UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

VIVIANE RIBEIRO PINHEIRO COELHO

**Efeitos da contagem de células somáticas sobre a
qualidade do leite semidesnatado e creme de leite
pasteurizados**

Pirassununga
2009

VIVIANE RIBEIRO PINHEIRO COELHO

**Efeitos da contagem de células somáticas sobre a
qualidade do leite semidesnatado e creme de leite
pasteurizados**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Pirassununga
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos da Universidade de São Paulo

C672e	<p>Coelho, Viviane Ribeiro Pinheiro</p> <p>Efeitos da contagem de células somáticas sobre a qualidade do leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados / Viviane Ribeiro Pinheiro Coelho. -- Pirassununga, 2009.</p> <p>90 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.</p> <p>1. Qualidade do leite 2. CCS 3. Leite semidesnatado 4. Creme de leite 5. Frações protéicas 6. Perfil de ácidos graxos. I. Título.</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

Ao querido amigo Daniel Augusto Cavalcante,
pelo auxílio, incentivo e atenção, em todos os momentos.

Aos amores da minha vida: meus pais, Antonio e Diméia,
minha irmã Claudia e sobrinho Murillo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação, incentivo e confiança.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

À Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga (FAYS).

Ao Prof. Dr. Rodrigo Petrus e Profa. Dra Christianne Elisabete da Costa Rodrigues.

À Roice e Keila, técnicas do LMMA e LES.

Aos funcionários do Laticínio da FZEA - USP.

Aos funcionários do Laticínio, da Ordenha e da Seção Comercial da FAYS.

Às colegas de Pós Graduação

À estagiária do LMMA, Marcela.

Ao pessoal da Biblioteca e do setor de computação da FZEA - USP.

Aos alunos de iniciação científica que apoiaram a realização do trabalho.

E a todos aqueles que, de qualquer maneira, tenham contribuído para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

COELHO, V.R.P. **Efeitos da contagem de células somáticas sobre a qualidade do leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.** 2009. 90 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos níveis de contagem de células somáticas (CCS) sobre as características físico-químicas e microbiológicas do leite semidesnatado e do creme de leite pasteurizados, ao longo de 28 e 30 dias de estocagem sob refrigeração. As frações protéicas do leite semidesnatado e o perfil de ácidos graxos do creme de leite pasteurizados foram pesquisados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 e 1, 10, 20 e 30 dias após a produção de cada produto. Foram definidos três grupos experimentais com baixa ($< 100.000 \text{ cél.mL}^{-1}$), intermediária ($400.000 \text{ a } 500.000 \text{ cél.mL}^{-1}$) e alta ($>750.000 \text{ cél.mL}^{-1}$) CCS. O leite utilizado para compor cada grupo, em quatro repetições, foi coletado na granja leiteira da Fazenda da Aeronáutica, na cidade de Pirassununga-SP. O leite *in natura* de cada grupo foi submetido a desnate para obtenção do creme e do leite semidesnatado, tratados termicamente por pasteurização lenta e rápida, nesta sequência, seguido do envase asséptico em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD). No leite *in natura*, o percentual de gordura foi menor ($P<0,05$) no grupo com baixa CCS em relação aos demais grupos. Observou-se, ainda para o leite *in natura*, maior teor de proteínas (3,42%) no grupo de alta CCS. Para as frações protéicas do leite semidesnatado, não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$), com exceção da β -caseína que apresentou maior concentração nos grupos de baixa e alta CCS ($P<0,05$). No grupo de CCS intermediária, o leite semidesnatado apresentou 8,98, 10,17 e 6,14 mg.mL^{-1} das frações α -caseína, β -caseína e κ -caseína, respectivamente. A participação da α_{s2} -caseína, fração protéica verificada em menores proporções neste estudo, foi de 9,89; 10,59 e 14,97% em relação ao total de caseína, nos grupos de baixa, intermediária e alta CCS. Houve predominância dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e mirístico (C14:0), em todos os grupos de contagem de células somáticas e nos tempos utilizados para avaliação do creme de leite. No entanto, a concentração de ácido oléico (C18:1) foi menor nos cremes com CCS intermediária e alta ($P<0,05$), em relação ao grupo de baixa CCS. Os ácidos saturados apresentaram variação de 53,9 a 58,1% em relação aos insaturados. Os ácidos de cadeia curta estiveram presentes no creme de leite em aproximadamente 8,15%, enquanto os de cadeia média e longa participam com cerca de 47 e 44%, respectivamente. A CCS influenciou na concentração de β -caseína do leite semidesnatado, ao passo que, no creme de leite, a diminuição do teor de ácido oléico associada ao aumento da CCS indicou maior atividade lipolítica sobre os ácidos graxos de cadeia longa durante o período de 30 dias de estocagem.

Palavras-chave: qualidade do leite, CCS, leite semidesnatado, creme de leite, frações protéicas, perfil de ácidos graxos.

ABSTRACT

COELHO, V.R.P. **Effects of somatic cell count on the quality of pasteurized semi-skimmed and milk cream.** 2009. 90 p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

The aim of this study was to evaluate the effects of somatic cell counts (SCC) levels on the physico-chemical and microbiological characteristics of both pasteurized semi-skimmed milk and milk cream, over 28 and 30 days of refrigerated storage. The semi-skimmed milk protein fractions were checked on days 1, 7, 14, 21 and 28, whereas the pasteurized milk cream fatty acids profile was checked on days 1, 10, 20 and 30 after each production. Three experimental groups were defined with low ($<100.000 \text{ cel.mL}^{-1}$), intermediate (400.000 to $500.000 \text{ cel.mL}^{-1}$) and high ($>750.000 \text{ cel.mL}^{-1}$) SCC. The milk used in each group, with four repetitions, was collected in the Air Force dairy farm in Pirassununga, São Paulo state, Brazil. The raw milk in each group was skimmed to obtain the cream, thermally treated by slow pasteurization, and the semi-skimmed milk (fast pasteurization), followed by aseptic bottling in high density polyethylene bottles. In the raw milk, significant differences were verified by the Tukey test ($P<0,05$) for the parameter fat in the level of low SCC in relation to the other groups. It was also observed for the raw milk a higher rate of proteins (3,42%) in the group of high SCC, while the low count group presented 2,83% protein. For the protein fractions in the pasteurized semi-skimmed milk, with an exception of the β -casein which presented statistical difference for the 5% significance level between the low and high SCC groups, no other significant differences were observed. In the intermediate SCC group the pasteurized semi-skimmed milk presented $8,98 \text{ mg.mL}^{-1}$ for α -casein, $10,17 \text{ mg.mL}^{-1}$ for β -casein and $6,14 \text{ mg.mL}^{-1}$ for κ -casein fractions. The α_{s2} -casein was the protein fraction with the lowest proportions in this study, with 9,89% (low SCC), 10,59% (intermediate SCC) and 14,97% (high SCC) in relation to the casein total. There was predominance of palmitic acids (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1) and myristic (C14:0) in all somatic cell counts groups and the times used to evaluate the pasteurized milk cream. However, lower levels of oleic acid (C18:1) were observed in creams with high and intermediate SCC, when compared with the lower SCC cream. The saturated acids presented variation of 53,9 to 58,1% in relation to the unsaturated ones. The short chain acids were found in the pasteurized milk cream with about 8,15%, while the ones with medium and long chains were 47% and 44% respectively. The SCC influenced the concentration of β -casein in semi-skimmed milk, while the decrease in oleic acid as observed in the cream samples containing higher SCC indicated higher lipolytic activity on the long-chain fatty acid in the product during 30 days of storage.

Key-words: milk quality, SCC, semi-skimmed milk, milk cream, protein fractions, fatty acids profile

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma esquemático de obtenção de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.....	40
Figura 2	Cromatogramas das frações de caseína do leite semidesnatado durante o armazenamento por 28 dias, para o grupo de alta CCS.....	60
Figura 3	Evolução do percentual de ácido oléico, em g/100g, no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem.....	68
Figura 4	Representação gráfica do perfil de ácidos graxos no creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	70
Figura 5	Representação gráfica do perfil de ácidos graxos predominantes no creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	71
Figura 6	Cromatogramas exibindo o perfil de AG obtidos a partir de CS de amostras de creme de leite com 30 dias de fabricação dos grupos de baixa, intermediária e alta CCS.....	73
Figura 7	Evolução da relação entre ácidos graxos saturados e insaturados no creme de leite durante 30 dias	75
Figura 8	Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de CCS baixa no creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	77
Figura 9	Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de intermediária CCS no creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	78
Figura 10	Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de alta CCS no creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais ácidos graxos livres da gordura láctea.....	26
Tabela 2	Composição físico-química do leite <i>in natura</i> utilizado na fabricação de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.....	47
Tabela 3	Análise microbiológica do leite <i>in natura</i> utilizado na fabricação de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.....	50
Tabela 4	Resultados de pH do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem.....	51
Tabela 5	Resultados de acidez do leite semidesnatado durante 28 dias de estocagem.....	52
Tabela 6	Resultados de proteína do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem.....	52
Tabela 7	Resultados de gordura do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem.....	53
Tabela 8	Resultados de sólidos totais do leite semidesnatado durante 28 dias de estocagem.....	53
Tabela 9	Resultados de sólidos não gordurosos do leite semidesnatado durante 28 dias de estocagem.....	54
Tabela 10	Microrganismos mesófilos no leite semidesnatado durante 28 de estocagem.....	54
Tabela 11	Microrganismos psicrótrópicos no leite semidesnatado durante 28 de estocagem.....	55
Tabela 12	Resultados de frações de caseína no leite semidesnatado durante 28 dias de estocagem.....	56
Tabela 13	Resultados de β -caseína no leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem.....	58
Tabela 14	Porcentagem das frações de caseína, no leite semidesnatado em relação ao total da proteína, durante 28 dias de estocagem.....	59
Tabela 15	Resultados de pH do creme de leite durante 30 dias de estocagem.....	62

Tabela 16	Resultados de acidez do creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem.....	62
Tabela 17	Resultados de gordura do creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem.....	63
Tabela 18	Resultados de mesófilos no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração.....	64
Tabela 19	Resultados de psicotróficos no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração.....	64
Tabela 20	Resultados de coliformes 30 ⁰ C no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração.....	65
Tabela 21	Resultados de coliformes 45 ⁰ C no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração.....	65
Tabela 22	Resultados de perfil de ácidos graxos do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem.....	66
Tabela 23	Resultados de índice de iodo e da relação entre ácidos graxos do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem.....	69
Tabela 24	Resultados da relação entre ácidos graxos saturados e insaturados do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
C	Caseína
CCS	Contagem de células somáticas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CG	Cromatografia gasosa
CS	Células somáticas
DAG	Diacilgliceróis
g	Grama
HMF	Hidroximetilfurfural
IC	Índice crioscópico
Ig	Imunoglobulina
kg	Quilograma
L	Litro
LES	Laboratório de Engenharia de Separações
LLP	Lipase Lipoproteica
LMMA	Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos
log	Logarítmo
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
MAG	Monoacilgliceróis
NMP	Número mais provável
NT	Nitrogênio total
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
s	Segundos
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kapa
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
P	Probabilidade
μ	Micro
=	Igual
>	Maior
<	Menor
$\pm$	Mais ou menos
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Caracterização da Matéria Prima.....	18
2.2 Creme de Leite.....	22
2.3 Qualidade do Leite.....	27
2.4 Considerações sobre mastite.....	30
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Definição dos Grupos Experimentais e Repetições.....	37
4.2 Origem da Matéria-Prima.....	37
4.3 Amostragem e Avaliação do Leite <i>in natura</i>	37
4.4 Processamento do Leite Semidesnatado e do Creme de Leite.....	39
4.5 Avaliação Físico-Química e Microbiológica do Leite Semidesnatado Pasteurizado.....	41
4.6 Avaliação das frações da caseína em Leite Semi Desnatado Pasteurizado.....	42
4.7 Avaliação Físico-Química e Microbiológica do Creme de Leite Pasteurizado.....	44
4.8 Avaliação do Perfil de Ácidos Graxos em Creme de Leite Pasteurizado.....	44
4.9 Análise dos Resultados.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Avaliação do Leite <i>in natura</i>	46
5.1.1 Avaliação Físico-Química.....	46
5.1.2 Avaliação Microbiológica.....	49
5.2 Avaliação do Leite Semi Desnatado Pasteurizado.....	51

5.2.1 Avaliação Físico-Química.....	51
5.2.2 Avaliação Microbiológica.....	54
5.2.3 Frações da Caseína em Leite Semidesnatado.....	56
5.3 Avaliação do Creme de Leite Pasteurizado.....	61
5.3.1 Avaliação Físico-Química.....	61
5.3.2 Avaliação Microbiológica.....	63
5.3.3 Perfil de Ácidos Graxos.....	66
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria do leite e seus derivados desempenham um papel relevante no suprimento de alimentos de alto valor nutricional e na geração de empregos e renda para a população, envolvendo vários setores da economia. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2009), o leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária nacional, ficando à frente de produtos tradicionais como o café beneficiado e o arroz.

Carvalho et al. (2006) relataram que a produção de leite no Brasil apresenta um crescimento contínuo e acima da média mundial. Projeções indicam que a produção mundial deste produto crescerá aproximadamente 16% ao ano, entre 2005 e 2015. No mesmo período, estima-se que a produção brasileira expanda 22% ao ano. Os autores concluíram que melhorias na distribuição de renda, em paralelo ao *marketing* institucional, podem contribuir para o aumento do consumo e sustentação do crescimento da oferta com melhor rentabilidade para todos os envolvidos.

Sob o aspecto de volume de leite produzido, o Brasil ocupa atualmente o sexto lugar no *ranking* dos países produtores. No entanto, ocupa o vigésimo primeiro lugar em produtividade, com média de 1.224 kg/vaca/ano. Do total dos 27 bilhões de litros produzidos em 2008, apenas 19 bilhões foram recebidos sob inspeção (EMBRAPA, 2009). Este dado evidencia a informalidade e justifica, em parte, a baixa produtividade e qualidade do leite brasileiro, além de apontar para a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa no setor.

Um dos principais fatores envolvidos na diminuição da qualidade do leite destinado às indústrias de laticínios e ao consumo humano é a mastite, importante doença que afeta

rebanhos leiteiros, caracterizada pela inflamação da glândula mamária de fêmeas lactantes, acompanhada pelo aumento da liberação de células somáticas (CS) no leite. Com o aumento da contagem de células somáticas (CCS), a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos são influenciados negativamente (KITCHEN, 1981).

