizadas através da aplicação de questionário e observação. As condições climáticas durante o período de coleta foram obtidas através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2011).

As amostras eram homogeneizadas com auxílio de uma concha flambada e aproximadamente 300 ml eram coletados. Uma alíquota de 200 ml era armazenada em bolsas plásticas estéreis e o restante era igualmente dividido em frascos de polietileno, todas sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

As bolsas plásticas estéreis foram encaminhadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina (LIPOA-UEL), onde foram realizadas a prova do álcool 72° (v/v), titulação de acidez pelo método Dornic (BRASIL, 2003), prova da fervura em parte das amostras (n=281) e determinação do pH, utilizando pHmêtro portátil HANNA HI8424.

As amostras foram classificadas em: LINA, quando apresentaram acidez titulável de 14 a 18°D e precipitação na prova do álcool 72° (v/v); leite normal, com acidez titulável entre 14 e 18°D e não precipitados na prova do álcool 72° (v/v); e ácidos, leites com acidez titulável acima de 18°D e precipitação na prova do álcool.

Os frascos de polietileno continham bronopol para a determinação da composição centesimal pela metodologia de infravermelho (INTERNACIONAL IDF STANDART 141C, 2000) e azidiol para a contagem total de bactérias por citometria de fluxo (INTERNACIONAL IDF STANDART 196, 2004). Os frascos foram encaminhados ao laboratório da Associação dos Produtores e Criadores de Bovinos

da Raça Holandesa (APCBRH), Curitiba-PR, onde foram mensuradas a porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as variáveis analisadas foram pH, porcentagem de gordura, de proteína, de lactose, de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). As variáveis que não tiveram distribuição normal pelo teste de Lilliefors (CCS e CBT) foram normalizadas por transformação logarítmica. Os dados foram submetidos à análise de variância ponderando as quatro estações do ano; a estabilidade ao álcool (normal e LINA) e a interação entre as estações e a estabilidade do leite. As médias dos componentes analisados, em relação às estações do ano, foram submetidas ao Teste de Tukey. A ocorrência de LINA nas quatro estações do ano foi analisada pelo teste de qui-quadrado. Para todas as análises foi utilizado $\alpha=5\%$ e o software SAEG 9.1 (SAEG 2007).

4.1.5 Resultados e Discussão

As 102 propriedades localizadas na região do estudo tinham predomínio de produtores de pequeno porte com média de 18,64 animais por propriedade. O número médio de animais em lactação foi de 7,46 e a produtividade média de leite diário foi de 6,04 litros por animal.

Animais de raça não definida e Girolanda foram os mais frequentes nas propriedades, com 50% e 16,67%, respectivamente. Em 72,56% das propriedades, o estábulo era usado como local de ordenha, 24,51% ordenhava os animais na mangueira e apenas 2,94% possuíam sala de ordenha. A ordenha manual com bezerro ao pé foi observada em 88 propriedades (86,27%). Outros manejos foram observados em menor frequência, com 4,9% para ordenha manual sem bezerro e ordenha semi-fechada com bezerro. Apenas 3,9% das propriedades ordenhavam pelo sistema semi-fechado sem bezerro.

As estações do ano na região foram bem definidas durante o período de execução do trabalho, com precipitação pluviométrica média mensal de 210 mm na primavera, 240 mm no verão, 120 mm no outono e 60 mm no inverno. A

temperatura variou de 8° C à 32°C (mínima e máxima) na primavera, 14°C à 35°C no verão, 3°C à 31°C no outono e 2° C à 31° C no inverno (INMET, 2011). Para animais mestiços e zebuínos, a zona de conforto térmico varia de 5 a 31°C e 10 a 27°C nos períodos chuvosos e secos, respectivamente (PEREIRA, 2005).

O ITU (Índice de Conforto Térmico) na primavera e verão variou de 72 à 75 e ficou abaixo de 72 nos meses de outono e inverno (INMET, 2012). Esse índice determina as condições de estresse de acordo com a sensação térmica do animal. Segundo Johnson (1987), os valores médios de ITU encontrados neste trabalho indicam que o leite foi produzindo em condições ambientais amenas. Porém, Hahn (1985) considera que valores de ITU entre 71 e 78 indicam condições críticas.

A variação da composição físico-química e microbiológica das 353 amostras de leite bovino conforme a sazonalidade está apresentada na Tabela 1. Os componentes analisados foram diferentes ($p < 0,05$) em pelo menos uma das estações, com exceção do pH, gordura e lactose.

Tabela 1 – Variação do pH, da porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de 353 amostras de leite cru da micro-região de Ivaiporã e Sapopema, entre novembro de 2009 e março de 2011, segundo as estações do ano.

	n	pH	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	SNG (%)	CCS (log10)	CBT (log10)
Primavera	76	6,63	3,69	3,23 ^a	4,42	12,26 ^a	8,48 ^a	5,48 ^a	6,05 ^{ac}
Verão	74	6,66	3,66	3,18 ^a	4,51	12,16 ^a	8,49 ^a	5,49 ^a	6,23 ^a
Outono	102	6,71	3,86	3,50 ^b	4,45	12,76 ^b	8,93 ^b	5,02 ^b	5,44 ^b
Inverno	101	6,71	3,73	3,26 ^a	4,47	12,36 ^a	8,08 ^c	5,33 ^a	5,84 ^c
Total	353	6,68	3,73	3,29	4,47	12,39	8,50	5,33	5,89

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças ao Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Vários fatores nutricionais influenciam o teor de proteína no leite, como consumo de matéria seca, disponibilidade de proteína degradável e de carboidratos não estruturais (THEURER et al. 1999). As propriedades estudadas, assim como as demais propriedades dessa região, utilizam o pasto como base alimentar dos animais produtores de leite (IPARDES, 2009), assim as variações climáticas e a pluviosidade afetam diretamente a oferta de alimento, o que influencia a composição físico-químicas do leite. As amostras analisadas apresentaram maiores valores médios de proteína (3,50%), ST (12,76%) e SNG (8,93%) no

outono. Isso pode ser explicado uma vez que, na região estudada, o outono é caracterizado como um período de rebrota das pastagens e menor oferta alimentar, com maiores chances de ocorrer restrição. Com isso pode haver diminuição da produção total de leite, causando um efeito de concentração dos seus componentes, o que explica o aumento dos níveis de proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos no outono, o que também foi observado por Oliveira e Timm (2006).

As maiores quantidades de células somáticas e contagem bacteriana total no leite foram observadas nos meses de primavera e verão. Há maior susceptibilidade de mastite nos meses com elevada temperatura e umidade, condições que favorecem a infecção por patógenos na glândula mamária (SANTOS; FONSECA 2007) e também facilita a contaminação e proliferação de bactérias no leite. No outono foram encontradas as menores médias de contagem de células somáticas ($5,02\log_{10}$) e contagem bacteriana total ($5,44\log_{10}$), mostrando que, nesta estação, o leite produzido na região apresenta, além de melhor qualidade físico-química, também melhor qualidade microbiológica.

A distribuição de LINA não foi homogênea nas diferentes estações do ano, apresentando diferença no teste de qui-quadrado ($p < 0,001$). A ocorrência de LINA foi mais elevada no outono (62,8%) e menor no inverno (26,7%), como pode ser observado na Tabela 2. Resultados semelhantes foram relatados por Marques et al. (2007) e Zanela et al. (2009) que também encontraram maior ocorrência de LINA no outono, no Rio Grande do Sul.

Tabela 2 – Distribuição de 353 amostras de leite classificadas em leite ácido, leite normal e leite instável não ácido (LINA) segundo as estações do ano na micro-região de Ivaiporã e Sapopema, entre novembro de 2009 e março de 2011.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Total
Ácido	21 (27,6%)	20 (27,0%)	14 (13,7%)	43 (42,6%)	98 (27,5%)
Normal	21 (27,6%)	25 (33,8%)	24 (23,5%)	31 (30,7%)	101 (28,9%)
LINA	34 (44,8%)	29 (39,2%)	64 (62,8%)	27 (26,7%)	154 (43,6%)
Total	76 (100%)	74 (100%)	102 (100%)	101 (100%)	353 (100%)

$\chi^2 = 31,79$; $p < 0,001$.

A restrição alimentar é relatada como uma das causas mais frequentes do LINA, porém esse fenômeno não está associado somente ao

desequilíbrio nutricional. Outros fatores influenciam sua ocorrência, como ação de micro-organismos psicotróficos sobre a caseína e estágio inicial de lactação (PONCE; HERNÁNDEZ, 2001).

Segundo a análise de variância, as estações do ano influenciaram as porcentagens de proteína, de sólidos totais, sólidos não gordurosos, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total. A estabilidade do leite (normal ou LINA) esteve relacionada às variações nas quantidades médias de lactose, de sólidos não gordurosos e à contagem bacteriana total ($p < 0,05$). Esses dois fatores, estações do ano e estabilidade do leite, não dependem um do outro para que a composição láctea varie.. Isso significa que apenas as estações do ano são suficientes para causarem variações nos componentes citados. Diferenças significativas nesses componentes também podem ser observadas quando apenas a estabilidade alcoólica é considerada.

As médias de pH, porcentagem de gordura, proteína e sólidos totais, e a contagem de células somáticas não diferiram ($p > 0,05$) no leite normal e LINA, em nenhuma das estações observadas. A média de porcentagem de lactose e de sólidos não gordurosos e a contagem bacteriana total foi diferente ($p < 0,05$) entre o leite normal e LINA, no verão (Tabela 3).

Tabela 3 – Variação do pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de 353 amostras de leite da micro-região de Ivaiporã e Sapopema, agrupadas conforme as estações do ano, entre novembro de 2009 até março de 2011 e classificadas como LINA e normal.

		pH	Gord (%)	Prot (%)	Lact (%)	ST (%)	SNG (%)	CCS (log10)	CBT (log10)
Prim	Normal (n=21)	6,72	3,76	3,26	4,37	12,24	8,44	5,47	5,86
	LINA (n=34)	6,68	3,69	3,21	4,43	12,18	8,34	5,54	6,03
Ver	Normal (n=25)	6,74	3,55	3,20	4,64 ^a	12,35	8,80 ^a	5,29	5,86 ^a
	LINA (n=29)	6,65	3,62	3,14	4,42 ^b	11,93	8,31 ^b	5,56	6,33 ^b
Out	Normal (n=24)	6,68	3,57	3,41	4,49	12,43	8,86	4,98	5,57
	LINA (n=31)	6,73	3,94	3,50	4,43	12,84	8,91	5,01	5,34
Inv	Normal (n=74)	6,75	3,75	3,30	4,49	12,44	8,20	5,38	5,68
	LINA (n=27)	6,78	3,82	3,16	4,44	12,28	7,81	5,30	5,71
Total	Normal (n=101)	6,72	3,66	3,29	4,50 ^a	12,38	8,55	5,28	5,73
	LINA (n=154)	6,79	3,80	3,31	4,43 ^b	12,43	8,48	5,28	5,74

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferenças no Teste T ($p < 0,05$).

