

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FERNANDA ANTUNES MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS COM A ESTABILIDADE DO
LEITE BOVINO

PONTA GROSSA

2022

FERNANDA ANTUNES MARTINS

CARACTERIZAÇÃO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS COM A ESTABILIDADE DO
LEITE BOVINO

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Zootecnia pela
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Área de Produção Animal.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana de Souza
Martins.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Fischer.

PONTA GROSSA

2022

M386 Martins, Fernanda Antunes
Caracterização de variáveis relacionadas com a estabilidade do leite bovino
/ Fernanda Antunes Martins. Ponta Grossa, 2022.
63 f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana de Souza Martins.
Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Fischer.

1. Acidez natural. 2. Cálcio iônico. 3. Estabilidade ao etanol. 4. Lactose. 5. Qualidade do leite. I. Martins, Adriana de Souza. II. Fischer, Vivian. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <http://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDA ANTUNES MARTINS

"Caracterização de variáveis relacionadas com a estabilidade do leite bovino"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 01 de agosto de 2022.

Profa. Dra. Adriana de Souza Martins – (UEPG)
Presidente

Profa. Dra. Ana Luiza Bachmann Schogor - (UDESC)
Membro Externo

Profa. Dra. Marina Tolentino Marinho – (UEPG)
Membro Interno

Prof. Dr. Victor Bruno Pedrosa - (UEPG) - Suplente
Suplente

Documento assinado eletronicamente por Adriana Aparecida Telles, Secretário(a), em 29/07/2022,



às 11:17, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por Marina Tolentino Marinho, Professor(a), em 02/08/2022, às 16:42, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por Adriana de Souza Martins, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em 13/08/2022, às 10:11, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por Ana Luiza Bachmann Scheger, Usuário Externo, em 29/08/2022, às 15:45, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 1074100 e o código CRC 566D74D5.

Aos meus pais, Rosana e Vanderley, por todo amor, carinho, educação e incentivo.
Ao meu namorado, Daniel, por todo amor, compreensão e incentivo.

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus, por ter me guiado e me amparado nos momentos de dúvidas e dificuldades.

A Prof^a. Dr^a. Adriana de Souza Martins pela orientação, conselhos, conhecimentos compartilhados e confiança. Agradeço de coração pela oportunidade de realizar este trabalho.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Vivian Fischer por toda ajuda, orientação, esclarecimentos e todo o suporte para a realização das análises estatísticas.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG pelo suporte a pesquisa em meio a pandemia da COVID.

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Aos colegas de laboratório por toda a ajuda na realização das análises e tabulação dos dados. A técnica de laboratório Denise por todos os esclarecimentos, ajuda na preparação das soluções e empréstimos de reagentes.

A Prof^a. Dr^a. Marina Tolentino Marinho e Prof. Dr. Paulo Ricardo Los que participaram do projeto do queijo compartilhando conhecimentos, muito obrigada por compartilharem a arte de produzir queijos! Foi uma experiencia incrível.

A indústria Lactalis que possibilitou a realização desta pesquisa e aos técnicos que gentilmente enviaram as informações dos questionários.

A todos que me apoiaram e tornaram possível este trabalho, muito obrigada! Que Deus abençoe cada um de nós.

Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir
(Steve Jobs)

RESUMO

Um dos fatores que comprometem a qualidade do leite é a falta da estabilidade frente ao álcool. A instabilidade do leite causa prejuízos à indústria na produção de derivados lácteos, uma vez que o leite precipita quando submetido ao tratamento térmico. O objetivo da pesquisa foi analisar a estabilidade do leite de produtores do Estado do Paraná, por meio da prova do álcool sob seis concentrações e relacionar com os fatores que possam interferir sobre a estabilidade. Foram coletadas amostras de leite dos tanques de resfriamento dos produtores, sendo as coletas realizadas duas vezes no verão e duas vezes no inverno, gerando 425 e 389 amostras, respectivamente, totalizando 814 amostras. As propriedades foram classificadas de acordo com o nível de intensificação dos sistemas de produção: a pasto com suplementação (PS) e confinamento (CO). No laboratório, às amostras foram submetidas às análises de teste do álcool, acidez titulável e concentração de cálcio iônico (Ca_i), além da composição química do leite, contagem de células somáticas (CCS) e contagem padrão em placas (CPP). Foram realizadas análises descritivas e de correlação entre as variáveis. Na análise de variância foram avaliados a estação do ano (inverno ou verão) e o sistema de produção (PS ou CO). As análises de regressão logística foram calculadas para determinar a probabilidade de ocorrência de leite instável não ácido (LINA) nas concentrações alcoólicas de 72 e 78 °GL. Na análise de regressão linear múltipla, a estabilidade do leite foi considerada como a variável dependente. A estabilidade do leite foi maior no inverno e apresentou menores teores de Ca_i em relação ao verão. Quanto ao sistema de produção, verificou-se que as vacas mantidas em confinamento produziram leite com maior estabilidade e teor de lactose em comparação com as vacas criadas sob pastejo. A estabilidade teve correlação negativa com o Ca_i e positiva com o teor de lactose. A acidez titulável apresentou correlação positiva com a estabilidade, possivelmente devido à elevada acidez natural observada. A incidência de LINA considerando o álcool a 72 °GL foi de 12,16% e no álcool a 78°GL foi de 34,64%. Na regressão logística de risco de $LINA_{72}$ apenas as variáveis Ca_i e lactose foram determinantes, enquanto no risco de $LINA_{78}$ as variáveis determinantes foram o Ca_i , a acidez titulável, a lactose e o nitrogênio uréico no leite. Na regressão linear múltipla, a lactose (r^2 parcial = 0,13) e o Ca_i (r^2 parcial = 0,06) foram as variáveis que apresentaram incremento linear significativo para a estabilidade do leite, no entanto, o modelo explica apenas 26,6% (r^2 total = 0,266) da variação total. Nas condições de produção da pecuária leiteira do Paraná, a ocorrência de $LINA_{72}$ foi baixa, sendo mais frequente no verão e no sistema de produção a pasto com suplementação. As variáveis determinantes e comuns ao $LINA_{72}$ e $LINA_{78}$ foram as concentrações de Ca_i e lactose. Portanto, comprova-se que a ocorrência do LINA no Estado do Paraná foi baixa e as causas foram multifatoriais.

