

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

LUIZA CAROLINE CHIEZI MENDES

**ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA) E
SUA RELAÇÃO COM A RAÇA E A FASE DE LACTAÇÃO**

PONTA GROSSA

2021

LUIZA CAROLINE CHIEZI MENDES

ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA) E SUA
RELAÇÃO COM A RAÇA E FASE DE LACTAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção de parte integral da nota para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de produção animal.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Adriana de Souza Martins

PONTA GROSSA
2021

LUIZA CAROLINE CHIEZI MENDES

ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO (LINA) E SUA
RELAÇÃO COM A RAÇA E FASE DE LACTAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de graduação em
Zootecnia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Produção Animal –
Zootecnia.

Ponta Grossa, 14 de dezembro de 2021

Adriana de Souza Martins – Orientadora

Doutorado em Produção Animal – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho –
UNESP – Jaboticabal

Guilherme de Almeida Tedrus

Doutorado em Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas –
UNICAMP – Campinas

Fabiana Alves de Almeida

Doutorado em Produção Animal – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho –
UNESP – Jaboticabal

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvânia e Madison por acreditar, apoiar e me oferecer sempre o que puderam com todo amor, dedicação, carinho e acima de tudo, juntos. E a minha avó Adélia que sempre me incentivou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, saúde, força e alegrias durante todo esse trajeto, tanto pela vida acadêmica como na vida pessoal.

Aos meus pais Madison e Silvânia por todo apoio, carinho, incentivo, esforço, confiança, respeito e por sempre estarem presentes em cada momento da minha vida. Vocês são o meu porto seguro e responsáveis pela pessoa que sou hoje. Agradeço por tudo que já fizeram e ainda continuam fazendo por mim. Espero que um dia eu retribua tudo isso. Obrigada por tudo.

À minha irmã Laura, por todo apoio, carinho, amor, amizade e descontração.

À minha avó Adélia que sempre me contou as histórias de sua mãe que a partir disso me fizeram descobrir um objetivo de vida. Esteve sempre ao meu lado, incentivando, aconselhando e ensinando.

Aos meus animais, Moli, Lola e Katu. As quais, foram adotadas, resgatadas e hoje tem um lar para chamar de seu. E a cada dia que passa me ensinam a amar ainda mais os animais.

Ao meu melhor amigo Rafael por não duvidar da minha capacidade, por toda a amizade, companheirismo, carinho, brincadeiras e conselhos. Você é essencial na minha vida.

Aos meus amigos de faculdade Luan, Ingrid, Simone, Gustavo, Letícia e Jéssica pela parceria, apoio, companheirismo, brincadeiras e amizade durante esse tempo de graduação ao qual sempre ficamos juntos.

A Prof.^a. Dra. Adriana de Souza Martins, por todas as orientações, conhecimentos, ajuda, apoio e assistência. A sua profissão é inspiradora e sinto um privilégio em poder aprender com você.

A Joslaine, Fabiane e Caroline colegas de laboratório, pelo apoio, parceria, amizade durante esse período, pelas conversas e momentos de descontração.

RESUMO

A ocorrência de leite instável não ácido (LINA) altera as características físico-químicas do leite, tornando-o instável ao álcool, mesmo em concentrações normais de acidez. Objetivou-se avaliar a ocorrência de LINA de um rebanho leiteiro e sua relação com a raça e fase da lactação. Foram avaliadas amostras de leite de 20 vacas, sendo treze da raça Holandesa e sete vacas mestiças (Holandês x Jersey e Holandês x Jersey e Illawarra). As amostras foram analisadas para prova do alizarol, pH, acidez, gordura, proteína, lactose e densidade. Para a comparação das médias de pH, acidez, densidade e teores de proteína, gordura e lactose em função da raça (Holandesa x mestiça) foi realizado a ANOVA, pelo teste T Student, a 5% de significância. Observou-se maior ($p < 0,05$) acidez, e teores de gordura, proteína, sólidos não gordurosos e contagem de células somáticas no leite das vacas mestiças em relação às vacas da raça Holandesa. Na raça Holandesa, verificou-se a ocorrência de 22% de casos de LINA e nas vacas mestiças Holandês x Jersey e Illawara o percentual de casos foi de 59%. Devido à sua composição, o leite de vacas mestiças apresenta maior propensão à ocorrência de LINA.

Palavras-chave: acidez titulável, contagem de células somáticas, gordura, pH do leite, proteína, prova do etanol

ABSTRACT

The occurrence of non-acid unstable milk (LINA) changes the physicochemical characteristics of milk, making it unstable to alcohol, even at normal acidity concentrations. This study aimed to evaluate the occurrence of LINA in a dairy herd and its relationship with breed and lactation stage. Milk samples from 20 cows were evaluated, thirteen being Holstein and seven crossbreds (Holstein x Jersey and Holstein x Jersey and Illawarra). The samples were analyzed to test alizarol, pH, acidity, fat, protein, lactose, and density. To compare the means of pH, acidity, density and protein, fat, and lactose levels as a function of race (Holstein x crossbred), ANOVA was performed using the Student T test at 5% significance. It was observed higher ($p < 0.05$) acidity, fat, protein, non-fat solids, and somatic cell count in the milk of crossbred cows compared to Holstein cows. In the Holstein breed, there was the occurrence of 22% of cases of LINA and in the Holstein x Jersey and Illawarra crossbred cows the percentage of cases was 59%. Due to its composition, milk from crossbred cows is more prone to the occurrence of LINA.