Diversos autores encontraram no LINA maior porcentagem de gordura (BARROS, 2001; PONCE; HERNÁNDEZ, 2001; OLIVEIRA; TIMM, 2006; ZANELA et al. 2006; MARQUES et al. 2007) e menor porcentagem de proteína (PONCE; HERNÁNDEZ, 2001; OLIVEIRA; TIMM, 2006). Neste trabalho, a gordura e a proteína não apresentaram diferenças significativas em nenhuma estação do ano. Este fato pode ser explicado pela diferença na oferta de alimentos e nas condições climáticas das regiões onde os trabalhos foram desenvolvidos, indicando que alimentação e clima não são os únicos fatores envolvidos na ocorrência de LINA.

É possível observar uma diferença de 0,14% entre a porcentagem de gordura das amostras normais e das amostras LINA, porém sem significância ($p > 0,05$). A quantidade de gordura teve grande variação em leites normais e instáveis, com desvio padrão de 1,62 e 1,84 respectivamente, o que justifica a ausência de diferença estatística. A gordura é o componente mais variável, mesmo

entre animais da mesma espécie que recebem o mesmo manejo alimentar (FOX; McSWEENEY, 2006).

Considerando o total de amostras (n=353), houve diferença ($p < 0,05$) apenas para a lactose, sendo menor o valor médio para o LINA (4,43%), em comparação ao leite normal (4,49%). A concentração média de lactose apresentou diferença ($p < 0,05$) no verão, sendo inferior no LINA. Barros (2001), Ponce e Hernández (2001), Oliveira e Timm (2006), Zanela et al. (2006) e Marques et al. (2007) também encontraram porcentagem de lactose inferior no leite instável. Apesar da lactose ser um dos elementos mais estáveis do leite, Ponce e Hernández (2001) consideraram que a variação da lactose poderia estar associada à energia da dieta e a sanidade da glândula mamária.

Não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre as médias de contagem de células somáticas do leite normal e do LINA, nas estações do ano. Donatele et al. (2003) e Zanela et al. (2006) também não encontraram relação entre a precipitação do leite e a CCS. Quanto à CBT, foi encontrada diferença ($p < 0,05$) no verão, sendo maior no LINA ($6,33 \log_{10}$) em relação ao leite normal ($5,86 \log_{10}$).

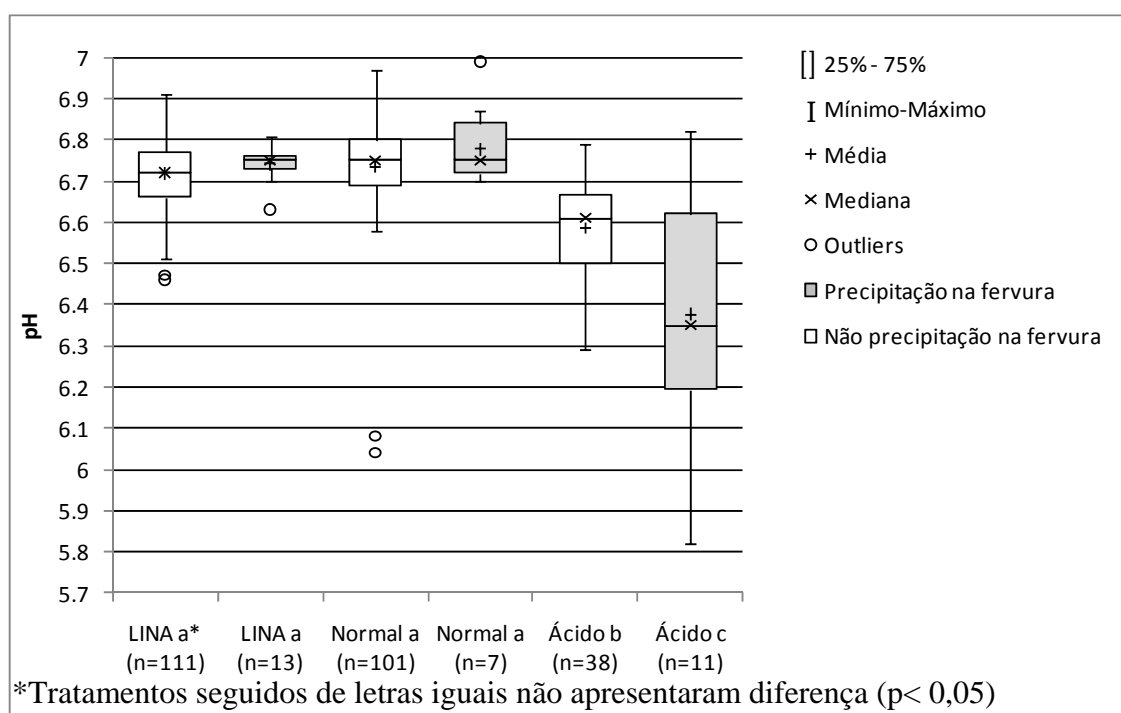
Os resultados demonstram que as condições meteorológicas sazonais influenciam a composição e a estabilidade do leite. No entanto, em cada estação climática existem outros diversos fatores que podem contribuir para as diferenças encontradas, como a oferta de alimentos, o manejo, o período de lactação, entre outros. Mesmo em estudos onde esses fatores são controlados, é difícil estabelecer relações causa-efeito quando assumimos que o LINA é multifatorial. Esses fatores não estão obrigatoriamente associados à sazonalidade.

Esse estudo foi realizado em condições não controladas, com o objetivo de melhor retratar a realidade do fenômeno LINA na região. Independente do local estudado, a ocorrência sazonal do LINA apresenta características semelhantes à outros estudos. Isso indica que existem causas comuns, que conseguem expressar sua influência independentemente de outros fatores não controlados.

Das 281 amostras de leite que foram submetidas à prova da fervura, 124 (44,13%), foram classificadas como LINA, 108 (38,43%) como leite normal e 49 (17,44%) como leite ácido. Pelo teste de qui-quadrado, a resistência térmica não foi uniforme ($p < 0,05$) segundo a estabilidade do leite (LINA, normal ou ácido), com precipitação na prova da fervura em 13 (10,48%) amostras de LINA, 7

(6,48%) amostras de leite normal e 11 (22,45%) amostras de leite ácido. A média de pH dos leites normais que não precipitaram na prova da fervura foi de 6,73, e dos leites que precipitaram foi de 6,78, mas não houve diferença significativa ($p>0,05$) no teste de Tukey (Figura 3).

Figura 3 – Variação do pH no leite ácido, normal e LINA em função da estabilidade na prova da fervura em 281 amostras de leite da microrregião de Ivaiporã e Sapopema, coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011.

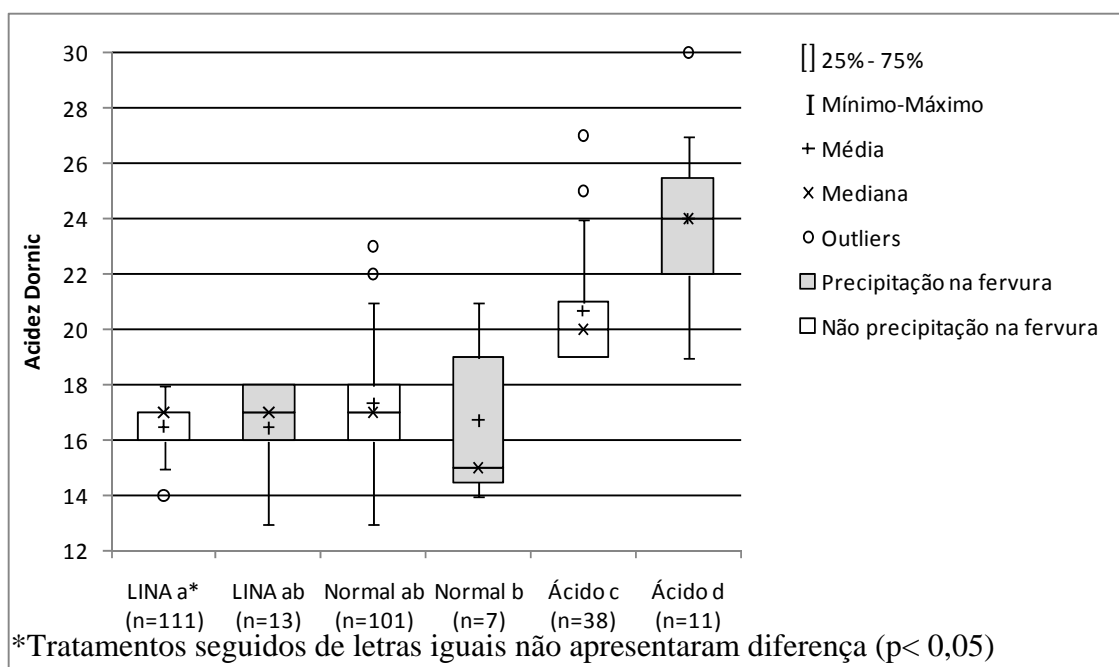


Fonte: (FAGNANI, 2013)

Para o LINA as médias de pH foram 6,72 e 6,74 para os que precipitaram e não precipitaram na fervura, respectivamente, e a diferença também não foi considerada significativa ($p>0,05$). Porém, houve diferença entre a média do pH do leite ácido precipitado na fervura (6,38) em relação as médias de LINA, normal e ácido sem precipitação (6,59).

As médias da acidez Dornic seguiram a mesma tendência da variação do pH, porém com diferença significativa ($p<0,05$) entre as médias do leite normal com precipitação na prova da fervura (16,71° D) e o LINA sem precipitação (16,50° D). As médias dos leites ácidos precipitados (24° D) e não precipitados (20,68° D) diferiram das demais e também entre si ($p<0,05$) (Figura 4).

Figura 4 – Variação da acidez Dornic no leite ácido, normal e LINA em função da precipitação na prova da fervura em 281 amostras de leite da microrregião de Ivaiporã e Sapopema, coletadas entre 2009 e 2011.



Fonte: (FAGNANI, 2013)

A acidificação afeta a estabilidade térmica do leite, sendo o principal e mais frequente fator envolvido com a instabilidade. Segundo Rose (1961) há dois tipos de leite quanto à estabilidade térmica. O primeiro corresponde à maioria dos leites e apresenta uma estabilidade máxima com pH próximos a 6,7. Essa estabilidade diminui progressivamente quando o pH se encontra entre 6,7 até 6,9, voltando a aumentar em pH maiores que 6,9. O segundo tipo tem uma estabilidade crescente conforme o pH aumenta. O primeiro perfil pode explicar a maior instabilidade observada no leite com pH médio de 6,78.

Diferente da estabilidade térmica, a estabilidade ao álcool em relação ao pH apresenta uma mesma curva, com crescente estabilidade conforme o pH aumenta, em leites de diferentes raças e espécies. No entanto, embora a forma da curva seja a mesma para os diversos leites, a sua localização no eixo de pH varia entre raças, entre animais da mesma raça, e durante a lactação da vaca (HORNE; MUIR, 1990).