Palavras-chave: acidez natural; cálcio iônico; estabilidade ao etanol; lactose; qualidade do leite.

ABSTRACT

One of the factors that compromises the milk quality is the loss of stability in the face of alcohol. The milk instability impairs the industry, in the production of dairy derivatives, since milk precipitates when subjected to high temperatures during thermal processing. The objective of the research was to analyze the milk stability from producers in the State of Paraná, through the alcohol test under six concentrations and to relate it to the factors that may interfere with the stability. Milk samples were collected from the producers' cooling tanks, being collected twice in the summer and twice in the winter, generating 425 and 389 samples, respectively, totaling 814 samples. The properties were classified according to the level of intensification of the production systems: pasture with supplementation (PS) and confinement (CO). In the laboratory, the samples were submitted to alcohol test, titratable acidity and ionic calcium concentration (Ca_i), chemical composition, somatic cell count (SCC) and standard plate count (SPC). Descriptive and correlation analyzes were performed. In the analysis of variance the season of the year (winter or summer) and the production system (PS or CO) were evaluated. Logistic regression analyzes were calculated to determine the probability of occurrence of unstable non-acid milk (UNAM) at alcohol concentrations of 72 and 78 °GL. In the multiple linear regression analysis, milk stability was considered as the dependent variable. Milk stability was higher in winter and presented lower levels of Ca_i compared to summer. Regarding the production system, it was found that cows kept in confinement produced milk with greater stability and lactose content compared to cows raised under grazing. Stability was negatively correlated with Ca_i and positively correlated with lactose content. The titratable acidity showed a positive correlation with stability, possibly due to the high natural acidity observed. The incidence of UNAM considering alcohol at 72°GL was 12.16% and in alcohol at 78°GL it was 34.64%. In the logistic regression of risk for UNAM₇₂, only the variables Ca_i and lactose were determinants, while in UNAM₇₈ the determinant variables were Ca_i , titratable acidity, lactose and milk urea nitrogen. In the multiple linear regression, lactose (partial $r^2 = 0.13$) and Ca_i (partial $r^2 = 0.06$) were the variables that showed a significant linear increase for milk stability, however, the model explains only 26.6 % (total $r^2 = 0.266$) of the total variation. Under the production conditions of dairy cattle in Paraná, the occurrence of UNAM₇₂ was low, more frequently in the summer and in the pasture production system with supplementation. The determining and common variables for UNAM₇₂ and UNAM₇₈ were Ca_i and lactose concentrations. Therefore, it is proven that the occurrence of UNAM in the State of Paraná was low and the causes were multifactorial.