Keywords: acidity, somatic cell count, fat, milk pH, protein, alizarol test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de pH, acidez titulável e densidade do leite de vacas da raça Holandesa e mestiças (Holandês x Jersey e Holandês x Jersey x Ilawara)	16
Tabela 2 - Percentual de amostras de leite de vacas da raça Holandesa e Holandês x Jersey e Holandês x Jersey x Ilawara em função da presença ou não de grumos e da coloração das amostras de leite pela prova do alizarol	17
Tabela 3 - Valores médios e desvio-padrão dos teores de gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico no leite (NUL), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) do leite e ocorrência de LINA em função das raças holandesa e mestiças Holandês	20
Tabela 4 - Percentual de casos de LINA em função da raça e do Estádio de lactação ..	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPP	Contagem Padrão em Placas
CCS	Contagem de células somáticas
Céls	Células
CMETL	Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite
dL	Decilitro
g	Gramas
IN	Instrução Normativa
LINA	Leite Instável Não Ácido
NUL	Nitrogênio Ureico no leite
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de Sódio
P	Fósforo
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UHT	Ultra-high temperature
β	Beta
κ	Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

O leite, por natureza, é um alimento rico em nutrientes, contendo proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais (FONSECA e SANTOS, 2000). Leite de qualidade deve apresentar composição química, microbiológica e organoléptica que atenda as exigências de qualidade mundiais, estando livre de antibióticos, desinfetantes ou adulterantes e ser provenientes de rebanhos com sanidade monitorada (RIBEIRO et al., 2006).

Apesar das dificuldades, a bovinocultura leiteira é extremamente importante para o agronegócio brasileiro, gerando emprego e renda tanto em sistemas empresariais ou em propriedades familiares. O leite é de vital importância para o ser humano e, neste sentido, os consumidores estão cada vez mais criteriosos na escolha dos alimentos. As empresas do segmento alimentício têm se adaptado às condições impostas pelo mercado, procurando unir qualidade com custo baixo de produção. Diante deste fato, as ações de produtores e técnicos, visando a melhoria no processo de aquisição do leite, são fundamentais. Estas ações têm enfoque desde a nutrição até as práticas de higiene de ordenha, manejo e ambiência, uma vez que muitas propriedades não possuem uma gestão eficiente, comprometendo a qualidade do leite. (WERNCKE et al., 2016).

Na transformação da matéria prima em derivados lácteos, além das características originais, o leite precisa ser estável ao tratamento térmico. Nesse princípio, as indústrias buscam leite com acidez normal (entre 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 ml), baixo nível de contagem de células somáticas (CCS) (inferior a 500 mil células/ml), contagem padrão em placas (CPP) (inferior a 300 mil UFC/ml) e concentrações estabelecidas por órgãos fiscalizadores de proteína (mínimo de 2,9 g/100 ml), gordura (mínimo de 3,0 g/100 ml), minerais e sólidos totais (mínimo de 11,4 g/100 ml). De acordo com MONARDES (2004), os parâmetros de qualidade do leite são cada vez mais utilizados para detectar falhas nas práticas de manejo e servir como referência na valorização da matéria-prima.

Uma das causas de alterações na qualidade do leite é a ocorrência do Leite Instável Não Ácido (LINA), definido como o conjunto de alterações físico-químicas do leite que causam a perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool sem haver acidez (ZANELA et al. 2006). Na indústria, este leite pode ocasionar impregnação nas placas do pasteurizador, menor rendimento na fabricação de queijos, diminuição do tempo de validade dos produtos, sobretudo leite UHT, devido à possibilidade de precipitação (leite

gelatinoso). MARQUES *et al.* (2007) esclarecem que resultados positivos podem ser identificados quando há acidificação do leite devido ao aparecimento de culturas bacterianas e, mais recentemente, tem sido descrita a instabilidade da caseína sem relação com acidez elevada.

A acidez desenvolvida ou real, é o resultado da acidez natural com os ácidos resultantes da fermentação da lactose (ácido láctico, acético, fórmico, butírico etc.). Esta faz com que haja um aumento ainda maior da acidez do leite, quando o leite é obtido em condições de má higiene e quando é mantido em condições de temperaturas altas, permitindo o aumento dos micro-organismos “naturais” do leite e aqueles vindos da contaminação (VELLOSO, 1998).

Segundo Fonseca e Santos (2000), a ausência de higiene resulta no crescimento de bactérias mesófilas dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e algumas enterobactérias que fermentam a lactose, gerando ácido láctico e reduzindo o pH do leite. A acidificação gera uma desestruturação das micelas de caseína e formação de coágulo. Esse é um dos problemas detectados com maior frequência na plataforma das indústrias de laticínios. Dessa forma, o leite LINA é confundido com o leite ácido, uma vez que coagula no teste do álcool, gerando prejuízo financeiro na cadeia leiteira, tanto por parte do produtor, quanto por parte da indústria, que diminui o potencial de produção (SOUZA *et al.*, 2016).