A relação direta entre a ocorrência de mastite e a perda das características do leite justifica o interesse por estudos que avaliem o impacto da CCS sobre a qualidade do produto e seus derivados.

A CCS tem sido amplamente utilizada como indicador da sanidade da glândula mamária e da qualidade do leite em diversos países (O'BRIEN et al., 2001). Atualmente, nos Estados Unidos o limite máximo permitido é de 750.000 cél.mL⁻¹. O Canadá adota o valor de 500.000 cél.mL⁻¹, enquanto que países da União Européia, Nova Zelândia, Austrália e Japão permitem uma contagem máxima de 400.000 cél.mL⁻¹ (PHILPOT, 2002; PHILPOT e NICKERSON, 2002). Paralelamente a estes limites de tolerância, alguns países, dentre eles o Brasil, têm instituído o sistema de pagamento do leite ao produtor por qualidade, de acordo com parâmetros de composição físico-química e condições higiênico-sanitárias de produção.

A Legislação Brasileira que, até o ano de 2001, contemplava como critérios de qualidade e aceitação apenas as características físico-químicas e de contagem global de microrganismos mesófilos (MAPA, 1980), a partir de setembro de 2002, com a instituição da Instrução Normativa N° 51, passou a utilizar também a CCS.

Esta Instrução Normativa estabeleceu limites máximos legais que devem diminuir gradativamente ao longo de um período

de sete anos e de acordo com as regiões do país até atingirem, no ano de 2012, o patamar de 400.000 cél.mL⁻¹, praticado na União Européia. A CCS máxima de 750.000 cél.mL⁻¹ para o leite *in natura* refrigerado está em vigor desde 01/07/2008 até 01/07/2011 nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Para as regiões norte e nordeste do país, vigorará durante o período de 01/07/2010 a 01/07/2012.

Diante do exposto, a proposição deste trabalho foi a de contribuir com o esclarecimento sobre os efeitos da CCS sobre a qualidade de leite semidesnatado e de creme de leite pasteurizados ao longo de 28 e 30 dias de estocagem sob refrigeração, respectivamente. Muito embora estes produtos sejam amplamente consumidos no Brasil e no mundo, a literatura disponível oferece poucas informações sobre este enfoque nestes produtos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Caracterização da matéria-prima

O leite é um alimento de elevado valor biológico, reconhecido por fornecer micro e macronutrientes essenciais para o adequado crescimento e desenvolvimento do ser humano em suas diferentes fases de vida, sendo largamente consumido pela população (DAHMER, 2006; FERNANDES, 2007; MORELLI, 2008). Além de suas propriedades nutricionais, o leite oferece elementos anticarcinogênicos, presentes em sua gordura, como o ácido linoléico conjugado, esfingomielina, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D (MÜLLER, 2002).

No entanto, no contexto dos alimentos saudáveis e funcionais, a porcentagem de gordura e o perfil dos ácidos graxos do leite e produtos derivados, passaram a assumir uma posição de destaque. A tendência atual é de demanda crescente por alimentos com baixos teores de gordura saturada, que promovam e garantam a saúde dos consumidores, sem que haja comprometimento de atributos de qualidade, sabor e vida de prateleira (RODRIGUES, 2002).

Entende-se por leite natural, íntegro, não adulterado e sem colostro, o produto da glândula mamária de mamíferos, oriundo de ordenha completa e ininterrupta de fêmeas sadias e bem alimentadas (MORAES, 2005; DAHMER, 2006). Na visão biológica, o leite é definido por Bauman (2006) como uma vasta gama de nutrientes, incluindo proteínas, carboidratos, partículas de gordura, água e íons, sintetizados e secretados pela glândula mamária. Pela ótica da química, Walstra et al. (2006) definem leite como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou

descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura.

Segundo o Ministério da Agricultura, entende-se por leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, sendo que o leite de outras espécies deve denominar-se segundo a qual proceda (MAPA, 2002).

A produção e a composição físico-química do leite variam segundo diversos fatores como individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, número de lactações, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos, patológicos, persistência de lactação, tamanho do animal, porção da ordenha e intervalo entre ordenhas. Paralelamente a estas, existem variações da composição do leite relacionadas à espécie produtora. O leite bovino possui teor de gordura semelhante ao do leite humano apresentando uma boa assimilação e representando um importante componente nutricional para o mesmo (REIS et al., 2007).

Segundo Walstra et al. (2006), a composição química do leite determina o seu valor nutricional, seu sabor e aroma e apresenta em média 87% de água, 9% de sólidos não gordurosos (3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,7% de cinzas) e 4,0% de gordura. Zanela et al. (2006), ao avaliarem a qualidade do leite em sistemas de produção da região sul do Brasil obtiveram uma composição média para sistemas especializados de 3,6% de gordura, 3,23% de proteína bruta e 4,49% de lactose.

As proteínas representam entre 3 e 4% dos sólidos encontrados no leite. Sua porcentagem varia, dentre outros fatores, com a raça do animal produtor e é proporcional à quantidade de gordura presente. Isso significa que quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a de proteína. As

proteínas do leite são divididas basicamente entre proteínas do soro e caseína. A caseína é sintetizada pelas células secretoras da glândula mamária e encontra-se no leite na forma de agrupamentos com átomos de cálcio, fósforo e outros sais, denominados micelas. Assim como os glóbulos de gordura, a caseína é responsável por grande parte das propriedades relativas à consistência e à cor dos produtos lácteos. Diferente das proteínas do soro, a caseína não é facilmente desestabilizada pelo calor, permanecendo bastante estável durante a pasteurização. Entretanto, quando ocorrem mudanças na acidez do leite, há rompimento de sua estrutura, o que faz com que precipite e forme coágulos (WALSTRA et al., 2001).

A caseína bovina pode ser classificada em quatro tipos de proteína com diferentes propriedades: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína, perfazendo, respectivamente, 38%, 10%, 34% e 15% da caseína total. Da mesma forma, a fração de proteína sérica do leite de bovinos, também contém quatro principais proteínas: β -lactoglobulina (50%), α -lactalbumina (20%), soroalbumina (10%) e imunoglobulinas (10%), como IgG₁ (principalmente), IgG₂, IgA e IgM (FOX et al., 2000).

A gordura é o componente de maior oscilação no leite, podendo variar de 2,2 a 4,0% dos sólidos totais. Esta percentagem é fortemente influenciada pela genética e fatores ambientais, a exemplo do manejo nutricional, que possui grande importância no percentual e na composição da gordura do leite (CORASSIN, 2004; KENNELLY & GLIM, 1998).

Ambas, gordura e caseína têm importância fundamental para a fabricação de derivados lácteos (AIE, 2009; WALSTRA, 2006).

Devido ao seu elevado teor de nutrientes, à disponibilidade de água e ao pH próximo da neutralidade, o leite constitui um substrato favorável ao desenvolvimento de microrganismos oriundos de processos fermentativos, o que é desejável para a indústria de laticínios. Em contrapartida, também favorece o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores, caso não haja um conjunto de ações preventivas ao longo da cadeia produtiva (DAHMER, 2006).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite (MAPA, 2002), leite pasteurizado é o leite fluido destinado ao consumo humano direto, na forma fluida, submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, seguido do resfriamento imediato em trocador de calor a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C. Seu envase deve ser realizado em circuito fechado, no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações. Imediatamente após a pasteurização o produto deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina, teste positivo para peroxidase e coliformes 30/35°C menor que 0,3 NMP.mL⁻¹. Adicionalmente, deve apresentar as especificações de produção, coleta e qualidade da matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e ter sido transportado a granel até o estabelecimento processador.

Quanto ao teor de gordura, o leite pasteurizado deve ser classificado como integral, padronizado, semidesnatado ou desnatado quando apresentar, na mesma sequência, teor original, 3%, de 0,6% a 2,9% e, no máximo 0,5% de gordura. A porcentagem de sólidos não gordurosos, a partir do padrão estabelecido para o leite integral, deve ser corrigido para os demais tipos de leite e, quanto às características físico-químicas e microbiológicas, todos devem atender aos mesmos padrões estabelecidos em legislação

(MAPA, 2002).

2.2 Creme de Leite

O creme de leite é a gordura do leite separada dos demais sólidos que constituem o extrato seco. Os distintos tipos de creme se fabricam tanto para a venda ao consumidor como para o uso industrial, com várias porcentagens de gordura, em função da destinação a ser-lhe dada. Sua viscosidade e textura, assim como a capacidade de formar espuma dependem, essencialmente, da quantidade de gordura presente em cada variação do produto (EARLY, 2000).

O creme pode ser obtido naturalmente após o repouso do leite e separação dos elementos que o compõem em função da diferença entre suas densidades. Na obtenção industrial este processo é acelerado e realizado pelo uso de centrífugas chamadas “separadoras” ou “desnatadeiras” (EARLY, 2000).

O cozinheiro francês Vatel é citado como o primeiro a ter utilizado o creme de leite, no século XVII, tendo dedicado ao produto o nome do local onde trabalhava, o castelo de *Chantilly*. No século XVIII, passou a ser utilizado na preparação de molhos sofisticados, em recheios, como acompanhamentos de carnes e aves, omeletes e sobremesas. No entanto, foi a partir do século XIX que se tornou mais conhecido.

A gordura láctea, uma das fontes mais caras de matéria graxa, se destaca entre os óleos comestíveis por seu agradável e característico *flavor*. Sua inclusão confere qualidade máxima aos produtos que a contenham em suas formulações sendo um ingrediente amplamente utilizado em muitas indústrias de alimentos. Variações na composição do leite e no conteúdo de

ácidos graxos da gordura exercem influência direta sobre as características dos produtos finais (FOX & McSWEENEY, 2006).

Os componentes do *flavor* da gordura láctea são originados a partir dos alimentos fornecidos às fêmeas produtoras e às transformações bioquímicas destes no rúmem dos animais, da hidrólise dos lipídeos em reações enzimáticas, oxidativas ou induzidas pelo calor, além daqueles que se originam de reações entre as proteínas e carboidratos do lactosoro. Alterações no *flavor* podem ocorrer por vários mecanismos como oxidação, lipólise e hidrólise térmica dos precursores. Durante a manipulação e a estocagem a oxidação é o mecanismo que pode afetar a qualidade do produto de maior importância (ESCOBAR, 2002).

O processo de oxidação reduz o valor nutricional e a vida de prateleira de produtos lácteos e pode acontecer espontaneamente ou ser catalisada pela presença de metais e exposição à luz (VAN-AARDT et al. 2005)

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite (MAPA, 1996), o mesmo é definido como o produto lácteo relativamente rico em gordura, extraído do leite de vaca por procedimento tecnológico adequado, que apresenta a forma de uma emulsão de gordura em água.

Quanto ao tratamento térmico ao qual deve ser submetido para consumo humano deve ser denominado como creme pasteurizado, esterilizado ou tratado a ultra alta temperatura (UAT), homogeneizado ou não (MAPA, 1996).

Baseado no teor de gordura é classificado como creme de alto teor de gordura, creme de leite ou apenas creme e creme de baixo teor de gordura quando apresentarem, respectivamente, 50%, de 20% a 49,9% e de 10 a 19,9% deste componente. O

creme cujo teor de matéria gorda seja superior a 40% pode ser designado ainda como “duplo creme” e, a partir de 35% poderá opcionalmente designar-se “creme para bater”. Além do teor de gordura o produto deverá apresentar acidez máxima de 0,20% e, atender aos padrões microbiológicos previstos em legislação (MAPA, 1996).

A composição nutricional média do creme é de 30 a 40% de gordura, 59% de água e 6% de elementos não graxos (proteínas, lactose e minerais). É um produto alimentício rico em cálcio e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (KJAERBYE, 1996).

Em sua fabricação é permitido o uso, como ingredientes opcionais, de no máximo 2% de sólidos lácteos não gordurosos, 0,1% de caseinatos ou, 0,1% de soro lácteo em pó. Para o produto pasteurizado, não é permitido o uso de aditivo ou coadjuvante. No esterilizado e UAT, poderão ser utilizados agentes espessantes e/ou estabilizantes em quantidades não superiores a 0,5% no produto final e sais estabilizantes em quantidade máxima de 0,2% (MAPA, 1996)

Sob o aspecto tecnológico, o alto teor de gordura presente no creme de leite protege os microrganismos frente à ação do calor, motivo pelo qual sua pasteurização deve ocorrer em condições mais severas do que aquelas recomendadas para o leite. Assim, são recomendados os binômios de tempo/temperatura de 75°C por 15 segundos para a pasteurização rápida do creme com teor de gordura entre 10 a 20% e de 80°C por 15 segundos para creme com mais que 20% de teor de gordura. Alternativamente, pode ser utilizada a pasteurização lenta a 65°C por 30 minutos para o produto com qualquer teor de gordura (WALSTRA, 2001).

A maioria das células vegetativas bacterianas, leveduras e bolores existentes no leite e no creme são destruídos pela pasteurização. No entanto, as bactérias termodúricas resistem ao tratamento térmico e, entre elas, encontram-se bactérias lácticas importantes como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactococcus lactis*. Algumas espécies de *Micrococcus* e *Enterococcus* também sobrevivem à pasteurização. O leite e o creme pasteurizados podem conter bactérias termodúricas esporuladas, especialmente espécies de *Bacillus* aeróbios e aeróbios facultativos, proteolíticos ou produtores de gás. Já os principais microrganismos anaeróbios identificados no leite e creme pasteurizados pertencem ao gênero *Clostridium* e, entre eles, os mais comuns são o *C. butyricum* e *C. sporogenes* (EARLY, 1998)

As bactérias lácticas termorresistentes podem alterar os produtos lácteos pasteurizados se as condições forem favoráveis. Quando a temperatura não favorece o desenvolvimento das bactérias lácticas, os coliformes, que chegam ao leite como contaminação pós pasteurização, podem produzir hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico. Os gêneros de *Clostridium* e *Bacillus* alteram facilmente os produtos, os primeiros produzindo ácido butírico, hidrogênio e dióxido de carbono e os segundos produzindo ácido láctico (FORSYTE, 2002).