A correlação entre a resistência térmica e a prova do álcool é baixa, até mesmo nula (SHILTON et al. 1992; MOLINA et al. 2001). Considerando a amostragem estudada ($n=281$), o alizarol ou a prova do álcool 72% (v/v), indicaria como inapto para o processamento térmico 173 amostras (61,57%), enquanto

apenas 31 amostras (11,03%) realmente precipitaram na prova da fervura (Figura 3 e Figura 4). Esse dado evidencia o teste do álcool como um indicador não confiável para a estabilidade térmica. Na União Européia, Estados Unidos e Canadá, testes que simulam o estresse térmico no leite estão em desuso, devido à rápida melhora na qualidade microbiológica do leite e solução dos problemas na estabilidade do leite associados à estação do ano, dieta, estágio da lactação e bem estar. No Brasil, a prova do álcool era realizada à 68% (v/v) (BRASIL, 1952), hoje a prova deve ser realizada com álcool à 72% (v/v) (BRASIL, 2011). Grande parte dos laticínios já utiliza álcool a 76, 78 e até à 80% (v/v), com a intenção de selecionar um leite de melhor qualidade, mas isso pode gerar descarte indevido de leite (MOLINA et al. 2001).

Neste estudo, mesmo nas amostras com acidez Dornic acima de 18°, classificadas como leite ácido, a precipitação na prova da fervura ocorreu em apenas 22,45% das amostras. O pH médio foi de 6,38. Assim, a resistência térmica do leite não está ligada somente a acidez bacteriana ou a acidez total, havendo outros fatores que interferem na instabilidade das proteínas. Outros possíveis fatores que podem interferir na estabilidade do leite são: a hidrólise enzimática da caseína por micro-organismos psicrotróficos proteolíticos, alta contagem de células somáticas, temperatura, excesso de íons cálcio, adição de etanol e desequilíbrio entre sais (O'CONNELL et al. 2006).

4.1.6 Conclusões

A composição do LINA foi diferente quando comparada ao leite normal, sendo que o LINA apresentou menor média de porcentagem de lactose. Os sólidos não gordurosos foram menores no LINA apenas no verão.

A estabilidade térmica entre leite normal e LINA foi semelhante, evidenciando que a estabilidade ao álcool não é um bom indicador da estabilidade térmica.

Na micro-região estudada a distribuição do LINA variou conforme as estações do ano, sendo mais alta no outono e menor no verão.

4.1.7 Referências

- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite, p.44-57. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W. & FONTANELI R.S. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e Metabolismo de Vacas Leiteiras**. UFRGS: Porto Alegre, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 07 de julho de 1952, Seção 1, 1952.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA), Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003, Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de agosto de 2003, Seção 1, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, 2011.
- DONATELE, D.M.; VIEIRA, L.F.P; & FOLLY, M.M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite in natura de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Higiene Alimentar**, v.17, p.95-100, 2003.
- FERRARI, C.G.B; SALINAS, P.A.W. & GARRIDO, S.I.S. Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p.1785-1791. 2007.
- FISHER, V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; FRUSCALSO, V.; RIBEIRO, M.E.R; STUMPF, W.J.; SILVERA, I.D.B. & BARBOSA, R.S. Chemical composition of unstable non-acid milk. International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista Ciência Veterinária**, v.4, p.:52, 2006.
- FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry 2: Lipids**. Third ed. Springer: New York, 2006. 224p.
- HAHN, G.L. Compensatory performance in livestock: influence on environmental criteria. In: YOUSEF, M.K. (Ed.) **Stress Physiology in Livestock**. CRC Press: Florida, 1985. p.52-145.
- HERNÁNDEZ, R.; PONCE, P. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical** v.23, p.295-310, 2005.
- HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.3, p.433-439, 1990.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia, 2012. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

IPARDES. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná: sumário executivo**. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. IPARDES, Curitiba, 2009. 29p.

JOHNSON, H.D. Bioclimate effects on growth, reproduction and milk production. In **Bioclimatology and the Adaption of Livestock**. Elsevier: Amsterdam, 1987. p.35-57.

MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JR., W. & FISHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.:91-97, 2007.

MOLINA, L.H.; GONZÁLEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B. & PINTO, M. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de um centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.33, n.2, p.233-240, 2001.

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

PEREIRA, C.C.J. **Fundamentos da bioclimatologia aplicados à produção animal**. Ed. FEPMVZ: Belo Horizonte. 2005, 195p.

PONCE, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físicoquímicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária, p.58-62. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e Metabolismo de Vacas Leiteiras**. UFRGS: Porto Alegre, 2001. 72p.

ROSE, D. Factors affecting the pH-sensitivity of the heat stability of milk from individual cows. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1405-1413, 1961.

SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes. UFV, Viçosa, 2007.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Manole: São Paulo, 2007. 314p.

SCHMIDT, G.H.; VAN VLECK, L.D.; HUTJENS, M.F. **Principles of Dairy Science**. Prentice Hall: New Jersey, 1988. 466p.

SHILTON, N.; JOHNSON, A.; LEWIS, M.J. An investigation of a possible relationship between the ethanol stability of milk and the fouling of milk in an ultra high temperature process. **Journal of Society of Dairy Technology**, v.45, p.9-10, 1992.

THEURER, C.B.; HUBER, J.T.; DELGADO-ELORDUY, A.; WANDERLEY, R. Invited Review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1950-1959, 1999.

WILLIAMS, R.P.W. The relationship between the composition of milk and the properties of bulk milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, p.30-44, 2002.

ZANELA, M.B.; FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF JR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.835-840, 2006.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISHER, V. & STUMPF JR, W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.1009-1013, 2009.

4.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X EM LEITES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS AO ÁLCOOL

(X-RAY DIFFRACTION OF STABLE AND UNSTABLE MILK TO ALCOHOL)

4.2.1 Resumo

No Brasil, o teste do álcool é utilizado para verificar a estabilidade térmica do leite no momento da sua coleta e recebimento pela indústria, determinando seu aceite ou rejeição. Alguns componentes envolvidos na estabilidade alcoólica do leite, como lactose, caseína, sais orgânicos e inorgânicos, podem ter o padrão cristalográfico explorado pela técnica de difração de raios X. Os padrões cristalográficos auxiliam a compreensão da estrutura molecular de uma amostra, podendo ser diferente em leites normais, ácidos e instáveis não ácidos. Foram analisadas 17 amostras de leite cru pela difratometria de Raios X, procurando padrões cristalográficos que os diferenciasses entre si. A composição centesimal por infravermelho e contagem total de bactérias por citometria de fluxo também foram analisadas. As amostras de leite foram liofilizadas e analisadas pelo difrator de raios X Panalytical X'Pert PRO MPD. Os resultados foram submetidos à análise por agrupamento, originando três grupos distintos, um deles sem a presença de amostras LINA e com menores picos, e outro com predominância de amostras LINA e maiores picos. A principal diferença entre grupos foi a intensidade dos picos que caracterizam a lactose monohidratada. A composição centesimal dos três grupos foi diferente, onde o grupo que apresentou picos mais intensos teve menores quantidades de sólidos não gordurosos. Os dados sugerem diferenças entre o padrão cristalográfico dos leites normais e LINA..

Palavras-Chave: Alizarol. Instabilidade. Leite instável não ácido (LINA).

4.2.2 Abstract

Some components involved in alcohol stability of milk, such as lactose, casein, organic and inorganic salts, may have the standard crystallographic exploited by X-ray diffraction. The crystallographic patterns help understanding the molecular structure may be different in normal milk, acidic and unstable non acidic milk. This study analyzed seventeen raw milk samples by X-ray diffraction, looking for differences in crystallographic patterns. The composition of milk by infrared and total bacterial counts by cytometry were also analyzed. Milk samples were lyophilized and analyzed by X-ray diffraction PANalytical X'Pert PRO MPD. The results were analyzed by cluster, resulting in three groups: one of them without the presence of UNAM samples and smaller peaks; and other with predominantly UNAM samples and higher peaks. The main difference between groups was the intensity of the peaks that characterize lactose monohydrate. The chemical composition of the three groups was different, where the group with the most intense peaks had lower amounts of not fat solids. The data suggest that the standard crystallographic between normal and LINA milks may be different.

Key Words: Alcohol-alizarin test. Instability. Unstable non acid milk (UNAM).

4.2.3 Introdução

No Brasil, quando há coleta e recebimento de leite cru pela indústria, o teste do álcool sempre deve ser utilizado para verificar a sua estabilidade térmica, determinando seu aceite ou rejeição (BRASIL, 2011). A precipitação da amostra no teste do álcool pode ocorrer devido à diminuição de pH causada por micro-organismos. Nesse teste, o etanol reduz a estabilidade coloidal da micela de caseína e provoca sua coagulação, conseqüentemente, quanto maior a concentração de álcool utilizada, menor será a estabilidade da caseína (O'CONNELL et al. 2001).

No caso do leite instável não ácido (LINA), essa instabilidade não está associada aos micro-organismos, não tendo relação com a acidez (ZANELA et al. 2006). A ocorrência de LINA é multifatorial e não totalmente esclarecida. A hidrólise enzimática da caseína por micro-organismos psicrotóxicos, a temperatura, o pH, o excesso de íons cálcio, altas contagens de células somáticas e adição fraudulenta de água com etanol estão entre os principais fatores que além da acidez microbiológica, também afetam a estabilidade coloidal das micelas de caseína (O'CONNELL et al. 2006).

A composição do LINA pode ser diferente do leite estável, porém as diferenças encontradas não são uma regra (BARROS, 2001), (PONCE; HERNANDEZ, 2001), (MARQUES et al. 2007). Isso reforça a característica multifatorial do LINA (MARQUES et al. 2007), (OLIVEIRA; TIMM, 2006). Esse fato, associado à incompleta elucidação do fenômeno, permite a exploração de mais temas relacionados à instabilidade protéica ao álcool, como a difratometria por Rx, que é uma técnica de caracterização micro-estrutural baseada no espalhamento de raios X ao colidirem com a amostra analisada (CULLITY, 1978).

A lactose, os triglicerídeos, a caseína, os sais orgânicos e os inorgânicos são moléculas que podem ter o padrão cristalográfico explorado pela técnica de difração de raios X (THACHEPAN; LI; MANN, 2010) (MAZZANTI et al. 2004). Pesquisas também apontam que essas mesmas moléculas podem estar envolvidas nas diferenças entre leites sem acidez microbiológica, instáveis e estáveis ao álcool (BARROS, 2001; PONCE; HERNANDEZ, 2001; MARQUES et al. 2007). O objetivo foi analisar leites estáveis, ácidos e LINA pela difratometria de Raios X, pesquisando diferenças entre os padrões cristalográficos.

4.2.4 Material e Métodos

Entre novembro de 2009 e março de 2011 dezessete amostras de leite cru foram coletadas diretamente de latões ou resfriadores no município de Ivaiporã-PR. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de uma concha previamente flambada e cerca de 300 mL foram armazenados em bolsas plásticas estéreis. A logística de amostragem obedecia a dinâmica da coleta à granel dos laticínios locais. Além das 17 propriedades utilizadas nesse estudo, outras 85 foram caracterizadas através da aplicação de questionário e observação, totalizando 102 propriedades localizadas na região de Ivaiporã-PR.