Na indústria, a utilização de métodos rápidos de análise e que sejam confiáveis, são essenciais na seleção de uma matéria prima de qualidade. A prova do álcool ou alizarol, utilizada para a avaliação da estabilidade do leite, é utilizada no momento do carregamento, na propriedade e, posteriormente, na plataforma de recebimento do leite, nas indústrias de laticínios. É uma prova rápida e de baixo custo, que utiliza álcool sob determinada concentração para análise da estabilidade. Nesta prova, o álcool diminui a constante dielétrica do meio, favorecendo a interação entre cargas na superfície da caseína, diminuindo as cargas negativas micelares e a sua força de repulsão, promovendo a coagulação (FISCHER *et al.*, 2012a).

As causas do LINA ainda não são bem esclarecidas. Entre os fatores que podem levar a um quadro de LINA estão possíveis falhas no balanceamento da dieta, falhas na mineralização do rebanho, fase da lactação, presença de colostro, raça do animal (FISCHER *et al.*, 2012a), além de questões metodológicas. A raça Jersey normalmente produz leite com acidez natural mais elevada devido à sua composição (GONZÁLEZ e

CAMPOS, 2003). Relata-se também ocorrência de problemas na execução do teste (concentração do álcool, pH da solução, tempo para a realização da análise), que podem levar a erros de interpretação do teste.

Nos últimos anos, os problemas relacionados à instabilidade do leite no teste do álcool passaram a ser questionados pelos produtores, principalmente sobre o nível de instabilidade na prova do álcool e a possibilidade de aproveitamento desse leite pela indústria. Dessa maneira, o setor de produtos láteos no Brasil tornou-se cada vez mais competitivo, exigente e tecnológico. Houve então a necessidade de alterações nas legislações pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Dentre as exigências das Instruções Normativas (IN) nº 77/18 (BRASIL, 2018 a, b) está à realização do teste do alizarol no momento da coleta do leite, com o intuito de avaliar a estabilidade do leite na propriedade, antes do seu carregamento. De acordo com a legislação, o leite deve ser estável em álcool, na concentração mínima de 72%. Leite que coagula neste teste (resultado positivo para o teste do alizarol) resulta na condenação do produto pela indústria (ZANELA et al. 2017). Sabe-se que quanto maior a concentração do álcool maior a probabilidade de se detectar a instabilidade do leite. No entanto, algumas indústrias de láteos, utilizam concentrações acima de 72%, podendo em alguns casos chegar a 86% para a indústria, o aumento na concentração do álcool tem como propósito definir o leite de melhor qualidade, porém como consequência há o aparecimento de resultados falsos positivos, ocasionando transtornos para o produtor.

Segundo Brasil; Nicolau e Silva (2015), quando a indústria faz a utilização do leite caracterizado como LINA, o rendimento dos produtos láteos é menor, pois as concentrações dos componentes do leite serão inferiores aos valores padrão, como por exemplo, o teor de proteína, lactose, gordura. Além de acarretar prejuízos econômicos significativos a toda cadeia produtiva, já que o leite é penalizado, gerando descontos no preço pago ao produtor.

Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ocorrência de LINA e sua relação com a raça e a fase da lactação, por meio da análise da prova do alizarol, do pH e acidez titulável e composição do leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Leite na Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON), pertencente à Universidade Estadual de Ponta Grossa

(UEPG). Foram avaliadas amostras de leite de 20 vacas, sendo treze da raça Holandesa e sete vacas mestiças (Holandês x Jersey e Holandês x Jersey e Illawarra).

Foram realizadas amostragens de leite de cada vaca semanalmente, no período de março e junho de 2017, totalizando 189 amostras. O DEL (dias em leite) apresentou valor médio de 165 dias, indicando que o rebanho não apresentou problemas reprodutivos durante o período experimental.

As vacas foram mantidas em sistema semi-intensivo, recebendo alimentação duas vezes ao dia. Alimentação essa que era disponibilizada após a ordenha da manhã (08:00 horas) e da tarde (15:00 horas). Após a ordenha da tarde, as vacas eram encaminhadas para piquetes e ficavam até a manhã do dia seguinte. A alimentação consistiu em silagem de milho à vontade e concentrado (55% de milho, 26% de farelo de soja, 15,5% de farelo de trigo e 3% de sal mineral e 0,5% de bicarbonato de sódio), em comedouros coletivos e cochos de água à vontade.

A coleta das amostras era feita durante a ordenha. A ordenha era do tipo espinha de peixe, sendo que em cada lado havia capacidade para cinco animais. Assim que os animais eram ordenhados, havia um copo coletor acoplado em cima do sistema de canalização, a partir que os animais fossem ordenhas era coletado a amostra individual de cada animal.

Após a coleta, as amostras de leite foram armazenadas em frascos identificados e acondicionados em caixa térmica com bolsas de gelo e encaminhadas ao laboratório do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL) para análises, onde permaneceram sob refrigeração, entre 4 a 6°C, simulando a temperatura do tanque de resfriamento na propriedade.