O leite e o creme podem, também, sofrer hidrólise da gordura em glicerol e ácidos graxos como consequência à ação de lipases endógenas e de origem microbiana. A oxidação dos ácidos graxos, favorecida por metais, luz e algumas bactérias, produz aldeídos, cetonas e ácidos, culminando com a formação de aromas e sabores estranhos. O desenvolvimento simultâneo de lipólise hidrolítica e de oxidação são responsáveis pelo desenvolvimento

de fortes aromas de ranço e oxidado no leite e, em especial, no creme (KJAERBYE, 1996).

A gordura do leite contém vários lipídeos, mas predominantemente, 98%, são triacilgliceróis (TAG). Os outros são os diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), fosfolipídeos, ácidos graxos livres (AGL) e esteróis. A gordura láctea possui mais de 250 tipos de ácidos graxos, mas, 15 destes, representam 95% do total. A Tabela 1 apresenta os principais ácidos graxos livres presentes na gordura do leite. Em comparação aos óleos vegetais, a gordura láctea (de vacas, ovelhas e cabras) apresenta altos níveis de ácidos graxos livres voláteis de cadeia curta, cujo principal impacto é observado sobre o *flavor* conferido aos produtos derivados (FOX, 2006).

Tabela 1 - Principais ácidos graxos livres da gordura láctea

Ácidos Graxos	Denominação	% p/p
C4:0	Butírico (Ácido Butanóico)	4,2
C6:0	Capróico (Ácido Hexanóico)	2,9
C8:0	Caprílico (Ácido Octanóico)	1,5
C10:0	Cáprico (Ácido Decanóico)	3,7
C12:0	Láurico (Ácido Dodecanóico)	4,4
C14:0	Mirístico (Ácido Tetradecanóico)	12,3
C16:0	Palmítico (Ácido Hexadecanóico)	31,3
C18:0	Esteárico (Ácido Octadecanóico)	3,5
C18:1	Oléico (Ácido cis-9-octadecanóico)	19,5
C18:2	Linoléico (Ácido cis-9, cis-12-octadecanóico)	1,8
C18:3	Linolênico (Ácido cis-9, cis-12, cis-15-octadecanóico)	1,2

Fonte: Adaptado de FOX, 2006.

Os ácidos graxos que compõem os TAG podem ser sintetizados pelas células epiteliais da glândula mamária ou ser originários do sangue. Os sintetizados pelas células epiteliais são, em sua maioria, ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (C4:0-C16:0) (CLEGG et al., 2001).

Modificação no perfil de ácidos graxos pode alterar várias propriedades físicas e químicas da gordura do leite, como firmeza, ponto de fusão, viscosidade, estabilidade oxidativa e *flavor*. O número de duplas ligações dos ácidos graxos influencia o ponto de fusão e a estabilidade oxidativa, enquanto a distribuição dos ácidos graxos nos TAG influencia o comportamento de cristalização, ponto de fusão e aspectos nutricionais (KAYLEGIAN & LINDSAY, 1995)

2.3.Qualidade do leite

A indústria laticinista atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura, e a qualidade do leite é uma das principais exigências, sendo um dos temas mais discutidos atualmente no cenário nacional de produção de leite.

A adoção de medidas de higiene adequadas na produção, armazenamento e transporte do leite podem prevenir a contaminação por microrganismos, inclusive os psicrotróficos, que representam um grave problema econômico para a indústria de laticínios (EARLY, 2000).

Os principais fatores citados por afetar diretamente a qualidade microbiológica do leite *in natura* são o ambiente em que a vaca fica alojada, a higiene durante o processo de ordenha, os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha e a sanidade da glândula mamária (GUERREIRO et al., 2005).

No Brasil, evidências de que o leite produzido e consumido não apresenta, em sua totalidade, a qualidade desejada, resultou no desenvolvimento de novas políticas de incentivo à produção leiteira, envolvendo os setores científicos e econômicos da área, em busca de alternativas para alterar esse panorama. Como fruto das novas políticas de desenvolvimento, iniciou-se, em 1996, a

elaboração do Programa Nacional de melhoria de Qualidade do Leite (PNQL) (NERO, 2005) e, em 1998, estabeleceu-se um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e modernização do setor no Brasil (BRASIL, 1998).

A versão definitiva das normas de produção leiteira foi publicada em 18 de Setembro de 2002, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa 51 (MAPA, 2002), que abrange os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, extinto desde 2007, do Leite Pasteurizado, do Leite *in natura* Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Refrigerado e seu Transporte a Granel.

Segundo Oliveira (2005), no leite proveniente de animais sadios e obtido em condições higiênicas adequadas, predominam os seguintes microrganismos: *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*, além de lactobacilos saprófitas do úbere e canais galactóforos. Do ponto de vista tecnológico, os microrganismos de maior importância são os que contaminam o leite durante e após a ordenha, entretanto, essa contaminação é variável, tanto qualitativa como quantitativamente, em função das condições de higiene existentes (ARCURI et al., 2006).

As principais fontes de contaminação do leite por microrganismos psicotróficos são a superfície do úbere, o equipamento de ordenha, ambiente e a água utilizada durante os processos. Embora os psicotróficos sejam destruídos pela pasteurização, eles têm capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes que mantêm sua atividade após o tratamento térmico (SANTOS & FONSECA, 2001).

O ambiente em que a vaca permanece alojada foi analisado por Guerreiro et al. (2005) como um dos principais fatores que afetam a contaminação microbiana do leite *in natura*. Portanto, a manutenção dos animais em ambientes higienizados, secos e confortáveis visa não somente à produção de leite com qualidade, como também minimizar os problemas relativos à mastite (inflamação da glândula mamária).

Santana et al. (2001) citaram latões e tanques de expansão como principais pontos de contaminação do leite por aeróbios mesófilos e psicrotróficos no processo de produção leiteira em Londrina, no Paraná. Sobre a eficiência da refrigeração no controle do crescimento destes microrganismos detectaram que, no leite refrigerado, o número de psicrotróficos superou o de mesófilos, mostrando que a contagem destes últimos pode subestimar a real quantidade de microrganismos presentes, sendo os psicrotróficos os indicadores ideais de contaminação neste produto. Como a refrigeração a 4°C não inibe o crescimento deste grupo de microrganismos, deve-se evitar sua incorporação ao leite durante a produção, havendo necessidade da associação de boas práticas em todo o processo produtivo.

A qualidade do leite está associada à carga microbiana inicial presente no produto e, quanto maior o número de contaminantes e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do mesmo. O uso de refrigeração reduz os riscos de deterioração do leite por atividade acidificante de bactérias mesófilas. Entretanto, pode ocasionar problemas tecnológicos associados à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas de bactérias psicrotróficas, que se multiplicam em temperaturas inferiores a 4°C, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. Grande parte destas enzimas são termorresistentes e estão relacionadas às perdas de qualidade e à redução da vida de

prateleira do leite UHT e de outros produtos lácteos (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006).

Quando se diz respeito a microrganismos patógenos, Jayarao et al. (2006) examinaram a presença destes em tanques de leite *in natura* a granel de fazendas familiares do estado norte-americano da Pensilvânia e constataram que 31,4% dos produtores desconheciam a possibilidade da presença de microrganismos causadores de doença nos seus tanques. Em 6% dos tanques detectaram a presença de *Salmonella spp.*, em 2,4% de *Escherichia coli*, em 2,8% de *Listeria monocytogenes* e em 1,2% detectou-se a presença de *Yersinia enterocolitica*.

Morelli (2008) avaliou a ocorrência de *Escherichia coli* em ambiente de produção de leite e obteve uma contagem de coliformes 45°C entre 0,3 e 21 NMP.mL⁻¹ em 36,3% das amostras de leite *in natura*, entre 0,3 e 110 NMP nas mãos dos ordenhadores, tetos e teteiras entre 0,3 e 24 NMP.mL⁻¹ e em utensílios e para a água, entre 0,03 e 11 NMP.mL⁻¹, o que reforça a premissa de que a implementação de medidas de higiene durante toda a cadeia produtiva do leite torna-se essencial para a obtenção de um produto de qualidade e que, principalmente, não ofereça riscos à saúde do consumidor.

2.4 Considerações sobre Mastite

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que afeta a produção leiteira em qualidade e quantidade e tem como características, alterações patológicas do tecido glandular, físicas, químicas e geralmente bacteriológicas do leite, acompanhada pelo aumento da CCS (BLOOD & RADOSTITS, 1991). Pode ocorrer como consequência de alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas, alergias ou, como ocorre mais frequentemente, associada à ação de microrganismos, sendo esta

última a mais importante sob o ponto de vista econômico e de saúde pública (COSTA, 1991).

O maior grupo de microrganismos causadores é o das bactérias (PHILPOT, 1984). Mais de 80 diferentes espécies já foram identificadas, sendo que as frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* sp., *Prototheca* sp., leveduras e bolores (HARMON, 1994).

As infecções da glândula mamária podem ser classificadas como mastite clínica ou subclínica. A forma subclínica é mais prevalente e responsável por até 45% de redução na produção de leite de animais acometidos. Os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite que provocam maiores CCS são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococos, enterococos, *Pseudomonas* sp., *Actinomyces pyogenes* e *Serratia* sp.. Microrganismos identificados como estafilococos coagulase negativos e *Corynebacterium bovis*, promovem inflamação moderada, com CCS de no máximo duas a três vezes superiores a dos quartos mamários sadios (HARMON, 1994).

As células somáticas (CS) estão presentes normalmente no leite e são constituídas por leucócitos, sobretudo neutrófilos, e células de descamação do epitélio secretor da glândula mamária (BIBALKE, 1984; NICKERSON, 1994). A distribuição das células em uma glândula sadia é de 60% de macrófagos, 25% de linfócitos e 15% de neutrófilos (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

Em um quarto mamário infectado, aproximadamente 99% de todas as células do leite são leucócitos que migram do sangue para o interior da glândula mamária durante o processo

inflamatório com o objetivo de combater os microrganismos causadores (MACHADO et al., 2000).

A CCS do leite de animais individuais ou de tanques é uma ferramenta valiosa, utilizada a mais de 30 anos na verificação do nível de mastite subclínica de rebanhos, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção de leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido nas propriedades e como auxiliar no estabelecimento de medidas de prevenção e controle da mastite (MÜLLER, 2002).

É, no entanto, um fenômeno dinâmico sujeito a variações significativas. O estágio de lactação, a idade da vaca, a estação do ano, o tamanho do rebanho, o nível de produção de leite e a presença de outras doenças são fatores que podem afetar a concentração de células somáticas no leite. Porém, o fator que exerce maior influência sobre o nível de CS no leite é a infecção intramamária. As vacas com mastite subclínica contribuem substancialmente para a presença de CS no leite do rebanho (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

Dependendo da severidade do processo inflamatório, a mastite além do aumento no número de células somáticas, determina alterações na composição do leite. De maneira geral causa redução nos teores de cálcio, lactose, caseína e gordura e aumento nos níveis de íons sódio e cloro, de proteínas séricas (KITCHEN, 1981; OLIVEIRA, FONSECA e GERMANO, 1999), plasmina e outras enzimas e, do pH (AULDIST & HUBBLE, 1998; MACHADO et al., 2000).

Devido às alterações na composição do leite, diversos efeitos podem ser observados na produção de derivados lácteos, entre os quais se destacam: menor rendimento industrial; diminuição do valor nutritivo dos alimentos lácteos; redução da

vida de prateleira, devido à ação de enzimas que contribuem para conferir sabores estranhos aos alimentos; e, devido a certos casos de mastite, menor qualidade microbiológica do produto final, resultante do aumento da contagem global de microrganismos (KITCHEN, 1981; OLIVEIRA, FONSECA e GERMANO, 1999).

A influência da CCS no leite *in natura* sobre a qualidade do leite fluido pasteurizado é causada pelo aumento nos níveis de proteases termoestáveis e lipases no leite de vacas com alta CCS (BARBANO & SANTOS, 2006).

Em estudo sobre o leite pasteurizado, Ma et al. (2000) constataram que o leite com maior CCS ($849.000 \text{ CS.mL}^{-1}$) comparado ao leite com menor CCS ($45.000 \text{ CS.mL}^{-1}$) foi mais suscetível à lipólise durante a estocagem sob refrigeração. A contínua lipólise no leite pasteurizado durante a estocagem refrigerada indicou que as lipases do leite resistem à pasteurização. Durante a estocagem, houve uma degradação mais extensa de caseína no leite com alta CCS do que naquele com baixa CCS. Os decrescentes níveis na relação caseína/proteína verdadeira durante estocagem sob refrigeração, especialmente do leite com alta CCS, indicou a ocorrência de significativos níveis de atividade proteolítica mesmo após a pasteurização. Os níveis de AGL e a hidrólise da caseína foram significativamente maiores no leite com alta CCS comparado ao leite com baixa CCS (0,43 e 0,27 meq AGL/100g de gordura, respectivamente).

No mesmo estudo, a qualidade sensorial do leite com baixa CCS permaneceu alta mesmo 21 dias após a fabricação e armazenado sob refrigeração, enquanto que o leite com alta CCS apresentou defeitos sensoriais significativos, como rancidez, adstringência e gosto amargo. O decréscimo na qualidade sensorial do leite com alta CCS entre os dias 14 e 21 foi provavelmente causado pela ação de elevados níveis de enzimas

lipolíticas e proteolíticas. Os pesquisadores concluíram que a mastite afetou adversamente a qualidade do leite pasteurizado, diminuindo sua vida de prateleira (MA et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a influência da contagem de células somáticas nas propriedades físico-químicas e microbiológicas de leite semidesnatado e de creme de leite pasteurizados.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as características físico químicas de acidez, pH, composição (gordura, proteína, extrato seco total e extrato seco desengordurado) e microbiológicas (contagem total de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e número mais provável de coliformes totais e termotolerantes) em leite semidesnatado pasteurizado, produzido a partir de leite *in natura* contendo três diferentes níveis de células somáticas, ao longo de 28 dias de estocagem sob refrigeração a 5°C;
- b) Determinar as características físico-químicas de acidez, pH e gordura e, microbiológicas (contagem total de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e número mais provável de coliformes totais e termotolerantes) em creme de leite pasteurizado, produzido a partir de leite *in natura* contendo três diferentes níveis de células somáticas, ao longo de 30 dias de estocagem sob refrigeração a 5°C;
- c) Avaliar os efeitos de três diferentes níveis de células somáticas sobre a qualidade de leite semidesnatado e de creme de leite pasteurizados durante os períodos de estocagem sob refrigeração a 5°C de 28 e 30 dias, respectivamente;
- d) investigar o perfil de ácidos graxos em creme de leite e de frações proteicas em leite semidesnatado produzidos a partir de

leite *in natura* contendo três diferentes níveis de células somáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Definição dos grupos experimentais e repetições

De acordo com a Contagem de Célula somática (CCS) foram definidos três grupos experimentais para a realização do presente estudo, em 4 (quatro) repetições, a saber:

Grupo de baixa CCS: menor que 100.000 céls.mL⁻¹;

Grupo de CCS intermediária: de 400 a 500.000 céls.mL⁻¹; e

Grupo de alta CCS: maior que 750.000 céls.mL⁻¹.