As bolsas plásticas foram encaminhadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina (LIPOA-UEL), onde foram realizadas a prova do álcool 72° (v/v) (Brasil, 2011; Brasil, 2003), titulação de acidez pelo método Dornic (BRASIL, 2003) e determinação do pH, utilizando pHmêtro portátil HANNA HI8424.

Segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic, as amostras receberam a seguinte classificação: leite estável (com acidez entre 14°D e 18°D e estável ao álcool); leite ácido (com acidez acima de 18°D e instável ao álcool); e LINA (com acidez entre 14°D e 18°D, porém estável ao álcool) (PONCE; HERNANDÉZ, 2001).

Para cada amostra, duas alíquotas com cerca de 100 mL eram transferidas para frascos de polietileno contendo bronopol para a determinação da composição centesimal pela metodologia de infravermelho (INTERNACIONAL IDF STANDART 141C, 2000) e azidiol para a contagem total de bactérias (CBT) por citometria de fluxo, respectivamente (INTERNACIONAL IDF STANDART 196, 2004).

Os frascos foram encaminhados para o Laboratório da Associação dos Produtores e Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba-PR, para determinação a porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) CBT. Para o transporte, os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

Cerca de 20ml de cada amostra foi congelada à -18°C em placa de petri e liofilizada em aparelho giratório tipo speed vac (Speed Vac SC110), Savant Instruments, Inc., USA por 24 horas. As amostras secas foram encaminhadas para o

Laboratório de Difração de Raios X da Universidade Estadual de Londrina e analisadas com o difratômetro Panalytical X'Pert PRO MPD, com tubo de cobre, monocromador de grafite e detector por ionização, em um intervalo de 5° à 60° , 2θ , com passo de $0,05^\circ$ e um segundo de medida em cada passo. Os difratogramas foram submetidos à análise por agrupamento no *software* X'Pert HighScore Plus (PANALYTICAL, 2004), onde o perfil cristalográfico das amostras foi reunido conforme semelhança na intensidade e localização de picos.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e as variáveis analisadas foram pH, porcentagem de gordura, de proteína, de lactose, de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG), uréia, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). As variáveis que não tiveram distribuição normal pelo teste de Lilliefors foram normalizadas por transformação logarítmica. Os dados foram submetidos à análise de variância ponderando o efeito dos diferentes grupos segundo a análise por agrupamentos, sendo que fatores com $p < 0,05$ foram posteriormente analisados pelo teste de Tukey à 0,5%. Para todas as análises foi utilizado o programa Statistica 7.0.

4.2.5 Resultados e Discussão

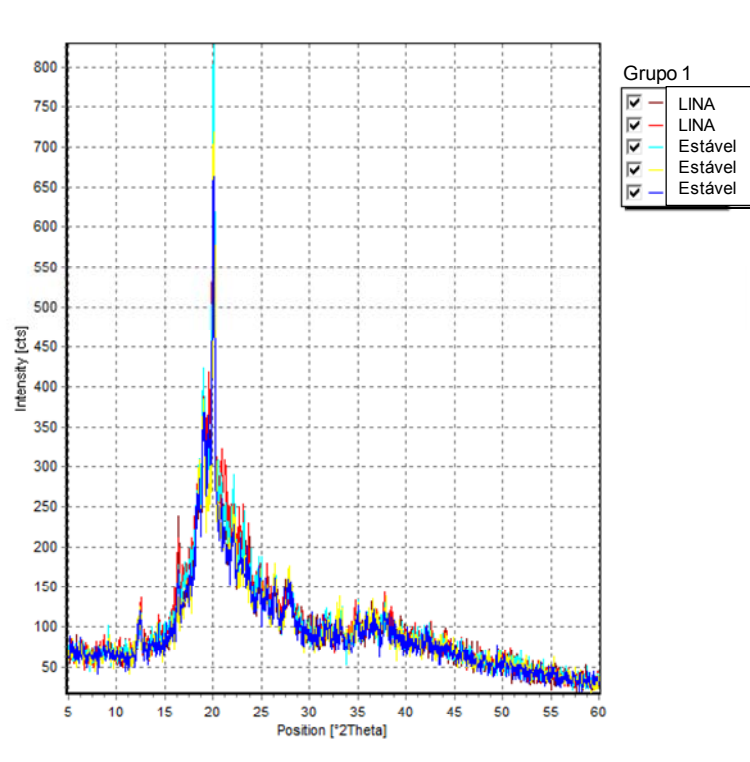
As propriedades localizadas na região do estudo tinham predomínio de produtores de pequeno porte com média de 18,64 animais por propriedade. O número médio de animais em lactação foi de 7,46 e a produtividade média de leite diária foi de 6,04 litros por animal.

Animais de raça não definida e Girolanda foram os mais frequentes nas propriedades, com 50% e 16,67%, respectivamente. Em 72,56% das propriedades, o estábulo era usado como local de ordenha, 24,51% ordenhava os animais na mangueira e apenas 2,94% possuíam sala de ordenha. A ordenha manual com bezerro ao pé foi observada em 88 propriedades (86,27%). Outros manejos foram observados em menor frequência, com 4,9% para ordenha manual sem bezerro e ordenha semi-fechada com bezerro. Apenas 3,9% das propriedades ordenhavam pelo sistema semi-fechado sem bezerro.

Das 17 amostras analisadas pelo teste do álcool e acidez Dornic três foram classificadas como ácidas, nove como estáveis e cinco como LINA. Ao serem submetidas à análise por Rx, cada amostra resultou um difratograma único, porém

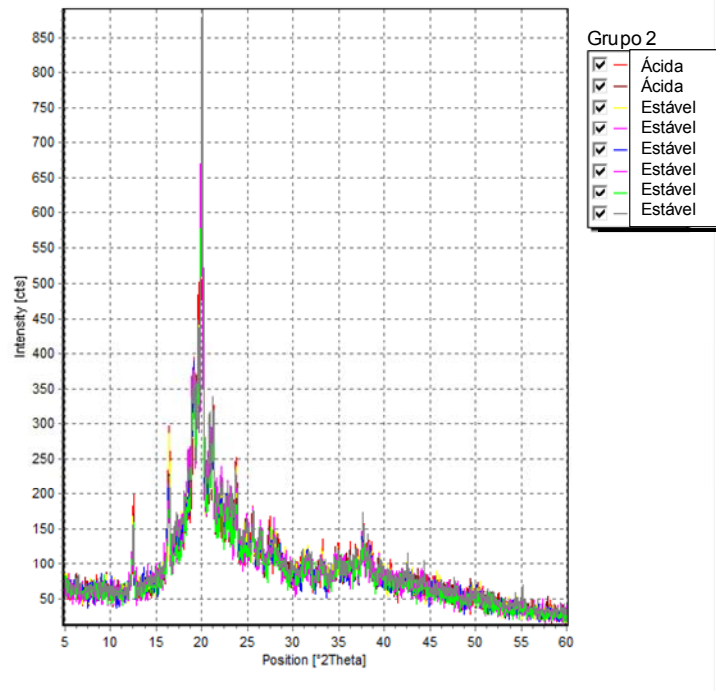
semelhantes entre si, com picos identificando principalmente cristais de lactose monohidratada ($C_{12}H_{22}O_{11}+H_2O$). A análise por agrupamento cristalográfico originou três grupos principais, das quais cinco amostras (duas LINA e três estáveis) ficaram no grupo 1 (Figura 5); oito amostras (duas ácidas e seis estáveis) no grupo 2 (Figura 6); e quatro amostras (três LINA e uma ácida) no grupo 3 (Figura 7).

Figura 5 – Difratoograma do grupo 1, de amostras de leite cru, coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.



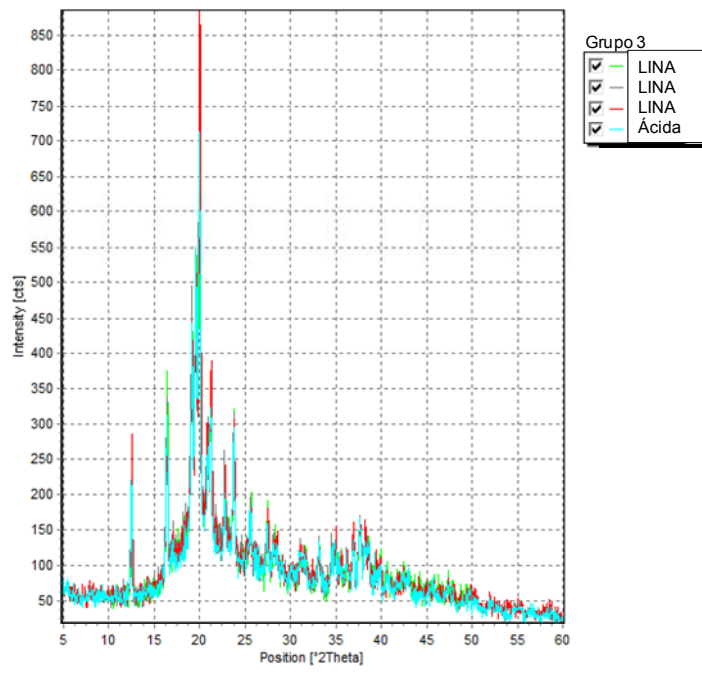
Fonte: (FAGNANI, 2013)

Figura 6 – Difratoograma do grupo 2, de amostras de leite cru, coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.



Fonte: (FAGNANI, 2013)

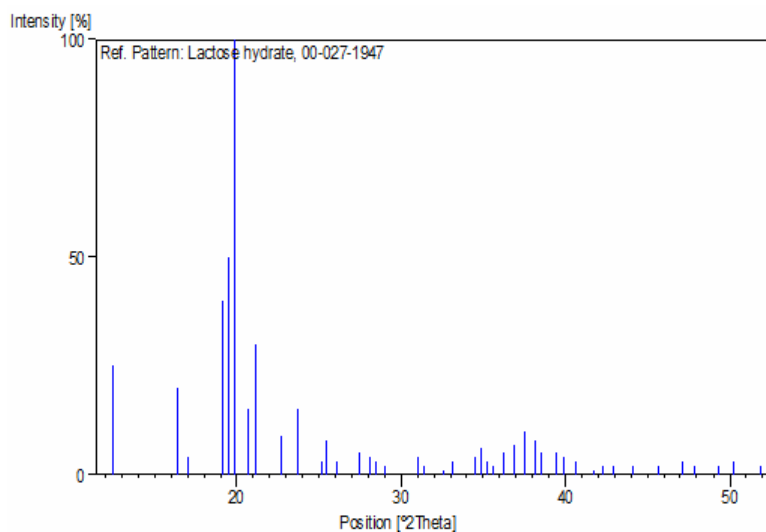
Figura 7 – Difratoograma do grupo 3, de amostras de leite cru, coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.