As análises de gordura, proteína, lactose e densidade foram realizadas por meio do analisador ultrassônico de leite (marca AKSO). Para a utilização do analisador ultrassônico, foi necessário proceder a calibragem do aparelho, analisando-se duas amostras de leite quanto ao teor de gordura (uma com baixo teor e outra com alto teor de gordura), por meio do método de Gerber (TRONCO, 2010). Após cada análise, realizou-se a limpeza do equipamento com solução de NaOH na concentração de 10 mL e semanalmente com solução ácida, na concentração de 10 mL.

Para a realização da prova do alizarol, foram adicionados em tubos de ensaio 2 mL de leite de cada vaca e 2 mL de solução de alizarina (0,1%) em etanol na concentração de 72%. Procedeu-se a agitação manual dos tubos e em seguida avaliou-se a solução quanto

à coloração e a presença ou ausência de precipitação do leite (TRONCO, 2010). A interpretação da coloração seguiu o seguinte critério: a) Leite com coloração pardo avermelhada e com acidez entre 14-18°D, sem coagulação – leite normal; b) Leite com coloração Pardo amarelada e com coagulação – leite ácido; c) Leite com coloração violeta sem coagulação e acidez abaixo de 14° D, leite alcalino ou fraudes. Quanto a presença de grumos, as amostras foram classificadas em quatro níveis: 0 (sem formação de grumos), 1 (poucos grumos), 2 (quantidade de grumos intermediária); 3 (muitos grumos).

A análise de acidez no leite foi realizada de acordo com a metodologia descrita por TRONCO (2010), que consiste na titulação com hidróxido de sódio a 0,11N, conhecida como solução de Dornic. Nesta análise, usou-se uma bureta de 25 mL, com a solução de hidróxido de sódio (NaOH, solução DORNIC). Foram pipetados 10 mL de leite de cada amostra em Erlenmeyer. Em seguida, adicionaram -se 3 a 4 gotas de fenolftaleína 1% (que auxilia no ponto de viragem da coloração do leite), em seguida, foi adicionado, aos poucos, NaOH com o auxílio da bureta. No ponto de viragem (coloração rosada), foi registrado o valor da titulação. Esta análise foi realizada em duplicata. Para o cálculo da acidez, utilizou-se a seguinte fórmula:

Acidez = volume da solução de NaOH x fator de correção da solução x 10.

Para a detecção do LINA, as amostras de leite foram analisadas da seguinte forma: amostras de leite que apresentaram grumos (nas intensidades 1, 2 ou 3) e acidez entre 14 a 18° D, foram caracterizadas como leite instável não ácido (LINA). Na análise dos casos de LINA quanto à fase da lactação, as vacas foram divididas em três grupos: fase inicial da lactação, que correspondeu do parto aos 100 dias de lactação; fase intermediária, correspondendo de 100 a 150 dias de lactação e fase final, de 150 dias de lactação até a secagem.

Para a comparação das médias de pH, acidez, densidade e teores de proteína, gordura e lactose em função da raça (Holandesa x mestiça), foi realizado ANOVA e, para comparação das médias, utilizou-se o teste T Student, considerando 5% de significância, utilizando-se om software Statistica (versão 7.0). Para os resultados de LINA, foram calculados os percentuais de casos em função da raça (Holandesa ou mestiça) e do estágio de lactação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros analíticos de pH, acidez e densidade, foram avaliados considerando a comparação entre a raça Holandesa e os mestiços (Holandês x Jersey e Holandês x Jersey x Illawarra (Tabela 01).

Tabela 1 - Parâmetros de pH, acidez titulável e densidade do leite de vacas da raça Holandesa e mestiças (Holandês x Jersey e Holandês x Jersey x Illawara)

Parâmetros	Raça		P
	Holandesa	Mestiça	
pH	6,79 ± 0,68	6,83 ± 0,15	NS
Acidez (°D)	16,95 ± 3,22	18,83 ± 3,11	< 0,01
Densidade (g/mL)	1,032 ± 3,10	1,033 ± 3,80	NS

Valores de P <0,05 entre as médias na mesma linha, diferem pelo teste de t de Student.

Fonte: a autora

Houve diferença ($p < 0,01$) entre raça para os parâmetros de acidez, sendo encontrada maior acidez no leite das vacas mestiças Holandês x Jersey x Illawarra, com 18,8°D (tabela 1). Podendo acarretar prejuízos para o processamento do leite. O teor de acidez do leite pode variar em função da raça, fase de lactação, entre outros fatores. A presença de colostro também pode alterar a acidez do leite. Logo após o parto, ocorre a produção de colostro que é mais ácido, podendo chegar à acidez de até 44°D. Após 4 a 6 dias de parição, a acidez é normalizada e durante o período de lactação permanece constante. A mastite também pode causar alterações na acidez do leite, pois eleva o teor de íons Na e causa redução dos teores de Ca, P e K, tornando o pH alcalino e com menor acidez titulável (OLIVEIRA et al., 1999). Com relação à raça, o gado Jersey normalmente produz leite com acidez natural mais elevada devido à sua composição (GONZÁLEZ e CAMPOS, 2003). Sendo assim, a maior acidez do leite das vacas mestiças pode ter ocorrido em função de apresentarem na composição genética a raça Jersey.