4.2. Origem da matéria-prima

O leite utilizado no estudo foi proveniente de 15 fêmeas bovinas da raça holandesas, com idade entre 2 e 7 anos, em terço médio de lactação, submetidas a três ordenhas diárias, com produção média de 25 Kg/animal/dia, mantidas em sistema de confinamento do tipo *free-stall*, com acesso livre a cochos de alimentação e baias de descanso, da granja leiteira da Fazenda da Aeronáutica, localizada no município de Pirassununga – SP.

4.3. Amostragem e avaliação do leite *in natura*

Dois dias úteis antes de cada repetição, para seleção dos animais para composição dos grupos experimentais, foi realizada a coleta automática e envio de amostras de cerca de 60 mL de leite, dos quatro tetos de cada animal em lactação, para CCS no Laboratório da Clínica do Leite, Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), em Piracicaba-SP. As amostras foram analisadas através de contador eletrônico de células somáticas (Bentley®).

A amostragem do leite dos grupos experimentais foi realizada nos meses de março e abril do ano de 2009.

Durante a primeira ordenha, após separação dos animais em grupos de baixa, intermediária e alta CCS, os mesmos foram ordenhados aleatoriamente nesta mesma ordem até completarem o volume de 40L de leite por grupo. O produto obtido foi armazenado em latões de polietileno de alta densidade, previamente limpos e sanitizados com soluções de detergente alcalino clorado e de ácido peracético, e mantidos sob refrigeração, imediatamente após a coleta.

Em seguida, os latões devidamente identificados foram transportados em carro refrigerado, até o Laticínio Escola da FZEA, campus de Pirassununga – SP para produção de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.

Para determinação da CCS e das características físico-químicas e microbiológicas do leite *in natura* de cada lote, foram coletadas amostras diretamente de cada latão, para envio ao Laboratório da Clínica do Leite e para análise imediata no Laboratório de Microbiologia e Micotoxycologia de Alimentos (LMMA) – FZEA/USP. Foram feitas análises em triplicata para CCS e em duplicata para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados.

As análises físico-químicas de composição (gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos) foram feitas utilizando-se o método infravermelho, com o analisador AC-60® (Boeco, Germany). Foram realizadas ainda, análises de pH, acidez titulável, densidade e alizarol 78°GL (IAL, 1985). Para detecção de resíduo de antibióticos foi utilizado o teste comercial Delvotest® SP (Gis brocades Inc, Netherlands). Para a avaliação microbiológica, as amostras coletadas em recipientes esterelizados foram

submetidas às contagens de mesófilos, psicotróficos e NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.4 Processamento do leite semidesnatado e do creme de leite

A Figura 1 apresenta o fluxograma esquemático de processamento utilizado para obtenção de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados nas quatro repetições realizadas.

O leite *in natura* foi submetido a aquecimento em banho-maria à temperatura de 50°C para diminuição de sua viscosidade e favorecimento da separação da gordura. O desnate e obtenção do creme e do leite semidesnatado foram feitos pela centrifugação do leite integral a uma velocidade de cerca de 5.000 rotações por minuto (rpm) em desnatadeira do Laticínio Escola da FZEA.

O creme de leite obtido, acondicionado em frascos de vidro previamente esterilizados, foi submetido à pasteurização lenta a 65°C por trinta minutos, em banho-maria, e resfriado em seguida à temperatura de 2°C a 4°C, em banho de água gelada, sendo mantido sob refrigeração a 4°C até o momento do envase manual em câmara asséptica. A embalagem do produto foi feita em garrafas de polietileno de alta densidade (PEAD) de coloração branca leitosa previamente descontaminadas em solução de dióxido de cloro (ClO₂).

O leite semidesnatado obtido durante o processo foi mantido sob refrigeração a 4°C até o momento de sua pasteurização rápida, a 73°C por 15 segundos, em trocador de calor a placas. Em seguida, foi realizado o envase asséptico do produto em garrafas de PEAD pigmentadas, branco leitosas, também descontaminadas previamente em solução de ClO₂.

Figura 1 - Fluxograma esquemático de obtenção de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados.

Todo o procedimento, desde o desnate até o envase dos produtos finais, foi feito com o leite dos grupos baixa, intermediária e alta CCS, nesta sequência.

As unidades produzidas em cada lote foram devidamente identificadas e armazenadas em câmara fria a 5°C durante 28 dias, para leite semidesnatado pasteurizado, e 30 dias, para creme de leite pasteurizado. Ao longo destes períodos, amostras aleatórias dos produtos de cada lote foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. O leite semidesnatado pasteurizado foi analisado nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 da produção, enquanto que o creme de leite pasteurizado, nos dias 1, 10, 20 e 30.

As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) e no Laboratório de Engenharia de Separações (LES), ambos da FZEA.

4.5 Avaliação físico-química e microbiológica do leite semidesnatado pasteurizado

As análises físico químicas de pH e acidez titulável do leite semidesnatado foram executadas de acordo com as técnicas descritas no manual do Instituto Adolfo Lutz (1985). As análises de composição (gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos) foram realizadas utilizando-se o método infravermelho, com o analisador AC-60[®] (Boeco, Germany).

As frações protéicas foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito no item 4.6. A qualidade microbiológica foi avaliada através da contagem de mesófilos, psicotróficos e determinação do NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.6 Avaliação das frações da caseína em leite semidesnatado pasteurizado

As frações protéicas do leite semidesnatado pasteurizado foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia preconizada por Bobe et al. (1998).

O método iniciou-se com a transferência de alíquotas de 500 μL de amostras de leite para *ependorfs* e congelamento das mesmas em freezer a -20°C .

Este procedimento foi realizado para todas as amostras de leite semidesnatado estocadas sob refrigeração, exatamente nos dias previstos para avaliação (dias 1, 7, 14, 21 e 28 após a fabricação de cada lote), em duplicata.

No início da semana das análises por CLAE, após descongelamento das amostras de leite à temperatura ambiente, foram adicionados a elas 500 μL de solução A contendo 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de cloridrato de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotretol (pH 7), seguido de agitação por 10 segundos em temperatura ambiente.

Após permanecerem 1 hora em repouso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à velocidade de 14.000 rpm. Removida a camada de gordura sobrenadante, foram diluídas com solução B contendo 4,5 M de cloridrato de guanidina e mistura de solventes (solvente A, composto por acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 + 900 + 1, respectivamente, a pH 2,0). Esta solução contém aproximadamente, 4 mg.mL^{-1} de proteínas totais e foi utilizada para a determinação das frações no cromatógrafo de fase líquida.

Os extratos finais das amostras de leite semidesnatado pasteurizado foram filtrados através de membrana de PTFE 0,22 μm (Millipore, USA) e mantidos estocados sob refrigeração (7°C) até o momento da análise cromatográfica que ocorreu dentro de um período máximo de cinco dias.

A separação e a identificação das frações protéicas foram então realizadas no sistema CLAE descrito anteriormente, equipado com detector de luz UV e coluna Phenomenex C₁₈ (4 μm , 4.6 X 150 mm). Alíquotas de 20 μL das amostras foram injetadas no sistema e as corridas cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente, nas seguintes condições abaixo, preconizadas por Bobe et al. (1998).

Fases móveis: misturas de solventes A (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100 : 900 : 1) e B (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 900 + 100 + 1). O programa de gradiente foi iniciado com 27% do solvente B, aumentando-se gradativamente a proporção do solvente B imediatamente após a injeção das amostras [2,5%/min. (2 min.), 0,47%/min. (34,9 min.)], retornando em seguida às condições iniciais após 2 min; Fluxo: 1,2 mL.min⁻¹; Comprimento de onda do detector: 220 nm.

A quantificação das frações (caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ) nas amostras foi realizada através da interpolação das áreas dos picos cromatográficos, nas equações de regressão das curvas de calibração, construídas utilizando-se padrões de proteínas purificadas do leite bovino (Sigma, USA), preparados nas mesmas condições descritas para as amostras de leite, nas seguintes concentrações: caseína α_{s1} : 0,375, 0,75, 1,50 e 3,00 mg.mL⁻¹; α_{s2} : 0,125, 0,25, 0,50 e 1,00 mg.mL⁻¹; caseína β : 0,375, 0,75, 1,50 e 3,0 mg.mL⁻¹; e caseína κ : 0,187, 0,375, 0,75 e 1,50 mg.mL⁻¹.

4.7 Avaliação físico-química e microbiológica do creme de leite pasteurizado

As análises físico-químicas de pH, acidez titulável e gordura do creme de leite foram executadas de acordo com as técnicas descritas pelo MAPA (2006). O perfil de ácidos graxos foi determinado ao longo de 30 dias de armazenamento através de cromatografia gasosa, conforme descrito no item 4.8. A qualidade microbiológica foi avaliada através da contagem de mesófilos, psicotróficos e determinação do NMP de coliformes a 30 e 45°C (APHA, 1992).

4.8 Avaliação do perfil de ácidos graxos em Creme de Leite Pasteurizado

O perfil de ácidos graxos do creme de leite foi determinado através de cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos (CG), de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998), no Laboratório de Engenharia de Separações (LES) do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA.

As determinações iniciaram-se com as extrações com solvente a frio, segundo o método de Bligh Dyer (1959) e, congelamento em *ependorfs*, de alíquotas de 50 µL de matérias graxas obtidas a partir de 2 g das amostras de creme de leite. Este procedimento foi realizado para todas as amostras de creme de leite estocadas sob refrigeração, exatamente nos dias previstos para análises (dias 1, 10, 20 e 30 após a fabricação de cada lote), em duplicata. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de esterificação para obtenção dos ésteres metílicos, de acordo com a metodologia preconizada por Maia (1992), e congeladas a -20°C até o momento das análises cromatográficas.

Após o descongelamento das amostras, previamente preparadas, à temperatura ambiente, foi procedida a CG em Cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010 AF, Japão com detector de ionização de chama.

As condições de análise utilizadas foram coluna RTx-Wax 0.25 μ m, 30 m x 0.25 mm i.d. (Restek); hélio como gás de arraste na taxa de 0,93 mL/min; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura da coluna de 50 a 200°C (taxa de 1°C/min); temperatura do detector de 280°C. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões FAME Mix 37 - SUPELCO (PA, EUA) e a quantificação foi realizada por normalização interna.

Adicionalmente, com base nos resultados obtidos referentes aos ácidos graxos insaturados, foram calculados os índices de iodo para a média entre duplicatas de cada amostra analisada.

4.9 Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados obtidos para as variáveis laboratoriais avaliadas nos leites *in natura*, semidesnatado pasteurizado e creme de leite pasteurizado, de acordo com os três grupos de CCS, em cada dia de análise, das quatro repetições, foi realizada utilizando-se o procedimento *proc mixed* do SAS[®]. Deste modo, o delineamento utilizado para avaliar os efeitos da CCS sobre as características avaliadas no leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados durante o armazenamento foi o de blocos casualizados (quatro repetições) com medidas repetidas no tempo em cinco ocasiões (leite semidesnatado, dias 1, 7, 14, 21 e 28) e quatro ocasiões (creme de leite, dias 1, 10, 20 e 30). As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do Leite *in natura*

As médias de CCS dos lotes de leite utilizados na fabricação do leite semidesnatado e do creme de leite pasteurizados foram de 39.000, 349.500 e 1.297.500 CS.mL⁻¹ para os grupos denominados baixa (<100.000), intermediária (entre 400 e 500.000) e alta (>750.000 CS.mL⁻¹), respectivamente. A divisão em três grupos foi definida para que fossem avaliados os efeitos da CCS sobre a qualidade dos produtos. O limite atual estabelecido na Instrução Normativa 51 para o leite *in natura* refrigerado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país é de no máximo 750.000 CS.mL⁻¹. Para o leite tipo B, o limite máximo vigente é de 600.000 CS.mL⁻¹ (MAPA, 2002).

5.1.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados físico-químicos do leite *in natura* para os três grupos estudados seguem apresentados na Tabela 2. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para proteína, sólidos totais e gordura, pelo teste de médias de Tukey ($P < 0,05$). Os valores médios de acidez titulável, densidade e proteína estiveram de acordo com a legislação, apresentando variações dentro dos limites esperados.

Os sólidos não gordurosos e a gordura, para as amostras de baixa CCS apresentaram resultados divergentes do previsto na legislação.

Os valores preconizados pela Instrução Normativa 51 para o leite *in natura* refrigerado são de no mínimo 3,0 g/100g de gordura, densidade entre 1,028 e 1,034 g.mL⁻¹, 14 a 18°D para acidez titulável, mínimo de 8,4 g/100g para sólidos não gordurosos e mínimo de 2,8 g/100g de proteína (MAPA, 2002). Deve-se

ressaltar, contudo, que o leite utilizado no experimento foi proveniente da ordenha de poucas vacas, selecionadas exclusivamente de acordo com a CCS no leite, não representando, portanto, o leite de conjunto do rebanho.

Zanela et al. (2006) avaliaram a qualidade do leite em sistemas de produção da região sul do Brasil e obtiveram como resultado uma composição média para sistemas especializados de 3,6% de gordura, 3,23% de proteína bruta, 4,49% de lactose, 12,18% de sólidos totais; resultados semelhantes aos obtidos por Walstra (2006), porém diferentes dos valores de gordura verificados neste estudo.

Tabela 2 - Composição físico-química do leite *in natura* utilizado na fabricação de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados¹.