Key-words: natural acidity; ionic calcium; ethanol stability; lactose; milk quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva das características físico-químicas do leite dos rebanhos analisados no Estado do Paraná.....	43
Tabela 2 - Percentual de observações (%) (produtores x número de dias avaliados) dos teores de composição química e parâmetros físico-químicos de amostras de leite de tanques resfriadores e níveis recomendados pela IN nº 77 do MAPA (2018)	45
Tabela 3 - Análise descritiva da temperatura do leite dos tanques de resfriamento (TempTR), do volume de leite de cada propriedade, do número de ordenhas, do número de vacas ordenhadas, da distância e do tempo de transporte do leite das propriedades até a indústria dos rebanhos leiteiros no Estado do Paraná.....	46
Tabela 4 - Rotas realizadas pelos caminhões isotérmicos com o número (n) de observações (produtores), frequência (%) e os municípios compreendidos por cada rota.....	47
Tabela 5 - Coeficientes de correlações lineares entre as variáveis de estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (Ca _i), acidez titulável (AT), gordura (G), proteína (P), lactose (Lac), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), nitrogênio uréico no leite (NUL), temperatura do leite no tanque de resfriamento (TempTR), relação gordura/proteína (G/P), distância da propriedade até a indústria (Dist) e tempo de transporte (TT).....	48
Tabela 6 - Valores médios das variáveis físico-químicas do leite, de composição, temperatura do leite no tanque de resfriamento (TempTR), volume de leite, número de vacas ordenhadas, número de ordenhas diárias em função da estação do ano (inverno ou verão) e do sistema de produção: confinado (CO) ou pastejo com suplementação (PS).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
AT	Acidez titulável
BEN	Balanco energético negativo
CCS	Contagem de células somáticas
CMETL	Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite
CN	Caseína
CO	Confinamento
CPP	Contagem padrão em placas
DCAD	Diferença cátion-aniônica da dieta
Dist	Distância da propriedade até a indústria
ECC	Escore de condição corporal
ESD	Extrato seco desengordurado
G	Gordura
G/P	Relação gordura/proteína
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
Lac	Lactose
LINA	Leite instável não ácido
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Matéria seca
NUL	Nitrogênio uréico no leite
PS	Pasto com suplementação
P	Proteína
pH	Potencial hidrogeniônico
PDR	Proteína degradável no rúmen
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
ST	Sólidos totais
TempTR	Temperatura do leite no tanque de resfriamento
TT	Tempo de transporte
TJ	<i>Tight junctions</i>
UTH	<i>Ultra high temperature</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
Cl^-	Ânion cloreto
SO_4^{2-}	Ânion sulfato
β	Beta
Ca_i	Cálcio iônico
KCl	Cloreto de potássio
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_4^+	Íon amônio
H^+	Íon hidrogênio
κ	Kappa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ	15
1.2.1 Sistemas de produção.....	16
1.3 EXIGÊNCIAS NA QUALIDADE DO LEITE PELAS INDÚSTRIAS NA REGIÃO..	18
1.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE	19
1.5 FATORES QUE ALTERAM A ESTABILIDADE DO LEITE.....	20
1.5.1 Proteínas do leite	20
1.5.2 Deficiência nutricional.....	22
1.5.3 Estresse térmico.....	24
1.5.4 Doenças metabólicas	25
1.5.5 Fatores genéticos	26
1.5.6 Saúde da glândula mamária.....	27
1.5.6 Metodológicos	27
1.6 PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS COM A ESTABILIDADE DO LEITE BOVINO	36
2.1 INTRODUÇÃO	36
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.2.1 Análises de composição química do leite.....	40
2.2.2 Análises de estabilidade e de acidez titulável	40
2.2.3 Análise da concentração de cálcio iônico.....	41
2.2.4 Análise Estatística	42
2.3 RESULTADOS	43
2.4 DISCUSSÃO	51

2.5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS	63

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da bovinocultura de leite é uma das principais atividades econômicas do agronegócio brasileiro, gerando renda para mais de um milhão de produtores e empregos no segmento. No ano de 2019 o valor bruto da produção primária de leite cru atingiu R\$ 34,91 bilhões (BRASIL, 2019) sendo o sétimo maior valor dentre os produtos agropecuários nacionais.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite bovino, atrás somente dos Estados Unidos e da Índia (FAO, 2019). De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2020 a produção de leite brasileira foi de 35,4 bilhões de litros. O estado de Minas Gerais é o líder nacional, com produção de 9,7 bilhões de litros de leite, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul com produções de 4,4 bilhões e 4,2 bilhões de litros, respectivamente (IBGE, 2020).

O município de Castro (Paraná) foi denominado como “a Capital Nacional do Leite” (Lei Federal nº 13.584, de 26 de dezembro de 2017), produzindo 363,9 milhões de litros. Este mantém-se na primeira posição do *ranking* dos municípios de maior produção, seguido dos municípios de Carambeí (Paraná) e Patos de Minas (Minas Gerais) com produções de 224,8 milhões e 195,0 milhões de litros, respectivamente (IBGE, 2020).

Além dos indicadores de produção, vem crescendo o interesse, tanto das indústrias e cooperativas quanto dos produtores, nos parâmetros de qualidade do leite com a finalidade de garantir a saúde da população e a qualidade dos produtos lácteos. Neste sentido, as Instruções Normativas (IN) determinam a identidade e os padrões de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.

Atualmente, está em vigor em todo o território nacional a IN nº 77 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 2018. As principais alterações em relação à IN nº 62 foram em relação à contagem de células somáticas (CCS) e contagem padrão em placas (CPP), em que os produtores devem apresentar médias geométricas trimestrais de, no máximo, 500.000 células/mL e 300.000 UFC/mL, respectivamente (BRASIL, 2018).

Outro parâmetro importante quando se refere à qualidade do leite é a estabilidade. De acordo com a IN nº 77, o leite não deverá coagular na prova do alizarol na concentração alcoólica mínima de 72 °GL para que possa ser aceito e submetido ao processamento industrial. O teste do álcool/alizarol é realizado diariamente nas propriedades leiteiras, por se tratar de um método rápido, e é umas das provas obrigatórias antes da captação do leite pelo caminhão e na plataforma de recebimento dos laticínios. A realização do teste do álcool tem a finalidade de estimar a estabilidade das proteínas do leite, pois ele mensura indiretamente a estabilidade do leite ao tratamento térmico e ao pH (MARQUES *et al.*, 2007).