A densidade do leite não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as raças (tabela 1). De acordo com a IN nº 77/18, a média padrão de densidade varia entre 1,028 a 1,034 g de ácido láctico/ 100 mL. (BRASIL, 2018 a, b). A densidade do leite está relacionada com os teores de água, gordura e de sólidos não gordurosos. A gordura apresenta menor densidade que a água, portanto, a densidade de uma amostra leite com menor teor de gordura normalmente é maior que a de uma amostra de leite com mais

gordura. Apesar das diferenças no teor de gordura (tabela 3), a densidade do leite foi semelhante entre as raças, e mostrou-se dentro dos padrões de normalidade.

Na Tabela 2, encontram-se os resultados das análises da prova do alizarol em função da raça avaliada (mestiças ou Holandesas). Verificou-se que entre as vacas da raça Holandesa, aproximadamente 79% apresentaram leite normal, sem a presença de grumos e apenas 21% das amostras de leite apresentaram grumos, sendo este considerado leite instável no processamento térmico, ou seja, LINA. Por outro lado, para as vacas mestiças Jersey x Holandês x Illawara, apenas 40% das amostras de leite não apresentaram grumos e 47,82% apresentaram poucos grumos, 11,6% muitos grumos e 1,4% completamente com grumos. Leite com coloração pardo avermelhada e com a presença de grumos na prova do alizarol, indicam a ocorrência de LINA no rebanho.

Tabela 2 - Percentual de amostras de leite de vacas da raça Holandesa e Holandês x Jersey e Holandês x Jersey x Ilawara em função da presença ou não de grumos e da coloração das amostras de leite pela prova do alizarol

Raça	Grumos				Violeta	Coloração	
	0	1	2	3		Pardo Amarelado	Pardo Vermelhado
Holandesa	78,7	18,2	2,5	0,8	34,16	24,16	41,66
Mestiça	39,13	47,82	11,6	1,4	28,98	33,3	39,13

Raça Holandesa: 120 amostras; Mestiças: 69 amostras.

Grumos: 0 – Nenhum grumo; 1- Poucos grumos; 2- Muitos grumos; 3- Completamente com grumos. Coloração e presença ou não de grumos: Pardo avermelhada e sem grumos – leite normal (14-18°D); Pardo avermelhado com grumos – LINA (14-18°D); Pardo amarelado com grumos – leite ácido (superior a 21°D); Violeta – leite alcalino.

Fonte: a autora

Desta forma, verificou-se maior instabilidade do leite de animais mestiços comparados com a raça Holandesa. Estes resultados evidenciam que as vacas mestiças apresentam maior tendência a apresentar LINA. A relação entre nutrição e a ocorrência do LINA é um dos fatores que mais interfere, além de fatores como estação do ano. Segundo LOPES (2008), os períodos de maior incidência de LINA compreendem os meses de março e agosto. Este fato pode ser explicado pela fase estacionária de produção e qualidade das forragens entre os períodos citados. E ainda, a instabilidade do leite pode ser decorrente de diminuições de energia no tecido epitelial, envolvendo a secreção de componentes lácteos, levando em consideração apenas fatores que alteram a composição do leite numa mesma espécie animal (PONCE e HERNÁNDEZ, 2001).

De acordo com ZANELA (2006), a etiologia do LINA não se encontra associada apenas com fatores nutricionais, mas também a fatores genéticos. Segundo Horne e Parker (1981), existem diferenças específicas de cada animal, quanto à reação à prova do alizarol. É possível que a instabilidade esteja associada a fatores genéticos e aos tipos de k-caseínas e outras proteínas lácteas que cada raça possui (PONCE e HERNÁNDEZ, 2001).

ROBITALLE (2001), estudando a expressão do alelo de k-caseína em vacas da raça Holandesa. Sobre a estabilidade ao etanol, verificou que o leite de vacas que apresentaram uma expressão do alelo B maior do que o alelo A do gene k-caseína precisou de maior concentração de etanol para a precipitação do que para o grupo que apresentou a expressão dos dois alelos.

Desta forma, verifica-se no presente trabalho, que a maior variação do gene k-caseína se encontra no leite de animais mestiços que possuem a raça Jersey como parte integrante do seu genoma uma contribuição maior para a instabilidade do leite. Os resultados encontrados são semelhantes ao de ZANELA (2006), que propõem que a variação dos alelos B do tipo k-caseína do leite de vacas Jersey foi superior quando comparada com a das vacas da raça Holandesa

Na leitura e interpretação dos resultados da prova do alizarol quanto à coloração (Tabela 2), ficou evidenciado que 42% das amostras de leite das vacas da raça Holandesa apresentaram coloração pardo avermelhada (tijolo), indicando um leite normal (14-18°D). Da mesma forma, 39% das amostras de leite de vacas mestiças apresentaram a coloração pardo-avermelhada. A ocorrência de coloração pardo amarelada com coagulação (formação de grumos) mostra o leite com acidez Dornic superior a 21°D. Isto evidencia a ocorrência de acidez que promove alterações nas características físicas e químicas do leite, além da sua instabilidade durante o processamento térmico pela indústria, tornando inviável a fabricação de produtos lácteos a partir desta matéria prima. Leite que apresenta esta caracterização no momento da prova do álcool é rejeitado pela indústria, trazendo prejuízos para o produtor, uma vez que o leite será descartado.