Variáveis	CCS (x 1.000.mL ⁻¹)		
	<100	400 - 500	>750
Acidez titulável (°D)	16,01 ± 2,58	17,51 ± 1,91	17,01 ± 1,41
pH	6,87 ± 0,15	6,80 ± 0,01	6,82 ± 0,05
Densidade (g/cm ³)	1,029 ± 0,01	1,030 ± 0,01	1,030 ± 0,01
Índice crioscópico (°C)	-0,487 ± 0,07	-0,542 ± 0,01	-0,542 ± 0,01
Sólidos totais (%)	10,45 ± 1,03 ^b	12,17 ± 0,51 ^a	12,29 ± 0,44 ^a
Sólidos não gordurosos (%)	8,05 ± 1,10	8,77 ± 0,12	8,82 ± 0,09
Gordura (%)	3,00 ± 0,35 ^b	3,37 ± 0,45 ^a	3,47 ± 0,35 ^a
Proteína (%)	2,83 ± 0,44 ^b	3,30 ± 0,10 ^a	3,42 ± 0,20 ^a
Lactose (%)	4,36 ± 0,53	4,50 ± 0,04	4,43 ± 0,04

¹Médias das amostras ± desvio padrão de 4 repetições analisadas em duplicata.

Médias, em uma mesma linha, com diferentes letras minúsculas, diferem significativamente (P<0,05).

A gordura apresentou diferenças significativas (P<0,05) para o grupo de baixa contagem de células somáticas em relação aos demais grupos. O parâmetro variou de 3,00% a 3,47% nos grupos <100.000 e >750.000 CS.mL⁻¹, respectivamente. El-Deeb e Hassan (1987), diferentemente do encontrado neste trabalho, reportaram menores teores de gordura no leite de vacas com mastite. De fato, pode-se observar no leite com alta CCS menor concentração de gordura devido ao fato de haver menor síntese de gordura pela glândula mamária (RANDOLPH e ERWIN, 1974; SCHULTZ, 1977).

Entretanto, alguns autores sugerem que a relação entre a CCS e o percentual de gordura pode ser negativa, positiva ou nula, dependendo do valor médio da CCS no leite dos rebanhos (SCHULTZ, 1977; MUNRO, GRIEVE e KITCHEN, 1984). Marques, Balbinotti e Fischer (2002) observaram maiores concentrações de gordura de acordo com a elevação dos níveis de CCS.

Os resultados experimentais são conflitantes, no que se refere ao efeito de elevadas CCS no leite sobre a concentração de proteína total do leite medida pela concentração de nitrogênio total. Ballou et al. (1995) observaram que a porcentagem de caseína foi significativamente maior quando o leite era proveniente de um grupo de vacas que apresentava baixa CCS em relação a grupos de maiores contagens. Entretanto, observou-se no presente estudo, um maior teor de proteína para o grupo de animais com alta CCS, porém sem diferença significativa ($P > 0,05$) para o grupo intermediário, conforme apresentado na Tabela 2.

Estes resultados são condizentes com diversos autores que relataram que o leite de vacas com alta CCS apresenta maiores níveis de proteína total, quando comparado ao de vacas sadias (MILLER et al., 1983; AULDIST et al., 1995; KLEI et al., 1998; URECH, PUHAN e SCHÄLLIBAUM, 1998; MARQUES, BALBINOTTI e FISCHER, 2002; SOMERS et al., 2003). Weaver e Kroger (1976) afirmaram que a proteína total do leite aumenta com a CCS, assim como as proteínas séricas. Klei et al. (1998) reportaram que um aumento na CCS de 83.000 para 872.500 CS.mL⁻¹ influenciou a composição do leite. Assim, o leite com alta CCS apresentou maiores valores de proteína, porém menores teores de caseína como porcentagem da proteína verdadeira.

De forma contrária ao apresentado neste estudo, Haenlein, Schultz e Zikakis (1973), Mitchell, Fedrick e Rogers (1986) e Verdi et al. (1987) não identificaram diferenças entre os teores de

proteína total de vacas com altas CCS e vacas sadias. Rogers et al. (1989) e Bueno et al. (2004) relataram uma redução no teor de proteína total no leite de vacas com elevada CCS.

Com relação à lactose do leite *in natura*, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os níveis de células somáticas estudados o que difere dos resultados encontrados por Klei et al. (1998) que reportaram que um aumento de $83.000 \text{ CS.mL}^{-1}$ para $870.000 \text{ CS.mL}^{-1}$ no leite correspondeu a uma diminuição na concentração de lactose de 4,98% para 4,71%. Bueno et al. (2004) observaram diminuição nos teores de lactose de 4,60% para 4,36% com contagens menores que $2,0 \times 10^5 \text{ CS.mL}^{-1}$ e maiores que 10^6 CS.mL^{-1} , respectivamente.

5.1.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados das análises microbiológicas do leite *in natura* com diferentes níveis de células somáticas, utilizado para a fabricação do leite semidesnatado e do creme de leite, são apresentados na Tabela 3.

Todos os grupos apresentaram valores de coliformes a 30°C maiores que 110 NMP.mL^{-1} . O grupo de baixa CCS apresentou, numericamente, os menores níveis de contaminação microbiológica. Os níveis de mesófilos observados estiveram abaixo do preconizado na legislação, considerando-se o limite de $1,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ recomendado para o leite *in natura* refrigerado (MAPA, 2002). No entanto, Rossi Júnior et al. (2006) encontraram contagens de mesófilos da ordem de 10^8 , 10^7 e 10^4 UFC.mL^{-1} no leite *in natura* destinado à fabricação de leite UAT no Estado de São Paulo. Os níveis de microrganismos psicrótróficos observados foram inferiores aos observados por Vidal-Martins et al. (2005) em pesquisa que avaliou leite *in natura* destinado ao processamento UAT em usina do Estado de São Paulo.

Observou-se um efeito positivo entre a CCS e a contagem de microrganismos estudados, exceto para os mesófilos, que apresentaram o valor de aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹, no nível intermediário de contagem de células somáticas. No entanto, os resultados em questão não foram significativos ($P>0,05$) entre os três níveis de CCS avaliados.

Tabela 3 – Análise microbiológica do leite *in natura* utilizado na fabricação de leite semidesnatado e creme de leite pasteurizados¹.

Variáveis	CCS (x 1.000.mL ⁻¹)		
	<100	400 - 500	>750
Mesófilos (log UFC. mL ⁻¹)	4,10 ± 0,06	5,13 ± 1,01	4,73 ± 1,24
Psicotróficos (log UFC. mL ⁻¹)	3,57 ± 0,48	4,18 ± 1,34	4,40 ± 1,05
Coliformes 30 °C (log UFC. mL ⁻¹)	2,92 ± 0,50	2,95 ± 0,95	3,73 ± 0,87
Coliformes 45 °C (log UFC. mL ⁻¹)	2,70 ± 0,44	2,95 0,95	3,56 ± 1,07

¹Médias das amostras ± desvio padrão de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar de não existir diferença significativa ($P>0,05$) para o grupo de microrganismos psicotróficos, observou-se um aumento de 3,57 para 4,40 log UFC.mL⁻¹ no leite *in natura* dos grupos de baixa e alta CCS, respectivamente. Os valores de CCS estão diretamente relacionados ao aumento na contagem de bactérias psicotróficas no leite. Esta associação advém do fato de que a principal fonte destes microrganismos é a superfície externa dos tetos (PACKARD e GINN, 1991). Assim, quanto melhor a desinfecção dos tetos, menor a concentração de bactérias psicotróficas no leite produzido. Deve-se ressaltar que os critérios de higiene da glândula mamária tornam-se ainda mais importantes à medida que se intensificam as ações para o resfriamento do leite na propriedade rural, imediatamente após a ordenha, a exemplo do que vem ocorrendo atualmente no país.

Pinto *et al.* (2006) determinaram a contagem de bactérias mesofílicas e psicotróficas em amostras de leite *in natura* refrigerado em tanques de fornecedores de um laticínio mineiro e

os resultados foram semelhantes ao encontrados neste trabalho. Para bactérias mesofílicas, verificaram uma contagem variando de $2,5 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ e, para psicotróficas, as contagens variaram de $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, concluindo que as altas contagens obtidas podem estar relacionadas a inadequados processos de higienização da ordenhadeira e dos tanques de armazenamento e falhas durante a produção.

5.2 Avaliação do Leite Semidesnatado Pasteurizado

5.2.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O leite semidesnatado foi processado a partir de leite *in natura* com três diferentes níveis de células somáticas. Os resultados de pH e acidez titulável seguem apresentados nas Tabelas 4 e 5. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os parâmetros em questão. No decorrer dos 28 dias de estocagem o pH e a acidez titulável variaram de 6,66 a 6,87 e 13,50 a 16^oD, respectivamente. Os resultados encontrados foram semelhantes aos verificados por Fernandes (2007).

Tabela 4 – Resultados de pH do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	pH				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	6,85	6,70	6,82	6,82	6,72
400 - 500	6,70	6,80	6,77	6,77	6,70
>750	6,87	6,66	6,80	6,82	6,70
Erro padrão	0,09	0,07	0,03	0,03	0,01
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	0,49				
Dia	0,39				
CCS*dia	0,52				

¹ Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 5 – Resultados de acidez do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Acidez (°D)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	14,25	13,66	14,01	13,50	13,50
400 - 500	15,25	14,33	15,51	15,00	15,50
>750	14,16	15,33	16,00	15,50	15,75
Erro padrão	0,61	0,84	1,04	1,04	1,23
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	0,23				
Dia	0,70				
CCS*dia	0,60				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

As Tabelas de 6, 7, 8 e 9 contém os resultados dos parâmetros físico-químicos de composição avaliados no leite semidesnatado pasteurizado, não tendo sido verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) para as variáveis estudadas.

Tabela 6 – Resultados de proteína do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Proteína (%)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	3,25	3,20	3,28	3,28	3,29
400 - 500	3,64	3,62	3,66	3,66	3,66
>750	3,11	3,69	3,68	3,69	3,70
Erro padrão	0,27	0,27	0,23	0,23	0,23
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,63				
Dia	0,68				
CCS*Dia	0,85				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

A gordura variou de 1,26 a 1,46%, durante todo o período, permanecendo dentro dos parâmetros estipulados (MAPA 2002)

que está entre 0,5 a 2,9%, para o referido produto. As porcentagens de proteínas oscilaram de 3,11 a 3,70% e também estiveram de acordo com o previsto pela legislação vigente.

Tabela 7 – Resultados de gordura do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Gordura (%)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	1,32	1,26	1,30	1,32	1,35
400 - 500	1,35	1,46	1,37	1,40	1,40
>750	1,37	1,46	1,42	1,45	1,45
Erro padrão	0,03	0,12	0,06	0,07	0,05
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,33				
Dia	0,52				
CCS*Dia	0,52				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 8 – Resultados de sólidos totais do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Sólidos Totais (%)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	9,20	9,31	9,39	9,42	9,48
400 - 500	10,22	10,59	10,38	10,40	10,41
>750	10,74	10,75	10,49	10,53	10,57
Erro padrão	0,78	0,79	0,61	0,61	0,59
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,43				
Dia	0,49				
CCS*Dia	0,51				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9 – Resultados de sólidos não gordurosos do leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Sólidos Não Gordurosos (%)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
<100	7,96	8,07	8,29	8,30	8,32
400 - 500	8,87	9,14	9,23	9,24	9,25
>750	10,46	10,75	9,29	9,30	9,33
Erro padrão	1,27	1,35	0,56	0,56	0,56
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,55				
Dia	0,30				
CCS*Dia	0,70				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

5.2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados das análises microbiológicas do leite semidesnatado pasteurizado durante o período de 28 dias de estocagem seguem apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Microrganismos mesófilos no leite semidesnatado pasteurizado durante 28 de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Mesófilos (log UFC.mL ⁻¹)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia28
<100	2,42	2,43	2,14	3,11	3,37
400 - 500	2,76	2,66	2,82	2,54	2,19
>750	2,90	2,60	2,41	2,32	2,22
Erro padrão	0,25	0,12	0,34	0,41	0,67
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,79				
Dia	0,97				
CCS*Dia	0,53				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 11 – Microrganismos psicrotróficos no leite semidesnatado pasteurizado durante 28 de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Psicrotróficos (log UFC.mL ⁻¹)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia28
<100	2,28	1,98	2,13	2,89	3,82
400 - 500	2,09	2,20	2,62	2,26	2,69
>750	1,79	2,35	2,01	2,59	2,63
Erro padrão	0,25	0,19	0,32	0,32	0,67
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,45				
Dia	0,08				
CCS*Dia	0,58				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Não foram constatadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos nos diferentes dias de análise, e nem interações entre tratamentos e período de estocagem.

Os valores médios de mesófilos para os níveis de células somáticas estudados ficaram entre 2,14 a 2,82 logUFC.mL⁻¹ e, portanto, compatíveis com o limite definido para o leite pasteurizado, que é de $8,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (MAPA, 2002). Observou-se, portanto, uma redução de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos na contagem de mesófilos do leite *in natura*, para o leite pasteurizado. Rossi Júnior et al. (2006) relataram valores da ordem de 10^4 e 10^2 UFC.mL⁻¹ no leite pasteurizado destinado ao processamento UAT, com uma redução decimal próxima ao do presente trabalho.

Com relação aos resultados encontrados para psicrotróficos, foram observadas variações entre 1,79 e 3,82 log UFC.mL⁻¹, tendo ocorrido redução em relação ao leite *in natura* de aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos, após a pasteurização. Os Coliformes a 30 e 45°C permaneceram, durante todo o período de

estocagem, em $0,60 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, demonstrando uma redução de, aproximadamente, 2,10 a 2,96 ciclos logarítmicos, para os níveis de baixa e alta contagem de células somáticas, respectivamente.

Os resultados das análises microbiológicas demonstram que os procedimentos de pasteurização e embalagem foram adequados para todos os tratamentos, não havendo influência da CCS ou do tempo de armazenamento sobre esses parâmetros.

5.2.3 FRAÇÕES DE CASEÍNA EM LEITE SEMIDESNATADO

De acordo com os resultados obtidos seguem apresentadas na Tabela 12 as frações de caseína presentes no leite semidesnatado pasteurizado, em mg.mL^{-1} , de acordo com os grupos de baixa, intermediária e alta CCS.