Fonte: (FAGNANI, 2013)

Os difratogramas dos três grupos diferem principalmente na intensidade do primeiro pico, entre 10° e 15°, e na intensidade do segundo pico, entre 15° e 20°. Esses picos são mais intensos no grupo 3 e menos intensos no grupo 1, sendo que o grupo 2 apresentou intensidade intermediária. Segundo Nijdam et al. (2007), esses picos caracterizam a lactose monohidratada e o seu padrão cristalográfico está representado na figura 8.

Figura 8 – Padrão cristalográfico da lactose monohidratada.



Fonte: (PANALYTICAL, 2004)

A distribuição das amostras nos três grupos não foi homogênea ($p < 0,05$) segundo o teste de qui-quadrado, sendo que o grupo 3 apresentou maior tendência de agrupamento para amostras classificadas como LINA. Além das três amostras classificadas como LINA, esse grupo também possui uma amostra ácida, que por sua vez, pode ter tido comportamento LINA antes de se tornar ácida.

A análise por agrupamento indicou que pode haver uma heterogeneidade entre as amostras LINA e amostras estáveis ou ácidas, uma vez que não houve amostras LINA no grupo 2. O fato sugere que a estrutura cristalográfica do LINA pode ser diferente dos leites estáveis e ácidos.

Nijdam et al. (2007) relataram que a intensidade dos picos de lactose monohidratada no eixo y pode ser influenciada pela quantidade de sólidos presente na amostra. Assim, menores taxas de cristalização, caracterizadas por picos menos intensos, ocorrem quando há maior quantidade de sólidos na amostra, como sais e proteínas.

A análise de variância dos três grupos originados pela análise de agrupamento apontou diferença ($p < 0,05$) entre as médias de lactose e de sólidos não gordurosos. A tabela 4 mostra que o grupo 3 apresentou menores porcentagens de sólidos, que incluem todos os componentes lácteos, exceto a gordura. Esse fato segue a mesma tendência que Nijdam et al. (2007) observaram, uma vez que nessa pesquisa o grupo com menor quantidade de sólidos (grupo 3) apresentou picos cristalográficos mais intensos.

Tabela 4 – Quantidade média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de lactose e sólidos não gordurosos em diferentes grupos cristalográficos segundo a análise por agrupamento em 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.

	Lactose (%)		SNG (%)	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
Grupo 1	4,34 ^{ab}	0,08	8,41 ^{ab}	0,16
Grupo 2	4,56 ^a	0,09	8,84 ^a	0,24
Grupo 3	4,14 ^b	0,37	7,92 ^b	0,94

Médias seguidas por letras iguais não diferiram no teste de Tukey ($p > 0,05$)

Houve diferença ($p < 0,05$) nas médias de lactose entre os grupos 2 e 3, com menores porcentagens para o grupo 3, porém sem diferença quando comparados ao grupo 1. A quantidade média de lactose apresenta-se em concentrações inferiores no LINA na maioria dos estudos. Barros (2001), Ponce; Hernández (2001), Oliveira; Timm (2006), Zanela et al. (2006) e Marques et al. (2007) encontraram porcentagem de lactose inferior no leite instável. Nesse trabalho a mesma tendência pode ser observada, uma vez que o grupo 3, composto em sua maioria por LINA, apresentou as menores ($p < 0,05$) porcentagens para a lactose.

Dietas com baixos níveis de energia foram associadas à produção de leite com menores teores de lactose. A lactose atua no equilíbrio osmótico na passagem dos componentes do sangue para o leite, em conjunto com outros minerais (sódio, potássio e cloro). Assim, com a redução desse açúcar, pode haver maior transporte de minerais para o leite, os quais aumentam a força iônica, reduzem o pH, aumentam a solubilização de Ca^{++} e por fim, desestabilizam as micelas caseicas (HORNE; MUIR, 1990; GRAET; GAUCHERON, 1999; AGENAS et al. 2003). A mastite e o estresse também promovem esse mecanismo, mas por diminuir a força de junção das células epiteliais da glândula mamária (STELWAGEN et al. 2000).

O pH, a gordura, a proteína, sólidos totais, uréia, CBT e CCS não apresentaram diferenças entre as médias dos diferentes grupos, o que pode ser observado na tabela 5.

Esses componentes são comparados com frequência e nem sempre é possível estabelecer relação de aumento ou diminuição devido ao fenômeno LINA. Barros (2001), Ponce & Hernández (2001), Oliveira; Timm (2006), Zanela et al. (2006) e Marques et al. (2007) encontraram maior porcentagem de gordura no LINA. Por sua vez, Ponce; Hernández (2001) e Oliveira; Timm (2006) verificaram menor porcentagem de proteína no LINA quando comparado ao leite estável.. Donatele et al. (2003) e Zanela et al. (2006) não encontraram relação entre a precipitação do leite e a CCS. Entretanto Neri et al. (2001) encontraram menor CCS no leite instável e não encontraram diferenças significativas na CBT.

Tabela 5 – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, gordura, proteína, sólidos totais, uréia, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) em diferentes grupos cristalográficos segundo a análise por agrupamento em 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR.

	Grupo 1 \bar{x} / σ	Grupo 2 \bar{x} / σ	Grupo 3 \bar{x} / σ
pH	6,68 / 0,07	6,58 / 0,28	6,43 / 0,41
Gord (%)	5,55 / 1,11	3,56 / 1,05	3,22 / 0,67
Prot (%)	3,17 / 0,07	3,30 / 0,15	3,09 / 0,24
ST (%)	13,96 / 0,97	12,40 / 1,21	11,14 / 1,46
Uréia (%)	10,62 / 2,40	12,34 / 2,16	7,66 / 3,18
CBT ($\log^{\text{bac/ml}}$)	6,53 / 0,61	6,18 / 0,90	6,53 / 0,75
CCS ($\log^{\text{cel/ml}}$)	5,81 / 0,95	5,09 / 0,65	4,94 / 0,41

Além da análise de variância entre os três grupos obtidos no perfil cristalográfico, também foi feita a análise de variância dos componentes do leite segundo a sua estabilidade ao álcool 72°, porém sem diferença ($p > 0,05$) para nenhuma variável analisada entre os grupos LINA, estável e ácido (Tabela 6).

Tabela 6 – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, gordura, proteína, lactose, sólidos não gordurosos (SNG), sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) de 17 amostras de leite cru coletadas entre novembro de 2009 e março de 2011 no município de Ivaiporã - PR, classificadas segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic em: Leite Estável, Leite Instável Não Ácido (LINA) e Leite Ácido

	Estável \bar{x} / σ	LINA \bar{x} / σ	Ácido \bar{x} / σ
pH	6,71 / 0,07	6,64 / 0,19	6,10/0,27
Gord (%)	4,07 / 1,71	4,05 / 1,27	3,60 / 0,39
Prot (%)	3,21 / 0,12	3,11 / 0,18	3,43 / 0,10
Lac (%)	4,49 / 0,14	4,28 / 0,36	4,44 / 0,15
SNG (%)	8,63 / 0,31	8,19 / 0,79	8,80 / 0,17
ST (%)	12,7 / 1,66	12,2 / 1,86	12,4 / 0,67
Uréia (%)	11,90 / 2,27	9,11 / 2,50	11,29 / 3,72
CBT ($\log^{\text{bac/ml}}$)	6,02 / 0,88	6,42 / 0,68	7,00 / 0,01
CCS ($\log^{\text{cel/ml}}$)	5,39 / 0,74	5,18 / 0,92	4,94 / 0,14

Esse resultado mostra que os valores das variáveis analisadas estavam uniformemente distribuídos entre os leites classificados como estável, ácido e LINA, fazendo com que não houvesse diferença entre suas médias na análise de variância. Por sua vez, o agrupamento feito pela cristalografia, reuniu as amostras de modo que houvesse diferença entre as médias de lactose e SNG. Isso reforça o fato de que a estrutura cristalográfica do LINA pode ser diferente dos leites estáveis e ácidos, uma vez que o grupo três é composto predominantemente ($p < 0,05$) por amostras LINA.

4.2.6 Conclusões

A cristalografia fez com que as amostras classificadas como LINA, estáveis e ácidas fossem reunidas em três grupos principais, com difratogramas diferentes na intensidade dos picos localizados entre 10° e 15° e entre 15° e 20°. Menores médias de lactose e de sólidos não gordurosos foram observadas no grupo de perfil cristalográfico composto em sua maior parte por amostras de LINA.

Houve grupo com predominância de amostras LINA e também grupo sem nenhuma amostra LINA. Isso indica que a estrutura cristalográfica do LINA difere quando comparada com leites estáveis e ácidos.

A difratometria de raios X se mostrou uma ferramenta útil na pesquisa de padrões cristalográficos segundo a estabilidade do leite ao álcool, entretanto estudos com maior amostragem podem melhorar a interpretação dos dados.

4.2.7 Referências

AGENAS, S.; DAHLBORN, K.; HOLTENIUS, K. Changes in metabolism and milk production during and after feed deprivation in primiparous cows selected for different milk fat content. **Livestock Production Science**, v.83, p.153-164, 2003.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite, p.44-57. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DURR, J.W. & FONTANELI R.S. (Eds), **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e Metabolismo de Vacas Leiteiras**. UFRGS: Porto Alegre, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, 2011.

DONATELE, D. M.; VIEIRA, L. F. P.; FOLLY, M. M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite in natura de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Higiene Alimentar**, n.17, p.95–100. 2003.

GRAET, Y.L.; GAUECHERON, F. pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.215-224, 1999.

HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, v.3, p.3613-3626, 1990.

INTERNATIONAL IDF Standard 141C:2000: Whole milk - determination of milkfat, protein and lactose content. **Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussels, 2000.

INTERNATIONAL IDF Standard 196C:2004: Milk - Quantitative determination of bacteriological quality. **Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results**. Brussels, 2004.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; FISHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n.1, p. 91–97. 2007.

MAZZANTI, G.; GUTHRIE, S.; SIROTA, E. B.; MARANGONI, A. G.; IDZIAL, H. J. Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat. **Crystal Growth and Design**, v. 4, p. 1303–1309. 2004.

NIJDAM, J.; IBACH, A.; EICHHORNAND, K; KIND, M. An X-ray diffraction analysis of crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, n. 342, p. 2354–2364, 2007.

O'CONNELL, J. E.; KELLY, A. L.; FOX, P. F.; DE KRUIF, K. G. Mechanism for the ethanoldependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4424–4428. 2001.

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

PANALYTICAL. X'Pert HighScore Plus. Versão 2.0.1. **Pananalytical B.V.**, The Netherlands, 2004.

PONCE, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Eds.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. UFRGS, Porto Alegre. 2001, p.58–62.

STELWAGEN, K.; HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.N. ET AL. SHORT COMMUNICATION: EFFECTS OF ISOLATION STRESS ON MAMMARY TIGHT JUNCTIONS IN LACTATING DAIRY COWS. **JOURNAL OF DAIRY SCIENCE**, V.83, P.48-51, 2000

THACHEPAN, S.; LI, M.; MANN, S. Mesoscale crystallization of calcium phosphate nanostructures in protein (casein) micelles. **Nanoscale**, v. 2, p. 2400–2405. 2010.