As causas de elevada acidez no leite podem estar relacionadas com problemas de higienização na ordenha, que leva à proliferação de micro-organismos que irão fermentar a lactose, obtendo como produto final o ácido lático. Este é responsável pela diminuição do pH (acidez). Além disso, a elevação da temperatura do tanque de resfriamento também pode interferir na conservação do leite, propiciando aumento da

fermentação de micro-organismos sobre a lactose e, conseqüentemente, aumento da concentração de ácido láctico, responsável pela acidez do leite.

A coloração violeta sem coagulação, mostra leite alcalinizado. No presente trabalho, para animais da raça Holandesa, o percentual foi um pouco maior (34%) comparado às amostras de leite dos animais mestiços (29%). A ocorrência de casos de mastite no rebanho pode ter contribuído com este fator, uma vez que, o leite mastítico e do final da lactação têm mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da lactação.

Segundo BARROS *et al* (1999), com o avanço da lactação, há um aumento na estabilidade do leite, reduzindo nos últimos dias de lactação. O fator responsável por esse acontecimento é devido a um aumento na permeabilidade das junções firmes da glândula mamária. De acordo com TOZZETI *et al.* (2008), a mastite altera a permeabilidade vascular das células da glândula mamaria, afetando o equilíbrio salino do leite, causando instabilidade nas micelas de caseína. De acordo com SHAMAY *et al.* (2003), apesar das concentrações de potássio (K⁺) e do Ca⁺ serem menores em leites com alta CCS, o teor de minerais eleva-se em consequência do aumento no teor de sódio e cloro, ocasionado pela alta permeabilidade das junções firmes.

Em ambientes de elevação do pH tem-se redução gradativa do cálcio solúvel por sequestro pelos íons fosfatos. Com esta redução dos íons de cálcio, a carga negativa da barreira energética volta a aumentar, exigindo maior percentagem de etanol para que ocorra a precipitação (SILVA e ALMEIDA, 1998).

Stumpf *et al.* 2020 ao avaliarem a permeabilidade das junções firmes da glândula mamária em vacas leiteiras, utilizando a prova do álcool com diferentes concentrações (entre 50 a 98% v/v), observaram que vacas com estágio de lactação avançado, produziram maior percentagem de leite instável a 63,2% v/v.

Baseado nisso, e de acordo com os autores citados, levando em consideração que a concentração padrão utilizada no trabalho de 72% v/v, pode ser um fator responsável por influenciar na estabilidade do leite, além do estágio de lactação em que apresentou maior percentual de animais da raça holandesa em fase final de lactação (12 animais da raça Holandesa e 10 animais mestiços) (tabela 3).

Na Tabela 3, encontram-se os valores de composição do leite e o percentual de casos de LINA em função da raça. O teor de gordura do leite foi maior ($p < 0,05$) para os animais mestiços em comparação com os animais da raça Holandesa. A gordura é o

componente do leite de maior variabilidade, sendo influenciada pela genética do animal, nutrição, fatores ambientais, entre outros. Dentre os fatores ambientais, o manejo nutricional pode exercer uma influência importante na composição da gordura do leite, de modo que pode variar de 2,2 a 4,0% (PINNA e FAJARDO, 2000).

Tabela 3 - Valores médios e desvio-padrão dos teores de gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico no leite (NUL), sólidos não gordurosos (SNG), contagem de células somáticas (CCS) do leite e ocorrência de LINA em função das raças holandesa e mestiças Holandês

Parâmetros	Raça		
	Holandesa	Mestiça	P
Gordura (%)	3,38 ± 0,89	3,78 ± 0,93	< 0,01
Proteína (%)	3,19 ± 0,21	3,39 ± 0,38	< 0,01
Lactose (%)	4,58 ± 0,19	4,61 ± 0,31	NS
NUL (mg/mL)	9,52 ± 2,53	10,38 ± 3,21	0,01
SNG (%)	8,61 ± 0,38	8,86 ± 0,55	< 0,01
CCS (x 1000 Cél/s/mL)	610 ± 1484	643 ± 1232	NS
Ocorrência de LINA (%)	21,66	59,42	

Valores de P <0,05 entre as médias na mesma linha, diferem pelo teste de t de Student
Fonte: a autora

O teor de proteína também apresentou diferença entre as raças, sendo encontrado maior teor de proteína no leite ($p < 0,01$) das vacas mestiças (com a presença de animais da raça Jersey) em comparação com a raça Holandesa (tabela 3). As vacas da raça Holandesa são mais produtivas que as mestiças Jersey. Sendo assim, o efeito de diluição reflete em menores teores de sólidos (gordura, proteína) no leite de vacas da raça Holandesa. A lactose não sofreu alterações em função da raça ($p > 0,05$), sendo o componente do leite que apresenta menor variação.