Tabela 12 – Resultados de frações de caseína no leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

Fração Protéica ¹ (mg.mL^{-1})	CCS ($\times 1.000.\text{mL}^{-1}$)			EPM
	<100	400-500	>750	
α s1-caseína	6,85	6,34	6,34	0,17
α s2-caseína	2,24	2,64	4,10	0,56
α -caseína	9,09	8,98	10,44	0,47
β -caseína	7,94 ^{bc}	10,17 ^{ac}	10,67 ^a	0,84
κ -caseína	6,65	6,15	6,46	0,15
Total	15,74	15,13	16,90	0,52

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Médias, na mesma linha, com letras minúsculas diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$).

A análise dos resultados revela que não houve relação entre a CCS e os 28 dias de estocagem do produto sob refrigeração a 5°C avaliados para nenhuma das frações protéicas da caseína.

No entanto, considerando-se apenas os três grupos experimentais, houve diferença estatística ($P < 0,05$), entre baixa e alta CCS, para a fração β -caseína cujas concentrações médias aumentaram acompanhando o aumento da CCS.

Este resultado é coerente com o maior teor de proteína observado no leite semidesnatado com alta CCS, de acordo com a Tabela 6, o qual apresentou proteína total, cerca de 12% acima do leite com baixa CCS. Entretanto, entre os grupos de baixa e intermediária e intermediária e alta CCS as diferenças estatísticas encontradas não foram significativas ($P>0,05$).

Fernandes (2007) avaliando a influência da CCS sobre a qualidade do leite UAT, assim como no presente estudo, não observou interação entre CCS e tempo de armazenagem para as frações protéicas avaliadas. Porém, de forma contrária, encontrou menores concentrações de β -caseína em todos os dias de avaliação do referido produto no grupo de maior CCS.

A CCS pode estar envolvida na atividade proteolítica predispondo o leite à ação de proteases com conseqüente hidrólise enzimática da α_s e β -caseína. O resultado deste mecanismo é a diminuição nos níveis destas frações protéicas no leite (CRUDDEN et al., 2005). Este dado também está em desacordo com aqueles verificados neste trabalho.

A Tabela 13 apresenta resultados mais detalhados sobre a β -caseína neste estudo.

Tabela 13 – Resultados de β -caseína no leite semidesnatado pasteurizado durante 28 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	β -caseína (mg/mL)				
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia28
<100	7,700	7,010	8,267	8,003	8,750
400 - 500	9,947	10,937	10,107	9,493	10,403
>750	10,847	10,747	10,477	10,603	10,693
Erro padrão	0,94	1,28	0,68	0,75	0,61
Fonte de variação	---- P valor (nível descrito no teste) ----				
CCS	0,0484*				
Dia	0,9813				
CCS*Dia	0,9871				

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

*Significativo.

A fração protéica β -caseína apresentou variação para o grupo de média CCS de 9,49 a 10,93 mg.mL⁻¹, para os dias 21 e 7, respectivamente. A menor concentração verificada neste trabalho foi de 7,01 mg.mL⁻¹ no dia 1 para o grupo de baixa CCS.

FOX & KELLY (2006) em extensa revisão tratando da atividade enzimática sobre os componentes do leite e produtos derivados, esclareceram que restam ainda muitos aspectos interferentes a serem estudados em maior profundidade. Com base neste estudo, no que diz respeito às frações de caseína do leite semidesnatado pasteurizado, pode-se apontar algumas possíveis explicações para esclarecer os resultados encontrados, sobretudo para a β -caseína.

Uma delas é o fato de o leite neste estudo ser semidesnatado e a maior concentração das enzimas hidrolíticas estarem presentes na gordura do leite, removida parcialmente do produto por centrifugação para obtenção do creme; outra seria devido ao leite *in natura* utilizado ter sido proveniente de um único rebanho, de tamanho reduzido, com características próprias e submetido a três ordenhas diárias em intervalos médios de 8 horas entre ordenhas o que, segundo os autores, pode reduzir o tempo de ação das enzimas e minimizar seus efeitos; e, por último, o fato do leite utilizado no estudo ter sido processado praticamente de imediato após as ordenhas, reduzindo também o tempo de ação das enzimas sobre a proteína.

O leite semidesnatado, para os grupos de intermediária CCS, apresentou concentrações médias de 8,98; 10,17 e 6,15 mg.mL⁻¹ para as frações de α -caseína, β -caseína e κ -caseína, respectivamente. A β -caseína foi a fração de maior representatividade no leite semidesnatado para todos os grupos de células somáticas estudados.

A Tabela 14 demonstra que a α -caseína e a κ -caseína apresentaram-se em porcentagens maiores no grupo de menor contagem de células somáticas, enquanto a β -caseína tem a sua maior representatividade no grupo intermediário de CS.

Tabela 14 – Porcentagem das frações de caseína, no leite semidesnatado pasteurizado em relação ao total da proteína, durante 28 dias de estocagem¹.

Fração Protéica ¹ (%)	CCS (x 1.000.mL ⁻¹)			EPM
	<100	400-500	>750	
α s1-caseína	28,77	24,95	22,87	1,73
α s2-caseína	9,89	10,59	14,97	1,59
α -caseína	38,66	35,54	37,84	0,93
β -caseína	33,06	40,37	38,65	2,21
κ -caseína	28,27	24,09	23,51	1,50
Total	100,00	100,00	100,00	0,00

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não houve diferença estatística significativa para o teste de Tuckey a 5%

Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) em relação aos grupos de células somáticas e dos dias de estocagem estudados.

O grupo de CCS intermediária apresentou 40,37% de β -caseína sendo a porção mais representativa de todos os grupos e frações de caseína verificados. Por outro lado, a fração menos representativa foi a α s2-caseína que apresentou, para os grupos de baixa, intermediária e alta CCS, participação de 9,89, 10,59 e 14,97% em relação ao total de caseína do leite semidesnatado em estudo.

De acordo com os resultados obtidos não houve proteólise das frações estudadas, uma vez que não foi observada diferença estatística nas concentrações das mesmas durante o período de estocagem e de acordo com os diferentes grupos de CCS.

Portanto, pode-se dizer que houve um baixo risco de alterações sensoriais no leite semidesnatado pasteurizado, embora as mesmas não tenham sido objetivo deste estudo. Outrossim,

observou-se que em amostras de leite contendo alta CCS, os cromatogramas exibiram uma fragmentação dos picos de α_{s1} -caseína e β -caseína, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Cromatogramas das frações de caseína do leite semidesnatado durante o armazenamento por 28 dias, para o grupo de alta CCS.

Note-se a fragmentação do pico de β -caseína a partir do dia 14 de armazenamento, de acordo com as setas indicadas. Este fato evidencia, qualitativamente, a quebra destas frações de

caseína, embora suas respectivas concentrações não tenham se alterado quantitativamente ($P>0,05$).

Segundo SCHULTZ (1977), os efeitos das mastites sobre a proteína do leite são de natureza qualitativa, uma vez que os valores absolutos de proteína bruta não sofrem alterações significativas. Assim, o leite proveniente de vacas com mastite apresenta menor teor de caseína, que é a proteína nobre do leite, porém há aumento dos níveis de proteínas séricas, como soroalbuminas e imunoglobulinas.

BALLOU et al. (1995) confirmaram os experimentos realizados neste trabalho, ao observarem que a porcentagem de caseína foi significativamente maior quando o leite era proveniente de um grupo de vacas que apresentava baixa CCS em relação a grupos de maiores contagens.

5.3 Avaliação do creme de leite Pasteurizado

O creme de leite foi avaliado quantos aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos ao longo de 30 dias de estocagem sob refrigeração.

5.3.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados das análises de pH, acidez titulável e gordura do creme de leite nos dias 1, 10, 20 e 30 dias após a fabricação estão apresentados nas Tabelas de 15, 16 e 17.

Tabela 15 – Resultados de pH do creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	pH			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	6,75	7,00	6,85	6,67
400 - 500	6,40	6,40	6,87	6,70
>750	6,60	6,82	6,57	6,80
Erro padrão	0,18	0,31	0,17	0,07
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) ----			
CCS	0,74			
Dia	0,58			
CCS*Dia	0,93			

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 16 – Resultados de acidez do creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Acidez Titulável (mL de NaOH 0,1 N)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	0,35	0,50	0,35	0,27
400 - 500	0,42	0,42	0,32	0,28
>750	0,50	0,47	0,30	0,32
Erro padrão	0,08	0,04	0,03	0,03
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) ----			
CCS	0,93			
Dia	0,20			
CCS*Dia	0,98			

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Os valores de pH e acidez titulável dos lotes variaram de 6,40 a 6,85 e de 0,27 a 0,50 mL de NaOH 0,1N, respectivamente.

Tabela 17 – Resultados de gordura do creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Gordura (%)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	37,75	37,75	31,25	35,50
400 - 500	35,75	35,75	30,50	31,50
>750	39,50	31,75	31,75	33,25
Erro padrão	1,88	3,06	0,63	2,01
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) ----			
CCS		0,60		
Dia		0,48		
CCS*Dia		0,99		

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Os teores de gordura variaram de 31,50 a 39,50% designando, desta forma, o produto como creme de leite. O regulamento técnico de identidade e qualidade (MAPA, 1996) define como creme o produto lácteo relativamente rico em gordura (20,0 a 49,9%) retirada do leite por procedimento tecnologicamente adequado, que apresenta a forma de uma emulsão de gordura em água, submetido ao processamento de pasteurização.

Não foram observados interações ($P>0,05$) entre CCS e tempo de estocagem para nenhuma das variáveis físico-químicas estudadas.

5.3.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Os resultados das análises microbiológicas do creme de leite pasteurizado no período de estocagem de 30 dias de avaliação, para diferentes níveis de células somáticas seguem apresentados nas Tabelas 18, 19, 20 e 21. Não houve diferença estatística ($P>0,05$) da CCS e do período de estocagem para os microrganismos mesófilos e psicrotróficos que apresentaram uma tendência à diminuição durante o período avaliado.

Tabela 18 – Resultados de mesófilos no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Mesófilos (log UFC.mL ⁻¹)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	3,41	2,58	3,60	3,77
400 - 500	4,18	4,08	3,43	3,86
>750	3,30	1,91	2,57	2,81
Erro padrão	0,48	1,11	0,55	0,58
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) ----			
CCS			0,14	
Dia			0,62	
CCS*Dia			0,91	

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 19 – Resultados de psicotróficos no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Psicotróficos (log UFC.mL ⁻¹)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	3,53	3,33	3,84	4,60
400 - 500	3,78	2,96	3,59	4,46
>750	2,24	3,29	2,68	4,67
Erro padrão	0,83	0,20	0,61	0,11
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) ----			
CCS			0,64	
Dia			0,21	
CCS*Dia			0,94	

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%.

Observou-se interação entre CCS e tempo de estocagem do creme de leite para Coliformes a 30 e 45°C, de acordo com as Tabelas 20 e 21. Assim, foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$). Os resultados encontrados diminuíram de 1,85 para 0,60 log NMP.mL⁻¹ durante os 30 dias de estocagem indicando que a refrigeração a 5°C foi eficiente na manutenção da qualidade microbiológica do produto que permaneceu dentro dos parâmetros

preconizados em Regulamento técnico de identidade e qualidade do creme de leite (MAPA, 1996).

Tabela 20 – Resultados de coliformes 30°C no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Coliforme 30°C (log UFC.mL ⁻¹)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	1,24	0,79	0,60	0,60
400 - 500	1,85	1,01	0,60	0,60
>750	1,04	0,60	0,60	0,60
Erro padrão	0,42	0,21	0,00	0,00
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) -----			
CCS	0,29			
Dia	0,013*			
CCS*Dia	0,70			

¹ Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

* Diferença significativa no teste de Tukey a 5%

Tabela 21 – Resultados de coliformes 45°C no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem sob refrigeração¹.

CCS (x 1.000.mL ⁻¹)	Coliforme 45°C (log UFC.mL ⁻¹)			
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30
<100	1,24	0,79	0,60	0,60
400 - 500	1,85	0,89	0,60	0,60
>750	1,04	0,60	0,60	0,60
Erro padrão	0,42	0,15	0,00	0,00
Fonte de variação	----- P valor (nível descrito no teste) -----			
CCS	0,35			
Dia	0,0116*			
CCS*Dia	0,69			

¹ Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

* Diferença significativa no teste de Tukey a 5%

5.3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Na Tabela 22 é apresentado o perfil de ácidos graxos do creme de leite pasteurizado, em g/100g, de acordo com os grupos

baixa, intermediária e alta CCS, no decorrer de 30 dias de estocagem.

Tabela 22 – Resultados de perfil de ácidos graxos do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem¹.

Ácidos Graxos	CCS (x 1.000.mL ⁻¹)			EPM
	<100	400-500	>750	
C4:0 (Butírico)	1,10	0,84	0,87	0,08
C6:0 (Capróico)	1,24	0,95	0,95	0,10
C8:0 (Caprílico)	0,93	0,71	0,70	0,08
C10:0 (Láurico)	2,29	1,74	1,73	0,19
C12:0 (Tridecanóico)	2,68	2,02	2,04	0,22
C14:0 (Mirístico)	10,33	7,66	7,52	0,91
C14:1 (Miristoléico)	0,79	0,60	0,61	0,06
C15:0 (Pentadecanóico)	0,84	0,61	0,59	0,08
C15:1 (Pentadecenóico)	0,04	0,03	0,03	0,00
C16:0 (Palmítico)	33,38	25,12	25,16	2,74
C16:1 (Palmitoléico)	1,54	1,15	1,13	0,13
C17:0 (Margárico)	0,48	0,36	0,35	0,04
C17:1 (Margaróico)	0,26	0,19	0,19	0,02
C18:0 (Estearico)	11,39	8,77	9,06	0,83
C18:1 (Oléico)	30,69 ^a	22,78 ^b	22,18 ^b	2,74
C18:2 (Linoléico)	2,83	1,92	1,80	0,32
C18:3 (Linolênico)	0,22	0,15	0,13	0,03
C20:0 (Araquídico)	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4	0,04	0,03	0,04	0,00

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Médias na mesma linhas, com diferentes letras minúsculas, diferem

Os resultados obtidos revelam ter havido diferença estatística ($P < 0,05$) para o ácido oléico (C18:1) entre os grupos de baixa e intermediária e baixa e alta CCS. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de intermediária e alta CCS.

Porém, FITZ-GERALD et al. (1981) definiram que o leite com alta contagem de células somáticas tem tendência a

apresentar maiores níveis de AGL e menor atividade da enzima lipase liporoteica (LLP).