Equivocadamente, o leite que coagula na prova do álcool é interpretado como leite ácido, no entanto, de acordo com Fischer *et al.* (2012) amostras que precipitam no teste e apresentam resultados normais de acidez titulável ou pH, são denominadas de leite instável não ácido (LINA). Portanto, fatores não relacionados à acidez do leite também podem estar associados com a instabilidade das proteínas do leite, principalmente das caseínas, caracterizando o LINA (MARQUES *et al.*, 2007).

Segundo Fischer *et al.* (2012) a incidência de LINA no Brasil tem sido grande, em aproximadamente metade do leite analisado, gerando mal entendimento entre a indústria e o produtor, e também perdas econômicas, pois o LINA é rejeitado pelas indústrias devido ao risco com problemas de estabilidade, principalmente se este produto for destinado para a produção de leite *ultra-high temperature* (UHT).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ

O Estado do Paraná possuiu em torno de 110.000 produtores de leite, em que 86% produzem até 250 litros de leite/dia e a maioria dos produtores possui área de 18 a 43 hectares, com um sistema de produção baseado na pastagem e suplementando a dieta dos animais com o concentrado (IDR-PARANÁ).

Segundo a Secretaria de Agricultura e de Abastecimento do Paraná (Seab) a região sudoeste tem sido a maior produtora de leite de todo o Estado, obtendo uma produção de aproximadamente um bilhão e 200 milhões de litros de leite em 2016. A região sudoeste produziu 25% de todo o leite do Estado, em seguida vem as regiões oeste (21%) e centro-oriental (16%).

De acordo com a classificação de Köppen-Geiger (1948), no Paraná domina o clima do tipo C (mesotérmico). O clima Cfa - subtropical é caracterizado por verões quentes, mais de 30 mm de chuva na estação seca e com poucas geadas. Nos meses mais quentes a temperatura média é superior a 22 °C, e nos meses mais frios é inferior a 18 °C. Esse clima é encontrado nas regiões Norte, Oeste, Sudoeste, no Oeste da Serra do Mar e do Vale do Ribeira.

Já na região de Curitiba, nos Campos Gerais, Sul e parte do Sudoeste do Terceiro Planalto predomina o clima Cfb – temperado que é caracterizado por verão ameno, sendo que a temperatura média nos meses mais quentes não ultrapassa 22 °C, com geadas severas e frequentes. As chuvas são uniformemente distribuídas durante o ano com precipitação de 1.100 a 2.000 mm, sem estação seca.

1.2.1 Sistemas de produção

Os sistemas de produção de leite podem ser classificados em extensivo (animais a pasto), semi-intensivo (animais a pasto com suplementação volumosa) e intensivo (animais em confinamento), os quais se diferem pelo tipo de instalação, conservação das forragens, fornecimento do concentrado, manejo adotado e área ocupada.

Segundo dados do Levantamento Top 100 elaborado pelo *MilkPoint* (2022), as vacas leiteiras das fazendas Top 100 são mantidas em sistema de confinamento, com nenhum ou praticamente nenhum acesso a pastagem (77%). Apenas 14% das propriedades adotam o sistema de produção a pasto. Em relação ao tipo de alojamento, a maioria das propriedades opta pelo *free stall* (48%), seguidos do *compost barn* (29%), das propriedades que optam por mais de um tipo de alojamento (13%), piquetes em pastagem rotacionada (7%) e com menor expressão os piquetes para descanso (3%).

No sistema de produção a pasto, os animais vão até o pasto para pastorear, podendo ser fornecida a suplementação com concentrado e volumoso no cocho após o término da ordenha. Segundo Cecato *et al.* (2002) a baixa produtividade nesse sistema é consequência da baixa fertilidade natural dos solos e adoção de manejos inadequados. Além disso, os animais podem sofrer *stress* térmico se os piquetes não possuírem sombra natural, como árvores. Nesse sistema, deve-se respeitar a altura

das forragens de entrada e saída dos animais, sendo o planejamento forrageiro essencial para garantir o fornecimento de volumosos em quantidade e qualidade.

No tipo de alojamento em confinamento *free stall* os animais ficam soltos em uma área cercada e coberta, possuindo acesso livre para alimentação e para caminhadas, cada animal possui uma cama para descanso, forrada geralmente com areia, serragem ou de colchão de borracha. Neste sistema, deve ser dada uma atenção especial às necessidades básicas dos animais, respeitando as dimensões das instalações e espaçamentos dos cochos, fornecimento de conforto térmico com a utilização de aspersores de água e ventiladores, com a finalidade de garantir o bem-estar dos animais e aumento da produtividade.

Outro tipo de alojamento em confinamento é o *tie stall* onde os animais são alojados em barracões totalmente fechados e mantidos confinados, geralmente por correntes no pescoço (FELTON, 2011). O barracão possui ventilação forçada, por meio de placas evaporativas em uma extremidade e ventiladores e exaustores em outra extremidade do barracão.

O sistema de confinamento *compost barn* consiste em um barracão coberto para descanso das vacas, sendo a área revestida com serragem, sobras de corte de madeira e esterco compostado. O sistema oferece aos produtores uma alternativa para elevar a produtividade, possibilita maior conforto e higiene aos animais, contribui para a redução dos problemas de casco e pernas, diminui a contagem de células somáticas, aumenta a detecção do cio e a produção de leite e diminui o odor e a incidência de moscas.