As raças mestiças avaliadas neste trabalho possuem em seu padrão racial as raças Jersey e Illawarra. O componente do leite que mais varia nessa raça é o alto teor de gordura, sólidos não gordurosos e proteína quando comparado ao da raça Holandesa. Por outro lado, vacas da raça Jersey possuem o leite mais ácido devido a composição natural do leite (FISCHER, 2012).

O leite apresenta padrões de referência para os teores de nitrogênio uréico no leite (NUL), podendo variar entre 10 a 14 mg/dl. Valores superiores são vistos como consequência de problemas nutricionais que podem comprometer a eficiência reprodutiva

no rebanho. O aumento do nitrogênio uréico no leite é um indicativo ou excesso de amônia ruminal em relação à energia disponível para o crescimento microbiano no rúmen. Alta quantidade de proteínas disponíveis no rúmen em relação às quantidades de carboidratos resulta em altos níveis de nitrogênio uréico no leite (RAJALA-SCHULTS et al. 2001). No presente trabalho, observou-se diferença ($p < 0,01$) entre as raças para esse parâmetro, sendo o teor de NUL superior na raça Holandesa. Isto pode ser explicado devido ao maior consumo de matéria seca destes animais em relação às mestiças, o que leva a um aumento na ingestão de proteína proveniente do concentrado, promovendo maior aporte de nitrogênio no rúmen e, portanto, aumento de NUL. As variações nos níveis de NUL também podem ser indicativos de falhas no manejo, uma vez que os animais foram alimentados coletivamente, podendo haver competição durante a alimentação. Apesar da diferença, os níveis de ureia estão dentro dos padrões normais.

Para contagem de células somáticas (CCS) não se obteve diferença ($p > 0,05$) entre as raças. A principal causa no aumento da CCS é a presença de microrganismos patogênicos que causam a inflamação da glândula mamária, podendo ser influenciada por fatores como idade do animal, estágio de lactação e estação do ano (FONSECA e SANTOS, 2000).

O percentual de casos de LINA foi maior nos animais mestiços (59,42%) comparados à raça Holandesa (21,66%) (tabela 3). Entre os fatores predisponentes à ocorrência de LINA está o efeito da raça. Devido à maior concentração de sólidos e íons no leite, animais da raça Jersey apresentam maior propensão à instabilidade do leite, ou seja, maior susceptibilidade à ocorrência de LINA. Desta forma, o maior percentual de casos de LINA nos animais mestiços pode estar relacionado com a presença da raça Jersey na composição racial.

Avaliando o estágio de lactação das raças e a ocorrência de LINA (Tabela 4), verificou-se que, devido a composição do leite das vacas mestiças Jersey em relação ao alelo da β -Lactoglobulina/ κ -caseína, este apresenta maior propensão a ocorrência de LINA.

Tabela 4 - Percentual de casos de LINA em função da raça e do Estádio de lactação

Estádio de Lactação	Raça	Ocorrência de LINA (%)
Inicial	Holandesa	9,09
0 – 100 dias	Mestiça	12,50
Intermediário	Holandesa	0
100 – 150 dias	Mestiça	25,00
Final	Holandesa	23,52
>150 dias	Mestiça	27,02

Estádio inicial de lactação (parto até 100 dias de lactação): 4 vacas da raça Holandesa; 1 vaca Mestiça; Estádio intermediário (100 a 150 dias de lactação): nenhuma vaca da raça Holandesa; 2 vacas Mestiças; Estádio final (de 150 dias de lactação até secagem): 12 vacas da raça Holandesa; 10 vacas Mestiças

As vacas mestiças apresentaram maior percentual de LINA durante o estágio inicial (12,50%) e no estágio final e lactação (27,02%), comparado com as vacas Holandesas. Segundo Silva e Almeida (1998), outras variáveis relacionadas ao manejo atuam sobre o leite, modificando seus constituintes que promovem desequilíbrios, prejudicando a estabilidade térmica do leite. São citados: período de lactação, alimentação deficiente e saúde animal (mastite).

Durante a lactação, os teores de lactose e potássio tendem a decrescer continuamente, tendo seu pico no início e seu mais baixo teor no final. Cloreto e Sódio comportam-se inversamente, partindo de níveis baixos e sofrendo aumentos durante toda a lactação, apresentando maiores teores no final da lactação. Segundo BARROS (2002), tanto no início quanto no final de lactação observa-se aumento na concentração de proteínas no leite, acarretando maior formação de complexo β -Lactoglobulina/ κ -caseína e que as concentrações de cálcio e fósforo seguem o mesmo perfil de distribuição durante a lactação. Nas fases inicial e final de lactação, há aumento do nível de cálcio iônico, o que interfere de forma decisiva na estabilidade do leite. Desta forma, espera-se observar maior ocorrência de LINA nestas fases. No presente trabalho, verificou-se maior percentual de casos de LINA na fase final da lactação.

Outro fator importante que pode ser causa do aparecimento de LINA são as alterações digestivas e metabólicas que podem estar relacionadas com a diminuição da estabilidade do leite, possivelmente por causa da acidose metabólica acompanhada de acidose ruminal (PONCE e HERNANDES, 2005).