ZANELA, M. B.; FISHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R. S.; MARQUES, L. T.; STUMPF JR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 835–840. 2006.

4.3 EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE DE VACAS LEITEIRAS E SUA RELAÇÃO COM A ESTABILIDADE ALCOÓLICA E COMPOSIÇÃO MINERAL DO LEITE PRODUZIDO

(ACID BASE EQUILIBRIUM OF DAIRY COWS AND ITS RELATION BETWEEN THE ALCOHOL STABILITY AND THE MINERAL COMPOSITION OF MILK)

4.3.1 Resumo

Esse trabalho associou a ocorrência de distúrbios ácido-base com a estabilidade alcoólica do leite de animais à campo além de avaliar diferenças entre a composição mineral de leites estáveis e instáveis ao álcool. O leite de 96 vacas leiteiras foram analisados para porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) prova do álcool 72° (v/v) e titulação Dornic, teores de Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg , PO_4^{-3} e Ca total. O sangue desses animais foi analisado em hemogasômetro para pH, pCO_2 , HCO_3^- , excesso de bases (BE), Na^+ e K^+ . No leite, não foi encontrada diferença na composição centesimal entre amostras estáveis e instáveis ao álcool. Porém, a média de K^+ foi maior em amostras de LINA. A quantidade média de PO_4^{-3} e Ca foi inferior nos leites instáveis. Em relação aos distúrbios metabólicos, vacas que produziram LINA apresentaram maior proporção de distúrbios ácido-base, principalmente alcalose metabólica compensada. No sangue, as médias de bicarbonato e excesso de bases foram maiores nas vacas que produziram LINA, reforçando maior proporção de alcalose metabólica nesses animais. Assim, os casos de desequilíbrios ácido-base influenciam a instabilidade do leite ao álcool e a composição mineral de leites instáveis pode ser reflexo desses distúrbios.

Palavras-Chave: Hemogasometria. Alcalose. Eletrólitos. Leite instável não ácido (LINA).

4.3.2 Abstract

This work associates acid-base disturbances with the alcohol stability of milk from lactating cows, furthermore evaluates differences among mineral composition of stable and unstable milks to alcohol. The milk of 96 dairy cows were analyzed for percentage of fat, protein, lactose, total solids (TS), solids not fat (SNF), somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC), alcohol stability, acidity Dornic, Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg , PO_4^{-3} and Ca . B The blood of these animals was analyzed in hemogasometer for pH, pCO_2 , HCO_3^- , base excess (BE), Na^+ and K^+ . There was no difference in composition between stable and unstable milk to alcohol. However, values was higher for K^+ among unstable milks. The average of Ca and PO_4^{-3} was lower in unstable milk. Regarding metabolic disorders, cows that produced unstable milks to alcohol, had higher proportion of acid-base disorders, mainly metabolic alkalosis compensated. Blood means of bicarbonate and base excess were higher in cows that produced unstable milk, pointing that metabolic alkalosis are in higher proportion in these animals. Thus, acid-base imbalances may be associated with the alcohol

instability of milk and variations of its mineral composition may be a repercussion of these disorders.

Key Words: Hemogasometry. Alkalosis. Electrolytes. Unstable non-acid milk (UNAM).

4.3.3 Introdução

O equilíbrio ácido-base é vital para a manutenção do pH sanguíneo do animal e seu estado hídrico (FETMANN, 2007). Alterações nesse sistema podem ser acompanhadas por distúrbios eletrolíticos, sendo que ambos influenciam a composição e o balanço iônico do leite produzido (MARQUES, 2011).

Oscilações em alguns componentes lácteos, como o balanço salino, lactose, uréia e cálcio livre podem estar relacionadas com a estabilidade alcoólica. Isso faz com que outras variáveis, além da acidez microbiológica, influenciem a prova do álcool/alizarol, podendo haver descarte desnecessário de leite cru, no momento da sua coleta ou recepção pela indústria. O leite instável na prova do álcool e sem acidez de origem microbiológica é chamado de Leite Instável Não Ácido - LINA (LUCEY; HORNE, 2009; MOLINA et al. 2001)

Rebanhos com nutrição e manejo adequados, livres de patologias, estresses e desconfortos devem produzir leite com adequada estabilidade alcoólica (FISHER et al, 2012). Thrall (2007) afirmou que mesmo em animais sem sinais clínicos, os distúrbios ácido-base e/ou eletrolíticos podem ocorrer, dificultando o estabelecimento de relações causa-efeito na instabilidade alcoólica do leite, além de subestimar a intensidade com que esses fatores aparecem associados ao LINA.

Os distúrbios ácido-base podem não só diminuir a produção leiteira, como também desequilibrar os componentes lácteos que estão envolvidos na estabilidade alcoólica (FISHER et al, 2012). Esses dados ficam claros em experimentos induzidos, onde as variáveis são melhor controladas e influências externas são minimizadas.

Em pesquisas à campo, a detecção de relação causa-efeito pode ser dificultosa, uma vez que os vieses não estão previstos no delineamento. No entanto, reunir as principais variáveis que influenciam a ocorrência do LINA e pesquisá-las em animais à campo, pode melhor relacionar os resultados disponíveis até o momento com a realidade.

Considerando que pesquisas anteriores trabalharam com desequilíbrios metabólicos induzidos experimentalmente, esse trabalho teve como objetivo associar a ocorrência de distúrbios ácido-base com a estabilidade alcoólica do leite de animais à campo, bem como avaliar diferenças entre a composição mineral de leites estáveis e instáveis ao álcool.

4.3.4 Material e Métodos

A amostragem compreendeu 96 vacas leiteiras distribuídas em seis propriedades da região norte do Paraná e sem qualquer sinal clínico patológico. As coletas foram realizadas no mês de julho de 2012, sendo coletados o leite e o sangue correspondente de cada animal.

Após a ordenha completa de cada animal, o leite foi homogeneizado com auxílio de uma concha flambada e cerca de 300 mL foram coletados diretamente do latão, mantendo a individualidade da amostra. Aproximadamente 200 mL foram acondicionados em bolsas plásticas, e o restante foi igualmente dividido em frascos de polietileno, todos sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelos recicláveis.

Os frascos de polietileno continham bronopol para a determinação da composição centesimal pela metodologia de infravermelho (INTERNACIONAL IDF STANDART 141C, 2000) e azidiol para a contagem total de bactérias por citometria de fluxo (INTERNACIONAL IDF STANDART 196, 2004). Os frascos foram encaminhados ao laboratório da Associação dos Produtores e Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), Curitiba-PR, onde foram mensuradas a porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT).

As bolsas plásticas seguiram para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina (LIPOA-UEL), onde foram realizadas a prova do álcool 72° (v/v) (BRASIL, 2011; BRASIL, 2003) e titulação de acidez pelo método Dornic (BRASIL, 2003).

Segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic, as amostras foram classificadas em: leite normal (com acidez entre 14°D e 18°D e estável ao álcool); e LINA (com acidez entre 14°D e 18°D, porém instável ao álcool).

Cerca de 20ml de cada amostra de leite foi congelada à -18°C em tubos de vidro tampados até as análises para a determinação de minerais no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Londrina. O período máximo entre a coleta e as análises foi de 120 dias. O descongelamento ocorreu em banho-maria à 36°C , por 20 minutos, com posterior homogeneização em agitador de tubos tipo *vortex* por 10 segundos. Na quantificação de cálcio e fosfato as amostras foram diluídas na proporção 1/10 em água deionizada.

A pesquisa de Na^+ , K^+ e Cl^- nas amostras de leite utilizou o método de eletrodos íon-seletivo indireto no sistema de clínica química Dimension® RXL Siemens Diagnostics (Marburg, Germany) com cartucho de eletrólitos Flex® Electrolytes - S600. A metodologia colorimétrica com leitura espectrofotométrica Dimension® foi utilizada na quantificação de magnésio, cálcio total e fosfato, com os respectivos cartuchos: Flex® MG - DF57 (GITELMAN; HURT; LUTWAK, 1966), Flex® Ca - DF23A (SARKER; CHAUHAN, 1967) e Flex® PHOS - DF61 (GOMORI, 1941).

A coleta de sangue de cada animal foi feita pela punção de 2 mL da veia sacral mediana, utilizando agulha descartável 25 x 8 mm, acoplada firmemente a uma seringa plástica de 3 mL, com cerca de 0,08 mL de heparina sódica. Durante a punção, o animal era contido em estação e o êmbolo da seringa era tracionado com o cuidado de evitar bolhas de ar. A agulha era então vedada com borracha. Durante o transporte as seringas foram submersas em banho de água gelada, entre zero e 4°C por no máximo 4h até a análise, conforme recomendado por Lisbôa et al. (2001).

As amostras de sangue foram analisadas por meio do hemogasômetro Roche Omni C (Roche Diagnostics, Graz, Austria) do Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Londrina, e então mensurados o pH e as pressões parciais de dióxido de carbono (pCO_2) e de oxigênio (pO_2). Através de cálculo a metodologia forneceu também a concentração de bicarbonato no plasma (HCO_3^-) e o excesso de bases no sangue (BE).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e as variáveis analisadas no leite foram a porcentagem de gordura, de proteína, de lactose, de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG), uréia, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), cálcio total (CT),

magnésio (Mg), fosfato (PO_4^{-3}), sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-). No sangue, as variáveis analisadas foram pH, pCO_2 , HCO_3^- e BE.

Esses dados foram submetidos à análise de variância ponderando o efeito do comportamento do leite (normal e LINA), sendo que fatores com $p < 0,05$ foram posteriormente analisados pelo teste de Tukey à 0,5%. As variáveis que não tiveram distribuição normal pelo teste de Lilliefors (CCS e CBT) foram normalizadas por transformação logarítmica.

A partir da interpretação dos valores hemogasométricos, os animais foram classificados em grupos segundo os distúrbios ácido-base: alcalose ou acidose, de origem respiratória ou metabólica, ou ainda, sem distúrbios (normais). A proporção de ocorrência de leites LINA e normais dentro desses grupos foi analisada pelo teste de qui-quadrado à 0,5%. A correção de Yates foi aplicada quando o número de observações era menor que cinco. Os valores de referência para as variáveis sanguíneas foram os apresentados por Blood (1991). Para todas as análises foi utilizado o programa Statistica 7.0.

4.3.5 Resultados e Discussão

As propriedades tinham em média 16 animais em lactação, com uma produtividade média de 12,68 litros cada. Quatro propriedades possuíam ordenha com sistema à vácuo semi-fechado e duas propriedades tinham ordenha manual, porém todas com a presença do bezerro e duas ordenhas ao dia. Essas características de manejo e produção estão de acordo com a média de produção da região norte do estado, que pode variar de 7 até 18 litros/dia (IPARDES, 2009; IBGE, 2011).

Segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic, 67 amostras de leite foram classificadas como normais e 29 amostras se comportaram como LINA. Entre esses dois tipos de leite, não houve diferença ($p > 0,05$) nas médias de porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, uréia, CCS e CBT (Tabela 7).