Há escassez de pesquisas que avaliaram o efeito dos sistemas de produção sobre a estabilidade do leite. No entanto, Martins *et al.* (2007) observaram que quanto maior o grau de especialização das propriedades, menor o percentual de casos de mastite, contribuindo para a obtenção de um leite com qualidade.

Segundo Werncke *et al.* (2016) com o atendimento dos requerimentos nutricionais dos animais, têm-se maior disponibilidade de nutrientes para a síntese dos componentes do leite na glândula mamária e assim, maior produção de leite. Além disso, quanto maior o aporte nutricional, principalmente energético, mais estável o leite será no teste do álcool. Portanto, independente do sistema de produção adotado pelo produtor, o atendimento às necessidades nutricionais é crucial para a produção de um leite de qualidade e com alta estabilidade.

1.3 EXIGÊNCIAS NA QUALIDADE DO LEITE PELAS INDÚSTRIAS NA REGIÃO

Com o intuito de garantir uma matéria-prima de qualidade, as indústrias e cooperativas desenvolveram um sistema de pagamento do litro de leite a partir do preço base e com as bonificações ou penalizações aos produtores. Esse sistema de pagamento traz benefícios para a indústria, com a melhoria da qualidade da matéria-prima, e para o produtor, que tem o seu produto valorizado e, conseqüentemente, consegue um melhor preço pelo litro.

No município de Carambeí (Paraná) fica uma das sedes da indústria Lactalis, o maior grupo lácteo e a maior captadora de leite do Brasil, sendo que em 2020 o volume de captação foi de 2,7 bilhões de litros de leite (ABRALEITE, 2021). O grupo é responsável por marcas tradicionais como Itambé, Cotochés, Boa Nata, Galbani, Poços de Caldas, Santa Rosa, DoBon, Societé, Président, Parmalat, Elegê e Batavo.

O Pool Leite é uma entidade de produtores, operada pelas Cooperativas Castrolanda, Frísia e Capal, cujos objetivos são mediar as relações entre produtores e indústrias da Intercooperação, organizar os processos de pagamento por volume e qualidade e sistematizar a logística de coleta do leite nas propriedades.

São atribuídas bonificações no preço do leite aos produtores que atendem os seguintes indicadores: volume de leite entregue, capacidade de estocagem na propriedade (24 ou 48 horas), acesso a propriedade (permitindo o tráfego de caminhão toco, *truck* ou carreta), temperatura de resfriamento do leite e o credenciamento de boas práticas na fazenda (BPF). Características microbiológicas e nutricionais do leite podem refletir em bonificações ou penalizações, como a contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), percentual de gordura e de proteína. Os produtores podem receber penalizações de acordo com a presença de antibióticos e/ou inibidores, alterações na crioscopia e alizarol fora do padrão das indústrias (POOL LEITE, 2019).

Em relação ao alizarol fora do padrão, as indústrias utilizam um sistema de rastreabilidade da carga. Após a identificação do produtor fora do padrão é realizado a aplicação de descontos de 2,0% sobre a produção de leite mensal, no entanto, se persistir o problema por 15 dias o desconto será de 4,5% e se persistir por 30 dias o desconto sobe para 7,0% (POOL LEITE, 2019).

A razão da importância da prova do alizarol é que ela é realizada para estimar a estabilidade térmica do leite (FISCHER *et al.*, 2012). A estabilidade térmica do leite é importante principalmente para as indústrias, pois o processamento de leite com menor estabilidade implica em aumento da deposição de resíduos sólidos nas placas de troca de calor do pasteurizador e também nos sistemas de processamento do leite UHT, em consequência disso, a indústria teria que parar todo o sistema operacional e realizar a limpeza do sistema, ocasionando aumento dos custos de produção (MARTINS *et al.*, 2018).

Existem poucas referências na literatura avaliando a incidência de casos de baixa estabilidade no Estado do Paraná (MARX *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2013; FAGNANI *et al.*, 2014; FAGNANI *et al.*, 2016), no entanto, a estabilidade ainda é um problema a ser solucionado.

1.4 ESTABILIDADE TÉRMICA DO LEITE

Entende-se por estabilidade térmica a capacidade do leite em suportar elevadas temperaturas no processamento sem sofrer coagulação ou gelificação visível (SINGH, 2004).

Um dos métodos mais utilizados, pela indústria para estimar a estabilidade térmica do leite é o teste do álcool/alizarol. A metodologia do teste é a seguinte: amostras de leite são misturadas na mesma proporção com a solução de álcool etílico, homogeneizadas e verifica-se a formação ou não dos coágulos (BRASIL, 2018).

Na prova do alizarol o processo de coagulação do leite explica-se pela ação desnaturante e desidratante do álcool. Quando este é adicionado ao leite ocorre o colapso da região C-terminal da k-caseína, aumento do pKa dos resíduos glutamato e aspartato e redução da solubilidade do cálcio e dos fosfatos da micela de caseína. Além disso, ao expor o interior hidrofóbico da micela de caseína, ocorre a aglomeração das micelas caracterizando a coagulação do leite (O'CONNELL *et al.*, 2006).