A indústria não dispõe de outros testes rápidos, de baixo custo e fácil acesso econômico que permita identificar o leite ideal para o processamento térmico. Uma vez que a qualidade do leite que é recebido é bastante variável, o leite precisa de métodos que apresentem maior confiabilidade, de modo que venham evitar o descarte desnecessário, sendo propício para o consumo humano e para o processamento industrial. Baseado nisso, rebanhos bem manejados, com dietas balanceadas adequadamente, animais livres de doenças, com conforto térmico, higiene e tratados de forma que o bem-estar animal seja atendido, com redução de variação quanto aos estágios de lactação, apresentam estabilidade térmica e possuem características ideais para a indústria (FISCHER et al., 2012b). Por outro lado, o produtor também irá se beneficiar, pois não haverá descarte do leite produzido.

4. CONCLUSÃO

As características físico-químicas do leite apresentam variabilidade em função da raça.

Vacas mestiças com composição racial de Jersey apresentam maior propensão à casos de LINA que animais da raça Holandesa.

A fase final da lactação mostra-se mais propensa à ocorrência de LINA em função das alterações na composição química do leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismos de vacas**. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, 2002. p. 44-57

BARROS, L. *et al.* Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Veterinary Practice**, v. 9, p. 315, 1999. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=d47ff45a-df3f-4275-810d-aa08b1c2b32b>. Acesso em: 12 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77/2018, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União, 30 nov. 2018. Seção 1, p.10.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Revista Ciência Animal**, Campus Rio Verde, p.71-80, dez. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/xmlui/bitstream/handle/ri/12468/Artigo%20Rafaella%20Belchior%20Brasil%20-%202015.pdf?sequence=5&isAllowed=y>>. Acesso em: 2 maio 2019.

FISCHER, V. et al. Leite Instável Não Ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 13, n. 3, p. 838-849, 2012.

FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T. et al. Lina: leite instável não ácido: mitos, fatos e consequências sobre os sistemas de produção de leite. In: **SUL LEITE – Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**, 5. SANTOS, G.T.; et al. (Eds). Editora: Nova Stapha: Maringá. 2012. P.111-130.b

FONSECA, L. F. L; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. 1. ed. São Paulo: **Lemos editorial**, p.161. 2000

GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. O leite como indicador metabólico-nutricional em vacas. **A Hora Veterinária**, v.22, p.36-38, 2003

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v.48, p.273-284, 1981.

LOPES, L. C., Composição e Características Físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na Região de Casa Branca, Estado de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP. Dissertação de Mestrado. Pirassununga – 2008.

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

MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo – RS: Editora Universitária, 2004, p. 11-37

OLIVEIRA, C.A.F; FONSECA, L.F.L e GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**. v. 13. n. 62. p. 10-16. 1999.

PINNA, N. W.; FAJARDO, R. S. L; Leite com Qualidade. **Revista, Conselho Federal de Medicina Veterinária**. n. 21; p 47-52; 2000.

PONCE, P. C. & HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações e alterações na glândula mamária. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2001.

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.

RAJALA-SCHULTS, P. J. *et al.* **Association between mil urea nitrogen and fertility in ohio dairy cows. Journal of dairy science**, V.84, n.2, p.482-491, 2001.

RIBEIRO, M.E.R.; KROLOW, A.C.R.; BARBOSA, R.S.; et al. Ensaios preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: **9º Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Goiânia-GO: Gráfica e Editora Talento, 2006.

ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; PETITCLERC, D. Effect of a differential allelic expression of kappa-casein gene on ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.145-149, 2001.

SHAMAY, A. et al. Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1250–1258, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12741550/#:~:text=We%20conclude%20that%20casein%20hydrolyzates,involution%20induced%20at%20drying%20Doff>. Acesso em: 10 abr. 2021.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade Térmica do Leite. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, 53 v.304 p. 157 – 163,1998

SOUZA, H. P. M. *et al.* Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) na região Norte do Mato Grosso. Rev. Inst. **Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 1, p. 38-42, jan/mar, 2016.

STUMPF, M. T. et al. Mammary gland cell's tight junction permeability from dairy cows producing stable or unstable milk in the ethanol test. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 11, p. 1981–1983, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32691150/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. DE. Prevenção, Controle E Tratamento Das Mastites Bovinas – Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 7, 2008. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YFbjMNRGCotOL73_2013-5-28-15-25-40.pdf. Acesso em: 08 jan. 2021.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4ª Ed. Santa Maria: Ed. UFSM. 2010. 195P.

VELLOSO, C. R V. No~6es basicas da acidez In: BRITO, J.RF.; DIAS, J.C. (Ed.) **A qualidade do leite**. Embrapa, Sao Paulo: Tortuga, 1998. p. 91-98.

WERNCKE, D. et al. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.l], v. 68, n. 2, p. 506- 516, 2016.

ZANELA, M. B. et al. Leite instável não ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 5, p. 835-840, 2006.

ZANELA, M. B. et al. Lina: passado, presente e futuro. In: PRADIEÉ, J; PEGORARO, L. M. C; DERETI, R. M. **Evolução da pecuária leiteira**, 1ª edição, Brasília: Embrapa Clima Temperado, 2017. p. 27-30.