NEEDS et al. (1986) afirmam que o teor de gordura e a CCS não afetam o nível de lipólise, e que há um aumento significativo dos ácidos graxos saturados de cadeia longa no leite proveniente de quartos com infecção, contrariando o encontrado no presente trabalho, uma vez que houve diminuição da quantidade de ácidos de cadeia longa de acordo com o aumento de CCS .

Entretanto, RANDOLPH e ERWIN (1974) observaram leites de vacas com mastite contendo maiores concentrações de AGL e ácidos graxos de cadeia curta, e menores concentrações de ácidos graxos de cadeia longa, o que corrobora com os valores apresentados na Tabela 22, onde os ácidos butíricos, capróicos e caprílico, apresentaram variações em relação aos grupos de baixa e alta CCS de 1,10 para 0,87; 1,24 para 0,95 e 0,93 para 0,70, respectivamente.

A Figura 3 apresenta a evolução das médias do ácido oléico encontrado, em g/100g, dos grupos de baixa, intermediária e alta CCS em todo o período de estocagem do produto. Para tanto, foram consideradas as médias das amostras das 4 repetições em duplicata e dos 4 tempos avaliados para cada um dos grupos de células somáticas.

Figura 3 – Evolução do percentual de ácido oléico, em g/100g, no creme de leite pasteurizado durante 30 dias de estocagem.

No presente estudo foi verificado que o ácido oléico (C18:1) apresentou médias de 30,68, 29,62 e 29,44 g/100g para os grupos baixa, intermediária e alta CCS, respectivamente.

Analisando os resultados encontrados, apresentados na Tabela 23, verificou-se não haver diferenças significativas ($P>0,05$) ao se comparar os três grupos CCS e os tempos de avaliação de 1, 10, 20 e 30 dias.

Observa-se na Figura 4 que os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e mirístico (C14:0) se destacaram em relação aos demais, em todos os grupos de contagem de células somáticas e tempos avaliados.

Assim, foi verificada uma predominância dos ácidos C16:0 e C18:1, seguidos do C18:0 e C14:0 e, em menor escala, do ácido C18:2.

Tabela 23 – Resultados de perfil de ácidos graxos do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem¹.

Ácidos Graxos	<100					400-500					>750				
	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30	EPM	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30	EPM	Dia 1	Dia 10	Dia 20	Dia 30	EPM
C4:0	1,18	1,12	1,05	1,06	0,03	1,21	1,14	1,11	1,17	0,02	1,13	1,13	1,09	1,10	0,01
C6:0	1,24	1,27	1,23	1,23	0,01	1,32	1,24	1,22	1,26	0,02	1,28	1,25	1,23	1,24	0,01
C8:0	0,92	0,95	0,94	0,93	0,01	0,97	0,91	0,92	0,92	0,01	0,96	0,93	0,94	0,94	0,01
C10:0	2,25	2,32	2,29	2,31	0,02	2,34	2,26	2,29	2,25	0,02	2,40	2,35	2,36	2,37	0,01
C12:0	2,76	2,67	2,63	2,64	0,03	2,76	2,67	2,71	2,67	0,02	2,85	2,83	2,84	2,85	0,01
C14:0	10,47	10,29	10,28	10,26	0,05	10,06	9,99	9,98	9,79	0,06	9,85	9,90	9,93	9,93	0,02
C14:1	0,81	0,78	0,79	0,78	0,01	0,81	0,80	0,83	0,80	0,01	0,85	0,84	0,83	0,85	0,00
C15:0	0,84	0,83	0,83	0,84	0,00	0,78	0,79	0,80	0,78	0,00	0,80	0,79	0,80	0,81	0,00
C15:1	ND	ND	0,04	0,04	0,00	0,03	0,07	0,03	0,00	0,01	0,00	0,04	0,07	0,00	0,02
C16:0	33,36	33,38	33,34	33,42	0,02	33,71	33,40	33,52	33,35	0,08	33,30	33,41	33,36	33,30	0,03
C16:1	1,55	1,53	1,55	1,52	0,01	1,51	1,50	1,52	1,52	0,01	1,56	1,55	1,54	1,53	0,01
C17:0	0,48	0,48	0,48	0,48	0,00	0,47	0,47	0,47	0,46	0,00	0,47	0,47	0,47	0,46	0,00
C17:1	0,28	0,26	0,26	0,25	0,01	0,25	0,25	0,24	0,24	0,00	0,26	0,24	0,25	0,25	0,00
C18:0	11,36	11,35	11,41	11,43	0,02	12,22	12,10	11,90	12,04	0,07	11,82	11,91	11,93	11,89	0,03
C18:1	30,50	30,66	30,76	30,82	0,07	29,46	29,54	29,64	29,88	0,09	29,59	29,40	29,28	29,53	0,07
C18:2	2,80	2,81	2,89	2,81	0,02	1,94	2,58	2,68	2,65	0,18	2,75	2,67	2,75	2,69	0,02
C18:3	0,23	0,22	0,23	0,22	0,00	0,16	0,21	0,16	0,21	0,02	0,20	0,21	0,21	0,21	0,00
C20:0	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	0,03	ND	0,00
C20:4	0,04	ND	0,04	0,04	0,00	ND	0,08	ND	ND	0,00	0,00	0,08	0,09	0,04	0,02

¹Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%

ND: não detectado

Os ácidos de cadeia longa (C18) totalizaram, em média, para todos os grupos e tempos estudados, 44,56 % do total de ácidos graxos do creme de leite. No entanto, não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) para o parâmetro tempo de estocagem de creme de leite pasteurizado e os ácidos graxos considerados.

Figura 4 - Representação gráfica do perfil de ácidos graxos no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

Os valores encontrados por Paschoal et al. (2007), com relação à predominância dos ácidos oléico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0), em pesquisa realizada com leite bovino *in natura* estão de acordo com os encontrados neste estudo.

A Figura 5 apresenta uma comparação entre os ácidos graxos predominantes verificados na Figura 4, em g/100g, nas amostras analisadas de acordo com os três diferentes grupos de CCS.

Figura 5 - Representação gráfica do perfil de ácidos graxos predominantes no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

O presente estudo demonstrou não haver relação entre a quantidade de células somáticas do leite destinado à produção de creme de leite pasteurizado e o perfil dos principais ácidos graxos que constituem este produto, exceto para o ácido oléico (C18:1) que apresentou diferença ($P < 0,05$) entre os grupos de baixa e intermediária e baixa e alta CCS.

Yadav et al. (2007) também não observaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$) no perfil de ácidos graxos (g/100g) quando compararam as quantidades percentuais presentes no leite *in natura* e bebidas lácteas fermentadas típicas da Índia.

No entanto, JURCZAK e SCIUBIZ (1981) afirmam que apenas em determinados níveis de CCS observam-se relação com a concentração de AGL e, de acordo com SALIH e ANDERSON (1979), a influência das células é progressivamente menor com o aumento da contagem. A concentração de ácidos graxos totais em leites provenientes de vacas com mastite é cerca de 4% menor,

enquanto que a de AGL é aproximadamente 47% maior do que em leites negativos para mastite (RANDOLPH & ERWIN, 1974).

Entretanto, outros autores observaram efeito positivo entre a quantidade de AGL com o nível de CCS (SALIH & ANDERSON, 1979; BACHMAN et al., 1988), contrariando este trabalho que ao estudar o perfil de AGL em creme de leite encontrou 30,69g/100g de ácido oléico para o grupo de baixa CCS contra 22,18g/100g no grupo de alta CCS.

A alta CCS está relacionada à degradação de ácidos graxos de cadeia longa, principalmente ácido palmítico (C16:0). No presente estudo, a concentração de ácido palmítico diminuiu com o aumento da CCS, porém as diferenças não foram significativas ($P>0,05$).

No entanto, a concentração de ácido oléico (C18:1) foi menor nos cremes com CCS intermediária e alta, em relação ao grupo de baixa contagem de CS, o que pode ser devido à atividade lipolítica sobre os ácidos graxos de cadeia longa.

AZZARA e DIMICK (1985) reportaram que a atividade média da LLP no leite proveniente de quartos com mastite subclínica foi 27% maior do que a média de atividade da enzima no leite de quartos não mastíticos.

A Figura 6 apresenta os resultados de cromatografia gasosa para obtenção de perfil dos ácidos graxos presentes nas amostras com 30 dias de estocagem de creme de leite produzidos com leite contendo 100.000, de 400.000 a 500.000 e mais de 750.000 células somáticas. Pode-se observar a predominância dos ácidos oléico, palmítico, mirístico e linoléico em todas os grupos estudados.

Figura 6 – Cromatogramas exibindo o perfil de AG obtidos a partir de CS de amostras de creme de leite com 30 dias de fabricação dos grupos de baixa, intermediária e alta CCS.

Com relação ao perfil de ácidos graxos no leite bovino, e no respectivo creme, sabe-se que o mesmo é fortemente relacionado com a composição da dieta (GONZÁLES et al., 2003). Em particular, a alteração no perfil de ácidos graxos de produtos lácteos, parece estar associada à variedade, qualidade e quantidade de ingredientes fornecidos nas dietas dos animais produtores de leite. De acordo com Murphy et al. (1990), a alimentação de vacas leiteiras com óleo de canola e girassol diminuiu em 20-40% a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 e C16:0) e aumentou em 55-80% a proporção de ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite.

Ashes et al. (1992) trabalharam com vacas leiteiras suplementadas com canola protegida (750g/dia), contendo 5% de C16:0, 3% de C18:0, 51% de C18:1, 29% de 18:2 e 11% de C18:3 e observaram a diminuição na proporção de C12:0, C14:0 e C16:0

e aumento na proporção de C18:1, C18:2 e C18:3 na composição da gordura do leite.

Verificou-se, ainda em estudo de Paschoal et al. (2007), que a alimentação de vacas holandesas com uma dieta contendo 21% de soja extrusada e 5 mg de selênio apresentou aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia longa no leite. Da mesma forma, Schingoethe et al. (1996) encontraram maior concentração de ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos poliinsaturados no leite de vacas alimentadas com soja extrusada e semente de girassol.

No presente estudo, tendo em vista que foi observada a presença de, aproximadamente, 30,00, 2,70 e 0,20% dos ácidos graxos C18:1; C18:2 e C18:3, respectivamente, de acordo com Gonzáles et al. (2003), pode-se apontar para o baixo risco de oxidação e conseqüente produção de *off-flavor* ou sabor oxidado no creme de leite pasteurizado.

Em contrapartida, as enzimas com atividade lipolítica, como a LLP, as lipases presentes nas células somáticas e as lípases microbianas, predispõem à ocorrência de sabor rançoso em função da quebra de ácidos graxos de cadeia longa em ácidos graxos de cadeia curta (RANDOLPH & ERWIN, 1974; MURPHY *et al.*, 1989; RENEAU & PACKARD, 1991). De fato, a LLP catalisa a quebra dos triglicerídeos do leite, produzindo ácidos graxos livres, sobretudo os de cadeia curta como o butírico, caprílico e capróico, os quais são responsáveis por defeitos de sabor (DOWNEY, 1980) devido ao forte *flavor* que possuem. Observa-se pela Tabela que os ácidos de cadeia curta diminuem suas quantidades de acordo com o aumento da CCS, porém sem diferenças significativas para Tuckey a 5%.

Na Figura 7 e Tabela 20 estão apresentados os resultados referentes à razão entre os ácidos graxos saturados e insaturados encontrados no creme de leite pasteurizado. Os dados apresentados na Figura 6 são em função do tempo (1, 10, 20 e 30 dias) e dos grupos de alta, intermediária e baixa contagem de células somáticas. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos tempos de estocagem do creme de leite e grupos de CCS.

Figura 7 - Evolução da relação entre ácidos graxos saturados e insaturados no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

Porém, analisando a Tabela 24, ao considerar as médias das análises de todo o período em que o produto permaneceu armazenado sob refrigeração de 5° C, os grupos baixa e intermediária e baixa e alta CCS, houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando verificada a razão entre os ácidos graxos saturados e insaturados. Entretanto, não se verificou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de intermediária e alta CCS.

Tabela 24 – Resultados de índice de iodo e da relação entre ácidos graxos saturados e insaturados do creme de leite pasteurizado (g/100g) ao longo de 30 dias de estocagem¹.

Ácidos Graxos	CCS (x 1.000.mL ⁻¹)			EPM
	<100	400-500	>750	
índice de iodo	35,58 ^a	32,06 ^b	32,01 ^b	1,18
saturados/ insaturados	0,58 ^a	0,54 ^b	0,54 ^b	0,01

¹ Médias das amostras de 4 repetições analisadas em duplicata.

Médias na mesma linhas, com diferentes letras minúsculas, diferem significativamente (P<0,05).

Os ácidos saturados estiverem em maiores quantidades em relação aos insaturados para todos os grupos e tempos do presente trabalho, tendo variado entre 53,9 até 58,1% em relação aos insaturados.

Gonzalez et al. (2003) ao estudarem a produção de sorvete constatarem resultados semelhantes ao deste estudo, uma vez que verificaram a presença de 69,29% de ácidos graxos saturados em relação aos insaturados. Resultados também semelhantes aos obtidos por Ramaswamy et al (2001), ao estudarem o perfil de ácidos graxos do leite bovino *in natura*.

De acordo com a Tabela 24, foi verificada, para o índice de iodo, diferença estatística (P<0,05), entre a média dos experimentos realizados em todos os tempos do estudo, para os grupos baixa e intermediária e baixa e alta CCS. Não foi constada diferenças significativas (P>0,05) entre os grupos intermediária e alta CCS. Os resultados verificados apontam para uma possível influência dos níveis de CCS selecionados neste estudo sobre índice de iodo.

Em virtude de não existirem à disposição trabalhos que relacionem estas duas variáveis, torna-se necessário a realização de novos estudos sejam realizados na tentativa de elucidar os conceitos em questão.

Os valores de índice de iodo, calculados a partir dos resultados obtidos na cromatografia gasosa representam o grau de insaturação das amostras avaliadas. VERRUMA & SALGADO 1994 comparando o leite de vacas ao de búfalas encontraram 34,1 de índice de iodo no leite de vaca, dados que se assemelham aos encontrados no presente estudo.

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam as relações entre os três ácidos graxos predominantes no creme de leite pasteurizado de acordo com os grupos de baixa, intermediária e alta CCS e seus comportamentos durante os 30 dias de estocagem.