A interpretação dos resultados da prova do álcool/alizarol conforme Tronco (2010) é a seguinte: amostras que apresentam a coloração final pardo-avermelhado e sem coagulação são classificadas como leite normal (14-18 °Dornic (°D)), coloração pardo-avermelhado e com coagulação fina é leite com acidez de 19 a 21 °D, coloração

amarela e com coagulação é leite com acidez superior a 21 °D e coloração violeta é leite alcalino ou fraudado com água.

Com a intenção de captar um leite de maior estabilidade térmica, muitas indústrias vêm aumentando a concentração alcoólica utilizada, aumentando o rigor do teste e assim, aumentando o percentual de leite rejeitado por problemas de instabilidade ao teste do álcool (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015). Segundo Negri (2002) o aumento da graduação alcoólica pode aumentar a ocorrência de resultados falsos positivos no teste, no entanto, estas não apresentam correlação elevada com a resistência térmica.

O colostro e leites oriundos de vacas no final da lactação também coagulam no teste e não são processados pela indústria (HORNE, 2016). Segundo Holt (2004) o leite oriundo de vacas na fase final da lactação e com mastite é alcalino devido ao aumento da permeabilidade do epitélio mamário, possibilitando a passagem de íons e proteínas, ocasionando a alteração dos constituintes do leite e a elevação do pH.

1.5 FATORES QUE ALTERAM A ESTABILIDADE DO LEITE

As causas de instabilidade do leite são multifatoriais e em muitos casos desconhecidas, portanto, a prevenção da ocorrência de LINA é a melhor solução, pois torna-se difícil a correção da estabilidade do leite por meio de práticas de manejo na propriedade. Segundo Stumpf *et al.* (2013) a estabilidade do leite pode ser alterada pelas suas propriedades, por variações naturais e incontroláveis.

1.5.1 Proteínas do leite

De acordo com a IN nº 77 o teor mínimo de proteína total no leite cru refrigerado deve ser de 2,9 g/100g (BRASIL, 2018). As proteínas do leite bovino são distribuídas em 80% de caseínas e 20% de proteínas do soro. As frações de caseína são subdivididas em α (α_{s1} , α_{s2} -CN), β (β -CN) e κ (κ -CN) e são mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas (TRONCO, 2010). As frações do soro do leite são subdivididas em β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina do soro, imunoglobulinas e lactoferrina (LIVNEY, 2010).

As caseínas são fosfoproteínas que possuem inúmeros radicais fosfatos ligados ao aminoácido serina (P-Ser). São sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária e a sua concentração média no leite bovino é de 24-28 g/L (SGARBIERI, 2005).

A proposta de conformação das micelas de caseína que mais ganha suporte é a de Walstra (1990). Segundo o autor, as micelas de caseína são agregadas em formatos esféricos entre 40 e 300 nm de diâmetro, de formato irregular e são formadas por submicelas, ligadas por grupamentos de fosfato de cálcio.

As micelas apresentam variações conforme a composição das submicelas, podendo ser formadas por α , β e κ -CN; ou por α e κ -CN apenas. A κ -CN possui caráter hidrofílico, é estável na presença do cálcio iônico (Ca_i) e, dessa forma, projeta-se na parte externa da micela e protege o interior da micela. Esta é composta pelas subunidades α e β -CN que são hidrofóbicas e instáveis na presença do Ca_i (WALSTRA, 1990).

As micelas de caseína possuem a predominância de cargas elétricas negativas, que são equilibradas pela presença do cálcio ligado à proteína. Quando há aumento da concentração do Ca_i , aumenta-se o cálcio ligado à micela, havendo uma redução da carga negativa. Com isso reduz-se a força de repulsão eletrostática entre as micelas e aumenta-se a força de atração entre elas, facilitando o processo de coagulação quando em contato com a solução alcoólica (BARROS *et al.*, 1999) e, portanto, maior susceptibilidade à instabilidade do leite durante o processamento térmico. O aumento do fluxo de Ca_i da corrente sanguínea para o leite é justificado por várias razões que serão esclarecidas adiante.

As concentrações das frações de caseína variam de acordo com o estágio da lactação e encontram-se constantes durante a fase intermediária da lactação (KRUIF; HUPPERTZ, 2012). Barbosa *et al.* (2012) evidenciaram que quando comparadas com amostras de leite estáveis, as amostras de LINA apresentaram maiores concentrações de β -CN e de proteína total, porém menores teores de κ -CN. Segundo Swaisgood (2003) a β -CN possui um C-terminal hidrofóbico dominante, sendo considerada a caseína mais hidrofóbica e instável na presença do Ca_i .

1.5.2 Deficiência nutricional

A deficiência nutricional é um dos principais fatores associados com casos de LINA, pois um período de restrição alimentar, como ocorre em épocas de vazio forrageiro, pode reduzir a proporção da subunidade de κ -CN, e também aumentar o espaço entre as células do epitélio alveolar da glândula mamária (MARTINS *et al.*, 2018).