Tabela 7 – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) da porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg), cálcio total (CT) e fósforo (PO_4^{-3}) em diferentes padrões de estabilidade do leite segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic: Leite Normal e Leite Instável Não Ácido (LINA), observados em 96 amostras da região norte do Paraná.

	Normal (n=67)	LINA (n=29)	Total (n=96)
	\bar{x} / σ	\bar{x} / σ	\bar{x} / σ
Gord (%)	3,41 / 0,94	3,97 / 0,99	3,58 / 0,99
Prot (%)	3,34 / 0,35	3,60 / 0,43	3,42 / 0,39
Lac (%)	4,62 / 0,26	4,45 / 0,17	4,56 / 0,25
ST (%)	12,29 / 1,25	12,95 / 1,18	12,49 / 1,26
Uréia (%)	11,54 / 2,89	10,41 / 3,93	11,20 / 3,26
CBT ($\log^{\text{bac/ml}}$)	1,26 / 0,73	1,47 / 0,52	1,32 / 0,68
CCS ($\log^{\text{cel/ml}}$)	2,13 / 0,73	1,84 / 0,57	2,04 / 0,70
Na^+ (mmol/L)	23,55 / 5,26	24,03 / 4,95	23,70 / 5,15
K^+ (mmol/L)	38,50 ^a / 4,26	43,42 ^b / 6,15	39,99 / 5,38
Cl^- (mmol/L)	26,94 / 4,44	33,62 / 5,35	28,96 / 5,62
Mg (mg/dL)	11,46 / 2,67	12,28 / 2,86	11,71 / 2,74
CT (mg/dL)	104,54 ^a / 5,40	90,87 ^b / 0,81	100,41 / 4,57
PO_4^{-3} (mg/dL)	73,67 ^a / 3,00	58,48 ^b / 0,60	69,08 / 2,62

Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferença no teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em outras pesquisas, os componentes do LINA que frequentemente apresentaram diferenças quando comparados ao leite normal são lactose e gordura. Nos leites instáveis, a lactose costuma aparecer em menores quantidades, enquanto as médias de gordura são maiores. (FISCHER et al. 2006; MARQUES et al. 2007; ZANELA et al. 2009). Os autores associaram essas diferenças à deficiência alimentar e/ou alta contagem de CCS. No presente estudo, os resultados estão de acordo com Fruscalso (2007), que não encontrou diferenças na composição centesimal entre leites estáveis e instáveis ao álcool.

Por sua vez, a média da concentração de potássio (K^+) foi maior ($p < 0,05$) no LINA. Chavez et al (2004) também constataram maiores quantidades de potássio em leites instáveis ao álcool.

O efeito do potássio não se restringe à maior instabilidade ao álcool, Tsioulpas, Lewis e Grandison (2007) constataram que maiores quantidades diminuem o tempo necessário para o leite coagular sob efeito da quimosina. O potássio altera as cargas entre as micelas de caseína e assim promove a diminuição nas suas forças repulsivas. Esse cátion, além de modificar forças iônicas, ainda tem

efeito na diminuição do pH do leite, o que aumenta a instabilidade micelar (DAVIES; WHITE, 1958).

A quantidade média de fosfato (PO_4^{-3}) foi inferior ($p < 0,05$) nos leites instáveis ao álcool. Assim como os citratos, os fosfatos são agentes quelantes e possuem afinidade por íons de metais, como Ca^{++} e Mg^{++} . A interação entre esses cátions e ânions determina que baixas quantidades de fosfatos sejam acompanhadas por altas quantidades de Ca^{++} (LUCEY; HORNE, 2009). O cálcio livre se liga às cargas negativas da caseína, o que diminui a repulsão entre as micelas, deixando-as propensas a aglutinação (instabilidade) frente a menores concentrações de álcool (HORNE; PARKER, 1981).

A relação entre o balanço salino dos componentes citados com a estabilidade ao álcool já foi descrita por Donnelly e Horne (1986) através da fórmula $(\text{Ca} + \text{Mg}) / (\text{P} + \text{Ci})$ ($r = -0,33$; $p < 0,01$). Assim, as interações entre esses sais explicam 33% da estabilidade/instabilidade alcoólica em função do pH. Apesar do baixo coeficiente de correlação é possível notar que Ca^{++} e Mg^{++} promovem desestabilização, enquanto fosfato e citrato têm efeito contrário.

O cálcio iônico aparece em maiores quantidades em leites instáveis em vários estudos. Tsioupas, Lewis e Grandison (2007) investigaram o efeito dos minerais sobre a estabilidade alcoólica do leite durante uma lactação completa, constatando uma forte relação negativa entre teores de Ca^{++} e a estabilidade ($r = -0,84$; $p < 0,05$). Viero (2008) estudou a influência de dietas contendo selênio sobre as características do leite produzido, constatando também que os leites instáveis possuíam maiores teores de Ca^{++} , independente da dieta recebida. A presença de maiores quantidades de cálcio iônico no leite produzido é associada ao início e ao final da lactação, às alterações metabólicas e/ou dietas aniônicas. (TSIOULPAS; GRANDSON; LEWIS, 2011; MARQUES et al. 2011).

Embora o cálcio total não tenha efeito sobre a estabilidade alcoólica do leite (TSIOULPAS; GRANDSON; LEWIS, 2007), há uma relação inversa ($r = -0,60$; $p < 0,05$) com a quantidade de cálcio iônico livre (FOX; MORRISSEY, 1977; AOKI; UMEDA; NAKANO, 1999; CHAVEZ et al. 2004). Assim, se leites instáveis tem maiores quantidades de cálcio livre, também possuem menores quantidades de cálcio total. Nesse estudo não se quantificou o cálcio livre, mas menores ($p < 0,05$) quantidades de cálcio total foram encontradas nas amostras instáveis ao álcool, fortalecendo essa observação.

Os teores de sódio e cloreto não diferiram ($p>0,05$) entre leites normais e LINA, apesar de fazerem parte do grupo de minerais que influenciam a estabilidade alcoólica do leite através do equilíbrio de forças iônicas. As médias de magnésio também não diferiram. Por fazer parte da estrutura micelar, esse último mineral parece ter maior influência na estabilidade térmica à estabilidade alcoólica (CHAVEZ et al. 2004).

Em relação aos distúrbios metabólicos, foi possível observar que os animais que apresentaram algum tipo de distúrbio ácido-base tiveram maior ocorrência de LINA ($p<0,05$) (Tabela 8). Cerca de 43% das vacas que produziram leite normal apresentaram algum tipo de distúrbio, enquanto essa proporção nas vacas que produziram LINA foi maior que 65%. O distúrbio mais frequente observado nos animais produtores de LINA, com 27,59% dos casos, foi a alcalose metabólica compensada (alcalose metabólica + acidose respiratória com pH dentro do intervalo de referência).

Tabela 8 – Frequência absoluta e relativa dos distúrbios ácido-básicos observados em 96 vacas da região norte do Paraná, segundo a estabilidade* do leite produzido

Natureza do distúrbio	Comportamento do leite			χ^2 ; p
	Normal n (%)	LINA n (%)	Total n (%)	
Acidose respiratória	4 (5,97)	3 (10,34)	7	0,12 ; 0,73
Acidose metabólica	1 (1,49)	2 (6,90)	3	0,58 ; 0,45
Alcalose respiratória	7 (10,45)	1 (3,45)	8	0,54 ; 0,56
Alcalose metabólica	5 (7,46)	5 (17,24)	10	1,16 ; 0,28
Acid. resp. + alc. met	11 (16,42)	8 (27,59)	19	1,59 ; 0,21
Alc. resp. + acid. met	1 (1,49)	n.o	1	0,19 ; 0,66
Total com distúrbios	29 (43,28)	19 (65,52)	48 (50)	4,00 ; 0,04
Sem distúrbio	38 (56,72)	10 (34,48)	48 (50)	
Total	67 (100)	29 (100)	96 (100)	

n: número de observações; n.o: não observado

*Avaliação realizada segundo o teste do álcool 72° e acidez Dornic (BRASIL, 2006)

A alcalose metabólica é acompanhada de acúmulo de bicarbonatos no fluido extracelular, resultado de uma perda excessiva de ácidos. Essa situação pode ocorrer quando a excreção de potássio está aumentada. Além da alcalose, outras patologias podem aumentar a excreção do potássio, como vômito, diarreia, obstruções gastrointestinais, peritonites, ascites, hiperadrenocorticismos e insuficiência renal. Em substituição ao potássio perdido, os íons de hidrogênio, que

acidificam o sangue, passam para o interior das células, resultando em um aumento do pH sanguíneo (COLES, 1984). Nesse estudo, vacas que produziram LINA excretaram maiores quantidades de potássio no leite, o que corrobora com o quadro apresentado.

Para compensar a alcalose o organismo do animal diminui a troca de sódio/hidrogênio, diminuindo a formação de amônia e a conservação de bicarbonato. Dessa forma, a excreção de HCO_3^- estará aumentada (BLOOD, 1991). No leite, o aumento da excreção de bicarbonato resulta em dois fatores que estão relacionados ao aumento da instabilidade alcoólica: o primeiro é o aumento do pH, que faz a solubilidade dos sais diminuírem, aumentando as chances de precipitação na prova do álcool.

O segundo fator, é que maiores quantidades de HCO_3^- disponibilizam mais ligações para cátions (Ca, K, Na), aumentando a proporção de sais carbonatados, os quais também conduzem a maiores chances de precipitarem na prova do álcool (FOX, 1992).

O aumento da excreção de bicarbonato no leite e elevação do pH costuma ocorrer nos estágios finais da lactação (DONELLY; HORNE, 1986). A instabilidade proveniente do pH básico pode ser corrigida pela acidificação do leite ou então através da alimentação aos animais, aumentando-se os níveis de carboidratos e ânions da dieta.

A alcalose metabólica pode ser tratada pela administração de infusões salinas, corrigindo o volume de líquido extracelular, as concentrações de sódio e cloreto e normalizando a excreção de potássio (BLOOD, 1991).

Distúrbios ácido-base de outra natureza também podem estar relacionados à instabilidade. Marques et al. (2011) induziram vacas a produzirem LINA através da suplementação alimentar com cloreto de amônio. Essa dieta promoveu a acidose metabólica dos animais e foi constatada pelo pH urinário. Nesse caso, o organismo aumenta a reabsorção de cálcio ósseo, aumentando a proporção de Ca^{++} na secreção láctea, um dos fatores responsáveis pela instabilidade ao álcool.

A análise de variância dos componentes sanguíneos utilizados no diagnóstico dos distúrbios ácido-base mostrou diferença ($p < 0,05$) apenas nas médias de bicarbonato e excesso de bases, que foram maiores entre as vacas que

produziram LINA (Tabela 9), reforçando o achado de maior proporção de casos de alcalose metabólica nesses animais.