Figura 8 - Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de baixa CCS no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

Figura 9 - Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de CCS intermediária no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

Figura 10 - Representação gráfica da relação entre os principais ácidos graxos no grupo de alta CCS no creme de leite durante 30 dias de estocagem.

Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre as interações dos ácidos em questão com os grupos de células somáticas e o tempo de estocagem.

A escolha por estas relações se deu em virtude da presença considerável dos ácidos graxos C16:0, C18:1 e C14:0 de 33,40; 29,85 e 10,06% respectivamente, ou seja, as maiores quantidades relativas ao total dos ácidos graxos encontrados no creme de leite pasteurizado.

O que se pode verificar a partir das mesmas Figuras 7, 8 e 9 é que a relação entre os ácidos palmítico (C16:0) e oléico (C18:1) tiveram uma representatividade de quantidades a maior, de aproximadamente, 3,5 vezes a relação entre os ácidos palmíticos (C16:0) e mirístico (C14:0) e oléico (C18:1) e mirístico (C14:0).

Grummer (1991) verificou que o leite bovino é composto de 70% de ácidos graxos saturados, 25% de ácidos graxos monoinsaturados e 5% de ácidos graxos poliinsaturados. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, cerca de 30% são de cadeia longa (C18) e o restante corresponde a ácidos graxos de cadeias curtas e médias.

No presente estudo as médias dos ácidos graxos de cadeias curta, média e longa entre os grupos de CCS e no decorrer do período de estocagem não apresentaram diferenças estatísticas ($P>0,05$). As porcentagens encontradas para estes ácidos, na mesma sequência, foram de 8,15, 47 e 44%.

Paschoal et al. (2007) encontraram resultados similares ao estudar leite bovino *in natura*. Seus resultados apresentaram 13,24; 41,00 e 45,16 g/100g para os ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, nesta sequência.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

a- O leite *in natura* apresentou diferenças significativas para a gordura no grupo de baixa contagem de células somáticas em relação aos demais grupos.

b- Observou-se um maior teor de proteínas no leite *in natura*, no grupo de animais com alta contagem de células somáticas.

c- A CCS não influenciou as características físico-químicas e microbiológicas estudadas no leite semidesnatado pasteurizado durante os 28 dias de armazenamento.

d- Não foram observados efeitos da CCS sobre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados durante o período de armazenamento de 30 dias do creme de leite pasteurizado.

e- Independentemente da quantidade de células somáticas no leite destinado à produção de creme de leite, o tempo de estocagem não influenciou as características físico-químicas e microbiológicas do leite semidesnatado e do creme de leite.

f- Os leites semidesnatados apresentaram maior concentração de β -caseína, enquanto que as demais frações de caseína não sofreram influência da CCS.

g- Os ácidos de cadeia longa (C18) são predominantes no creme de leite pasteurizado.

h- A diminuição do teor de ácido oléico, associada ao aumento da CCS, indicou maior atividade lipolítica sobre os ácidos graxos de cadeia longa no produto ao longo do período de 30 dias de armazenagem.

7. Referências Bibliográficas

AIE - Agência de Informação EMBRAPA, **Agronegócio do leite.**

Disponível

em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html> Acesso em: 20 jan 2009.

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

[AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, VA: AOAC, 1995.

[APHA] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington: APHA, 1992.

ASHES, J.R.; WELCH, P.ST.V.; GULATI, S.K. et al. Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seeds. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1090-1096, 1992

AULDIST, M.J.; COATS, S.J.; ROGERS, G.L; McDOWELL, G.H Changes in the compositional of milk from normal and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28-36, 1998.

AZZARA, C.D.; DIMIK, P.S. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 3171-5, 1985.

BALLOU, L.U. et al. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, p. 2186-95, 1995.

BACHMAN, K.C. et al. Effect of pregnancy, milk yield, and somatic cell count on bovine milk fat hydrolysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 71, p. 925-31, 1988.

BARBANO, D.M.; M.A.; SANTOS, M.V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, E.Suppl., E 15-E19, 2006.

BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L. . Major Advances Associated with the Biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n.4, p. 1235-1243, 2006.

BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, P.J.; KOHN, R.A.; PALMQUIST, D.L. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids on ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2564-2573, 2000.

BIBALKE, D. The effect of high somatic cell count on the quality of dairy products. **Dairy Food Sanitation**, v. 4, p. 67-68, 1984.

BLIGH, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n.18, p. 911-917.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Mastitis. In:_____. **Veterinary Medicine**. 7. ed. London:Baillière Tindall, 1991. p.501-559.

BOBE, G.; BEITZ, D.C.; FREEMAN, A.E.; LINDBERG, G.L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46: 458-463, 1998.

BRASIL. Portaria nº 166, de 5 de Maio de 1998. Cria grupo de trabalho para analisar e propor programa e medidas visando ao aumento da competitividade **Diário Oficial da União**, Brasília. p.42. Maio, 1998. Seção 1.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no estado de Goiás. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Anais do I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Editora UPF, p. 301-306, 2004.

CARVALHO, D.A Comunicado Técnico: O Brasil no cenário mundial de lácteos. **EMBRAPA Gado de Leite**, Juiz de Fora – MG, out., 2006.

CLEGG, R.A.; BARBER, M.C.; ERNENS, L. et al. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v.70, p.3-14, 2001.

CORASSIN, C.H. **Determinação e avaliação de fatores que afetam a produtividade de vacas leiteiras: aspectos sanitários e reprodutivos**, Piracicaba, 2004, 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens),

Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP).

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite bovina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

CRUDDEN, A., FOX, P.F., KELLY, A.L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk, **International Dairy Journal**, v.15, p.305-313, 2005.

DAHMER, A.M. **Gestão da Qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul**, Campo Grande, 2006, 220 p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

DOWNEY, W.K. Review of the progress of dairy science: flavour impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, p. 237-52, 1980.

EARLY, R. **Tecnologia de los Productos Lácteos**. Zaragoza, Acribia, 2000. 459p.

EL-DEEB, S.A.; HASSAN, H.N. Changes in the cow's milk composition as affected with mastitis infection. **Alexandria Journal of Agricultural Research**, v. 32, p. 163-174, 1987.

EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** – Gado de Leite. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/>. Acesso em: 25 jan. 2009.

ESCOBAR, J.E. **Fabricacion de Productos Lácteos**. Zaragoza, Acribia, 2002. 343p.

FERNANDES, A.M. **Efeito dos níveis de células somáticas sobre a qualidade do leite integral obtido por processo UAT direto**, 2007, 109 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP).

FITZ-GERALD, C.H.; DEETH, H.C.; KITCHEN, B.J. The relationship between the levels of free fatty acids, lipoprotein lipase, carboxylesterase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cell count and other mastitis indices in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, p. 253-65, 1981.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 1 ed. São Paulo: Lemos, 2000, 175 p.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 424p, 2002.

FOX, P.F. et al. **Fundamentals of cheese science**. New York: Aspen, 2000. 587 p.

FOX, P.F, KELLY, A.L., Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, v 16, p. 707-715, 2006.

FOX, P.F, McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**, 3ª ed., University College Cork, Ireland, 2006, 801p.

GONZALEZ, S.; DUNCAN, S.E.; O'KEEFE, S.F. et al. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.70-77, 2003.

GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3244-3257, 1991.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n.1, p. 216-222, 2005.

HAENLEIN, G.F.W.; SCHULTZ, L.H.; ZIKAKIS, J.P. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p. 1017-1024, 1973.

HARMON, R. J. **Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts**. Journal of Dairy Science, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

[IAL] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 1. 3. ed. São Paulo: IAL, 1985.

JAYARAO, B.M.; DONALDSON, S.C.; STRALEY, B.A.; SAWANT, A.A.; HEGDE, N.V.; BROWN, J.L. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451-2458, 2006.

JURCZAK, M.E.; SCIUBISZ, A. Studies on the lipolytic changes in milk from cows with mastitis. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 36, p. 217-9, 1981.

KAYLEGIAN, K.E. e LINDSAY, R.C. Handbook of milk fat fractionation technology and application. Champaign: AOAC Press, 1995.

KENNELLY, J.J; GLIMM, D.R. The biological potential to alter the composition of milk. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p.23-56, 1998.

KJAERBYE, H. Quality aspects of UHT cream. **Bulletim of International Dairy Federation**, n 315, p 25-34, 1996.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.M.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk SCC on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1205-1213, 1998.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

LYNCH, J.M.; BARBANO, D.M. Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldahl nitrogen analysis: collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 81, p. 763-774, 1998.

MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D.M.; RUDAN, M.A.; BOOR, K.J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 264-274, 2000.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília: MA, 1980.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução Normativa 68 de 23 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físicos Químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Brasília: MA, 2006.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Instrução normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/index.htm>. Acesso em 24/10/2008.

[MAPA] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do creme de leite. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4349>. Acesso em 05 de novembro de 2008.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, G. A. **Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos**

segundo sua contagem de células somáticas. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.

MARQUES, L.T.; BALBINOTTI, M.; FISCHER, V. Variations in the milk chemical composition according to somatic cell count. In: **II Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**, 2., 2002, Ribeirão Preto, Brazil.

MITCHELL, G.E.; FEDRICK, I.A.; ROGERS, S.A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 2. cheddar cheese from farm bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 41, p. 12-14, 1986.

MILLER, R.H.; EMANUELSSON, U.; PERSSON, E.; BROLUND, L.; PHILIPSSON, J.; FUNKE, H. Relationships of somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 33, p. 209-223, 1983.

MORAES, C.R. **Qualidade bacteriológica de leite bovino de mistura, *in natura* e beneficiado, e detecção sorológica de brucelose em rebanhos da região metropolitana de Porto Alegre-RS**, 2005, Porto Alegre-RS, 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Rural do Rio Grande do Sul (URRS).

MORELLI, A.M.F. ***Escherichia coli* O157: H7: Ocorrência em ambiente de produção de leite na microrregião de Viçosa, adesão em diferentes superfícies e resistência a sanitizantes**, Viçosa - MG, 2008, 192 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV).

MÜLLER, E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção de mastite **Anais do II Sul – Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**. Editora NUPEL, p. 206-217, 2002.

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, p. 7-16, 1984.

MURPHY, S.C. et al. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, p. 620-6, 1989.

MURPHY, J. J.; McNEILL, G.P.; CONOLLY, J.F. et al. Effect on cow performance and milk fat composition of including full fat soybeans and rapeseeds in the concentrate mixture for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.57, p.295, 1990.

NEEDS, E.C.; ANDERSON, M.; MORANT, S.V. Interaction of factors which influence the extent of lipolysis during milking and storage of raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 203-10, 1986.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.25, n.1, p.191-95, jan-mar, 2005.

NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-Practice**, v. 15, p. 11-18, 1994.

O'BRIEN, B.; MEANEY, W. J.; McDONAGH, D.; KELLY, A. **Influence of somatic cell count and storage interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation**. Australian Journal of Dairy Technology, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2001.

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

OLIVEIRA, R.P.S. **Condições Microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**, Piracicaba-SP, 2005, 97p., Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP).

PACKARD, V.S.; GINN, R.E. Interrelationships between select quality test and levels of milk components. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 11, p. 577-81, 1991.

PASCHOAL, J.J. **Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada orgânica de selênio sobre a composição, teor de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas**, 2007, 79 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP).

PHILPOT, W.N. Milk quality and mastitis control: past, present and future. In: **Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**, 2., 2002, Ribeirão Preto.

PHILPOT, W. N. Economics of mastitis control. In: JARRET, J. A.

Veterinary Clinics of North America – Symposium on Bovine Mastitis, v. 6, n. 2, p. 233-245, 1984

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Origem e significado das células somáticas. In: **Vencendo a luta contra a mastite**. Naperville: Milkbuzz, 2002. p. 28-37.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

RAMASWAMY, N.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A. et al. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2144-2151, 2001

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E. Influence of mastitis on properties of milk. X. fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v. 57, p. 865-869, 1974.

REIS, J.F. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciências Rurais**, Santa Maria – RS, v.37, n. 4, 2007.

RENEAU, J.K.; PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v. 11, p. 4-11, 1991.

RODRIGUES, J.N. **Reestruturação por Mistura e Interesterificação da Gordura do Leite com Óleo de Milho**, São Paulo–SP, 2002, 119p., Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Área de Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

ROGERS, S.A.; SLATTERY, S.L.; MITCHELL, G.E.; HIRST, P.A.; GRIEVE, P.A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 3. individual proteins. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 44, p. 49-52, 1989.

ROSSI JÚNIOR, O.D.; VIDAL-MARTINS, B.M.; SALOTTI, B.M.; BÜRGER, K.P.; CARDOZO, M.V.; CORTEZ, A.L.L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 27-32, 2006.

SALIH, A.M.A.; ANDERSON, M. Observations on the influence of high cell count on lipolysis in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, p. 453-62, 1979.

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

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. **Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite**. Higiene Alimentar, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SCHINGOETHE, D.J.; BROUK, M.J.; LIGHTFIELD, K.D. et al. Lactational responses of dairy cows fed unsaturated fat from extruded soybeans or sunflower seeds. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1244-1249, 1996.

SCHULTZ, L.H. Somatic cell in milk: physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 125-131, 1977.

SOMERS, J.M.; O'BRIEN, B.; MEANEY, W.J.; KELLY, A.L. Heterogeneity of proteolytic enzyme activities in milk samples of different somatic cell count. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 45-50, 2003.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2402-2411, 1998.

VAN-AARDT, M.; DUNCAN, S.E.; MARCY, J.E. et al. Effect of antioxidant (alfa- tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.872-880, 2005.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E.; SENYK, G.F. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 230-242, 1987.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M.. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia. Agrícola**, vol.51, n.1, p. 131-137, 1994

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; ROSSI JUNIOR, O.D.; PENNA, A.L.B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 698-704, 2005.

WALSTRA, P. **Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos lácteos**. Madrid, Espanha. Ed acribia, 2001.

WALSTRA P, Wouters, J.T.M., GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**, 2ª ed., Boca Raton, Florida: EUA, 2006, 781p.

WEAVER, J.C.; KROGER, M. Protein, casein and noncasein protein percentages in milk with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 878-881, 1976.

YADAV, H., JAIN, S., SINHA, P.R. Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* an *Lactobacillus casei*. **International Dairy Journal**, v 17, p. 1006-1010, 2007.

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