Stumpf *et al.* (2013) em estudo com vacas da raça Jersey e submetidas à 50% de restrição alimentar, encontraram que o aumento da permeabilidade das *tight junctions* (TJ) da glândula mamária está positivamente associado com a redução da estabilidade do leite ao teste do álcool devido ao desequilíbrio salino. As TJ são estruturas que separam o lúmen alveolar (conteúdo apical) do fluido intersticial (conteúdo basolateral) desempenhando importante função como barreira, pois impede a passagem de íons ou pequenas moléculas entre o sangue e o leite (STELWAGEN; SINGH, 2014).

Um dos indicadores do aumento da permeabilidade das TJ seria a elevação da concentração de lactose no sangue (STELWAGEN; SINGH, 2014). A lactose, o principal carboidrato do leite, é o único açúcar que é sintetizado a partir da glicose na glândula mamária. A enzima lactose sintase, formada pela galactosiltransferase e α -lactoalbumina, é a responsável pela síntese da lactose a partir de glicose e galactose. A fase final da síntese de lactose ocorre no aparelho de Golgi. Após a síntese, a lactose é transportada por vesículas citoplasmáticas para o lúmen alveolar, onde é secretada (HETTINGA, 2019).

Por essa razão, pequenas concentrações de lactose no sangue são indicativas da sua passagem do lúmen alveolar para a corrente sanguínea devido ao aumento da permeabilidade das TJ. Além disso, também ocorre a redução do teor de lactose no leite (STUMPF *et al.*, 2013).

Segundo Stumpf *et al.* (2013) outro parâmetro indicativo do aumento da permeabilidade das TJ é a elevação da concentração de sódio no leite. Chavez *et al.* (2004) encontraram maiores teores de íons, como o cloro, sódio e o potássio em amostras de leite instáveis comparadas com amostras estáveis. Segundo os autores, esses minerais aumentam a força iônica, diminuem a constante dielétrica do meio,

enfraquecendo a barreira de energia, e assim facilitando a aglomeração das micelas de caseína, causando a precipitação do leite.

Além do fator nutricional, o estágio de lactação também pode alterar a permeabilidade das TJ. Segundo Stumpf *et al.* (2020) a porcentagem de leite instável no álcool 63,2 °GL foi maior em vacas em estágio avançado de lactação.

Durante o período de restrição alimentar, o déficit energético é a principal causa de instabilidade no leite, especialmente no início da lactação, quando as vacas passam pelo balanço energético negativo (BEN) (MARTINS *et al.*, 2018). No entanto, segundo Schmidt (2014), o desequilíbrio da relação proteína/energia da dieta também é um fator predisponente para a ocorrência de LINA.

Em um estudo, Schmidt (2014) avaliou a recuperação da estabilidade do leite através do suprimento das exigências de proteína e/ou energia de vacas em lactação. O autor constatou que no período de recuperação da estabilidade, a dieta com atendimento de 100% das exigências de proteína e energia dos animais recuperou a estabilidade na concentração alcoólica de 72 °GL. Já a dieta com atendimento de 100% das exigências de energia e restrição de 50% de proteína recuperou a estabilidade para 68,84 °GL e a dieta com atendimento de 100% das exigências de proteína e restrição de 50% de energia reduziu mais ainda a estabilidade do leite, sendo instável no álcool 62 °GL e também ocasionou a redução do peso vivo corporal e perda de escore de condição corporal (ECC).

Os resultados do fornecimento de uma dieta desbalanceada na relação proteína/energia são alterações metabólicas e ruminais que podem alterar a composição do leite, além do aumento da incidência de problemas reprodutivos no rebanho (SCHMIDT, 2014).

Martins *et al.* (2019) avaliaram o efeito do processamento do amido (floculado ou moído) e da relação proteína degradável no rúmen (PDR): proteína não degradável no rúmen (PNDR) sobre a estabilidade do leite. Os autores observaram que na dieta composta por milho moído e com baixa relação PDR/PNDR (95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS) houve aumento do consumo de MS, da produção de leite e da estabilidade do leite ao teste do álcool e ao aquecimento à 140 °C. Não houve efeito do processamento do grão ou da degradabilidade da proteína bruta nos teores de κ -CN. Além disso, observou-se que as vacas alimentadas com a dieta de baixa digestibilidade apresentaram maiores teores de κ -CN 1 glicosiladas em relação a dieta

de alta digestibilidade. De acordo com Bijl *et al.* (2014) o aumento desta caseína foi associado a micelas de menor diâmetro, que apresentam maior tempo de coagulação e coágulos mais firmes na produção de queijos em comparação ao menor teor de κ -CN glicosiladas e de maior diâmetro (GLANTZ *et al.*, 2010).

Martins *et al.* (2021) observaram que a parcial substituição de milho moído por polpa cítrica e com o uso de tamponante (bicarbonato de sódio associado ou óxido de magnésio) não alteraram o volume de leite produzido, nem as concentrações de Ca_i no leite, bem como a estabilidade do leite das vacas submetidas ao tratamento térmico. No entanto, as vacas que receberam apenas milho moído apresentaram baixo pH urinário, indicando maior acidificação sanguínea quando comparadas com as vacas que receberam a substituição por polpa cítrica e com tamponante. Desse modo, a intensidade da acidificação sanguínea pode determinar a concentração de Ca_i no leite e a estabilidade das micelas de caseína (MARTINS *et al.*, 2021). Os autores também constataram que as vacas que receberam a substituição do milho moído por polpa cítrica na dieta apresentaram redução da estabilidade térmica à 140 °C, principalmente devido ao menor consumo de matéria seca e assim, menor disponibilidade de nutrientes para a síntese de leite.