Tabela 9 – Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) de pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), concentração de bicarbonato (HCO_3^-), excesso de bases (BE), sódio (Na^+) e potássio (K^+) em 96 amostras de sangue de vacas leiteiras do norte do Paraná segundo diferenças de estabilidade do leite produzido: Normal e Leite Instável Não Ácido (LINA)

	Normal (n=67)	LINA (n=29)	Total (n=96)
	\bar{x} / σ	\bar{x} / σ	\bar{x} / σ
pH	7,43 / 0,06	7,46 / 0,07	7,44 / 0,07
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	42,68 / 8,34	44,01 / 8,09	43,08 / 8,24
HCO_3^- (mmol/L)	27,50 ^a / 3,20	30,02 ^b / 3,68	28,26 / 3,53
BE (mmol/L)	2,94 ^a / 2,89	5,53 ^b / 3,63	3,72 / 3,34
Na^+ (mmol/L)	143,19 / 5,20	142,68 / 2,66	143,03 / 4,58
K^+ (mmol/L)	4,18 / 0,47	4,26 / 0,42	4,21 / 0,46

Médias seguidas de letras diferentes apresentaram diferença no teste de Tukey ($p < 0,05$)

Devido ao estado ácido-base ser compensado pela função renal e/ou respiratória, o pH sanguíneo não apresenta grandes variações. Isso pôde ser observado pelos valores do desvio padrão, resultando em não diferença na análise de variância.

Pressupondo que a alcalose metabólica seja o distúrbio primário, a não diferença entre as médias de $p\text{CO}_2$ pode sugerir que vacas que produziram LINA não conseguiram compensar a alcalose metabólica com a mesma eficiência da resposta respiratória de vacas que produziram leite normal. Quando há aumento do HCO_3^- , espera-se uma compensação respiratória através do aumento da $p\text{CO}_2$ para o equilíbrio do pH, o que não ocorreu.

Também não houve diferença entre as médias de Na^+ e K^+ no sangue de animais que produziram LINA. Há relatos que amostras de leite que possuíam menor estabilidade alcoólica estavam relacionadas com menores quantidades de Na^+ e maiores de quantidades de K^+ , tanto no sangue como no leite dos animais. Quando as vacas ingeriam NaCl, a proporção sanguínea e láctea de Na^+ aumentava, aumentando também a estabilidade do leite. Quando os animais recebiam um bloqueador de íons Na (predinisolona), a estabilidade do leite era reduzida (FUKUSHIMA; DOI; TAKIZAWA, 1983).

Estudos similares, em vacas à campo e com maior amostragem podem gerar interpretações com maior confiabilidade. Tanto a acidose como a

alcalose metabólica parecem interferir na estabilidade do leite, além de outros fatores. Isso indica que soluções simples, como evitar o estresse térmico dos animais, fornecer dietas com correto balanço aniônico e/ou energético e controlar a mastite nos animais, pode minimizar os problemas relacionados à instabilidade do leite na prova do álcool.

4.3.6 Conclusões

A frequência de casos de LINA foi maior nas vacas com distúrbios ácido-base. No entanto, esses distúrbios nem sempre resultaram na produção de leites instáveis ao álcool. A alcalose respiratória, compensada ou não, foi o distúrbio mais observado em animais produtores de LINA, mas a acidose metabólica também pode estar relacionada com o fenômeno.

Fatores que alteram o equilíbrio ácido-base dos animais, como patologias gastrointestinais, patologias renais, dietas desbalanceadas e inabilidade dos mecanismos fisiológicos compensatórios, também podem influenciar a estabilidade alcoólica do leite.

A composição mineral de leites estáveis e instáveis ao álcool pode ser diferente e estar relacionada aos distúrbios ácido-base, sempre considerando que o fenômeno do LINA é multifatorial.

Fatores que evitem o excesso de potássio no leite, a suplementação alimentar com sódio, o conforto térmico e a acidificação do pH do leite merecem maiores estudos sobre suas aplicações na correção da instabilidade alcoólica do leite.

4.3.7 Referências

AOKI, T.; UMEDA, T.; NAKANO, T. Effect of sodium chloride on the properties of casein micelles. **Milchwissenschaft**, p.5491-5493, 1999.

BLOOD, D. C. **Clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, 2011

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA), Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003, Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de agosto de 2003, Seção 1, 2003.

CHAVEZ, M.S.; NEGRI, L.M.; TAVERNA, M.A.; CUATRIN, A. Bovine Milk composition parameters affecting ethanol stability. **Journal of Dairy Research** v.7, p. 120–132, 2004.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

DAVIES, D.T.; WHITE, J.C.D. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, v.25, p.256–266, 1958.

DONNELLY, W.J; HORNE, D.S; Relationship between ethanol stability of bovine milk and natural variations in milk composition. **Journal of Dairy Research**, v.53, p.23–33, 1986.

FETTMAN, M.J. Metabolismo de Fluidos e Eletrólitos. In: Thrall, D.V.M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca. 2007. 582p.

FISHER, V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; FRUSCALSO, V.; RIBEIRO, M.E.R; STUMPF, W.J.; SILVERA, I.D.B. & BARBOSA, R.S. Chemical composition of unstable non-acid milk. International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista Ciência Veterinária**, n.4, v.4, p.52, 2006.

FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.B.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

FOX, P.F.; MORRISSEY, P.A. Review of the progress of Dairy Science: the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.44, p.627-646, 1977.

FOX, P.F. **Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins**. London: Elsevier Applied Science Publisher, 1992

FRUSCALSO, V. **Influência da oferta da dieta, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite bovino e a ocorrência do leite instável não ácido**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007. 132p.

FUKUSHIMA, Y.; DOI, K.; TAKIZAWA, C. Effects of sodium chloride and some drugs on secretion of milk unstable for alcohol test. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.36, p.440-445, 1983.

GITELMAN, H.J; HURT, C.; LUTWAK, L. An automated spectrophotometric method for magnesium analysis. **Anal Biochem**, v.14, p.106, 1966.

GOMORI, G. A. modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. **Journal of Lab. Clin. Med.**, v.27, p955, 1941.

HORNE D. S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. I. Effect of serum phase components. II. The origin of the pH transition. **Journal of Dairy Research**, v.48, p.273–291, 1981.

INTERNATIONAL IDF Standard 141C:2000: Whole milk - determination of milkfat, protein and lactose content. **Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussels, 2000.

INTERNATIONAL IDF Standard 196C:2004: Milk - Quantitative determination of bacteriological quality. **Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results**. Brussels, 2004.

IBGE. **Pesquisa Trimestral do leite**. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA, 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 8 jul. 2012.

IPARDES. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná: sumário executivo**. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. IPARDES, Curitiba, 2009. 29p.

LEWIS, M.J. The measurement and significance of ionic calcium in milk - review. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.1, p.1-13, 2011.

LISBÔA, J.A.N.; BENESI, F.J.; MARUTA, C.A.; MIRANDOLA, R.M.S.; TEIXEIRA, C.M.C. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.271-276, 2001.

LUCEY, J.A.; HORNE, D.S. Milk Salts: Technological Significance. In:FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. Third ed. Springer: New York, 2009.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W.; FISHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.91–97. 2007.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C.M. Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt. **Brazilian Journal of Animal Science**, v.40, p.1088-1094, 2011.

MOLINA, L.H.; GONZÁLEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B. & PINTO, M. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de um centro de acopio lechero. **Archs Med. Vet.**, n.33, v.2, p.233-240, 2001.

SARKER, B.; RAY, C.; CHAUHAN, U.P.S. A new method for determining micro-quantities of calcium in biological materials. **Anal. Biochem.**, v.20, p.155-166, 1967.

THRALL, D.V.M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca. 2007. 582p

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M.J.; GRANDISON, A.S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. **J Dairy Res.**, v.74, n.2, p.167-173, 2007.

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

VIERO, V. **Efeito da suplementação com selênio no perfil bioquímico sanguíneo e características físico-químicas do leite normal e do leite instável não ácido**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISHER, V. & STUMPF JR, W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.61, n4, p.1009-1013, 2009.

5 CONCLUSÕES FINAIS

A composição do LINA foi diferente quando comparado ao leite normal, sendo que o LINA apresentou menor média de lactose e de sólidos não gordurosos em pelo menos uma estação.

A estabilidade térmica entre leite normal e LINA foi semelhante, evidenciando que a acidez não é o único fator relacionado à termo-estabilidade.

A distribuição do LINA variou conforme as estações do ano, sendo mais alta no outono e menor no verão.

A estrutura cristalográfica do LINA diferiu quando comparada com leites estáveis e ácidos e difratometria de raios X se mostrou uma ferramenta útil na pesquisa de padrões cristalográficos segundo a estabilidade do leite ao álcool. Porém, estudos com maior amostragem podem melhorar a interpretação dos dados.

A frequência de distúrbios ácido-base foi maior em vacas que produziram LINA. No entanto, esses distúrbios nem sempre resultaram na produção de leites instáveis ao álcool. A alcalose respiratória, compensada ou não, foi o distúrbio mais observado em animais produtores de LINA, mas a acidose metabólica também pode estar relacionada com o fenômeno.

Considerando a multifatorialidade do LINA e que nem sempre está relacionado à má qualidade do leite, é interessante que as limitações do teste do álcool/alizarol sejam divulgadas, desde a produção até o beneficiamento, minimizando interpretações não condizentes com a realidade.

Porém, enquanto os problemas da qualidade microbiológica do leite brasileiro não estiverem resolvidos, esse teste ainda pode ter a sua utilidade.

A ocorrência do LINA, bem como sua composição e possíveis causas variam conforme a região e a sazonalidade. Assim, estudos regionais e contínuos são oportunos, uma vez que podem ajudar a caracterizar o fenômeno e balizar as interpretações das indústrias e produtores frente ao fenômeno.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Valores de referência para pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), concentração de bicarbonato (HCO_3^-), excesso de bases (BE), sódio (Na^+) e potássio (K^+) em sangue bovino

	Bovinos
pH	7,35 a 7,50
$p\text{CO}_2$ (mmHg)	34 a 45
HCO_3^- (mmol/L)	20 a 30
BE (mmol/L)	-2,3 a 3,7
Na^+ (mmol/L)	132 a 152
K^+ (mmol/L)	3,9 a 5,8

Fonte: (BLOOD, 1991)

APÊNDICE B

Valores de referência para gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), uréia, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg), cálcio total (CT) e fósforo (PO_4^{-3}) em leite bovino

	Referência ou Padrão para leite cru	Fonte
Gord (%)	mínimo de 3%	BRASIL, 2011
Prot (%)	mínimo de 2,9%	BRASIL, 2011
CBT (bac/ml)	máximo de 6×10^5	BRASIL, 2011
CCS (cel/ml)	máximo de 6×10^5	BRASIL, 2011
Lac (%)	~4,8	FOX, 2009
ST (%)	~11	FOX, 1992
Uréia (%)	10 a 14	FOX, 1992
Na^+ (mmol/L)	17 a 28	GAUCHERON, 2005
K^+ (mmol/L)	31 a 43	GAUCHERON, 2005
Cl^- (mmol/L)	22 a 34	GAUCHERON, 2005
Mg (mg/dL)	0,97 a 14,60	GAUCHERON, 2005
CT (mg/dL)	104,30 a 128,30	GAUCHERON, 2005
PO_4^{-3} (mg/dL)	93 a 99	GAUCHERON, 2005