1.5.3 Estresse térmico

A maior incidência de casos de LINA ocorre em épocas de elevadas temperaturas e umidade relativa do ar (MARTINS *et al.*, 2018). Segundo Polsky e Von Keyserlingk (2017) a principal resposta fisiológica de vacas leiteiras sob o efeito de estresse térmico é a redução do consumo de matéria seca, diminuindo a disponibilidade de nutrientes para a síntese de leite na glândula mamária. Além disso, também ocorre aumento do metabolismo basal devido à ativação do sistema termorregulador para manter a homeostase. A privação de sombra reduz a estabilidade do leite, que foi associado a maior acidez do leite, provavelmente em resposta à acidose metabólica (ABREU *et al.*, 2020).

Hu *et al.* (2016) observaram alterações no nível de transcrição dos genes, principalmente dos marcadores da capacidade de secreção das células epiteliais, quando estas foram submetidas ao estresse térmico, sugerindo ocorrer um distúrbio na função secretora na glândula mamária. Os autores encontraram diminuição

significativa da expressão dos genes da β -CN e butirofilina (BTN1A1 – proteína associada às gotículas de gordura no leite) após 0,5 h a 12 h de exposição térmica. A transcrição do gene da α_{s1} -CN foi maior em comparação com o grupo controle após 12 h. Além disso, também se observou aumento da expressão dos genes Hsps (proteínas de choque térmico) como forma de defesa contra o estresse térmico nas células epiteliais da glândula mamária.

1.5.4 Doenças metabólicas

As doenças metabólicas em vacas leiteiras podem causar perdas de reservas corporais, de produtividade e também alterações nas características físico-químicas do leite (MARQUES *et al.*, 2011). Essas alterações digestivas e/ou metabólicas podem estar associadas com a ocorrência de casos de LINA como ocorre em casos de acidose ruminal e sanguínea (FISCHER *et al.*, 2012).

O quadro de acidose é caracterizado por pH ruminal abaixo de 5,5 e os dois principais fatores que predispõem os animais à ocorrência de acidose ruminal são a alta inclusão de fontes de amido, além do recomendado para a categoria animal em questão, e fornecimento de dietas deficientes em fibra fisicamente efetiva (FDNfe) (MARTINS *et al.*, 2021).

Os rins são órgãos do sistema urinário responsáveis, entre outras funções, pela manutenção do equilíbrio ácido-base do sangue. Quando o pH do sangue torna-se ácido, os rins excretam íons amônio (NH_4^+) a fim de aumentar o pH da urina (MARQUES *et al.*, 2011). O fornecimento de sais aniônicos na dieta com base nos ânions cloreto e sulfatos (Cl^- e SO_4^{2-} , respectivamente) são uma estratégia nutricional muito utilizada nas dietas pré-parto, com o propósito de negativar a diferença cátion-aniônica da dieta (DCAD), prevenindo a ocorrência de hipocalcemia. Através do aumento da concentração de ânions oriundos da dieta, a concentração sistêmica do íon hidrogênio (H^+) também aumenta, diminuindo o pH da urina para valores menores de 7,5.

Martins *et al.* (2015) não observaram efeito do DCAD nas concentrações de $\alpha_{(s1 \text{ e } s2)}$, β -CN e α -LA, no entanto, a concentração da fração de κ -CN diminuiu linearmente com o aumento do DCAD e a de β -LG aumentou de forma linear. Os autores relataram que quando o DCAD aumentou de -71 a 290 mEq/kg de MS, as

concentrações de κ -CN no leite diminuíram 7,69% e a de β -LG aumentou 17,14%. O DCAD também afetou a composição mineral do leite, pois as concentrações de Ca_i e cloreto aumentaram de forma quadrática e linear, respectivamente, com a redução do DCAD. Segundo os autores, a redução do DCAD resultou em aumento do Ca_i no leite devido ao mecanismo compensatório da acidose metabólica que foi diagnosticada nos animais. Marques *et al.* (2011) também constataram que o fornecimento da dieta aniônica para vacas em lactação resultou em acidose metabólica.

Além disso, o DCAD também pode alterar a resistência das caseínas para formar os coágulos quando em contato com a solução alcoólica ou durante o tratamento térmico (MARTINS *et al.*, 2015). Segundo os autores a estabilidade ao teste do álcool e a térmica reduziram linearmente com a redução do DCAD. Assim, com a redução do DCAD de 290 para -71 mEq/kg de MS a concentração alcoólica necessária para visualizar a precipitação do leite foi reduzida 4,6% e a resistência do leite para formar os coágulos durante o tratamento térmico à 140 °C foi reduzida 4,77 minutos.

Portanto, a incidência de casos de acidose ruminal podem levar a acidose metabólica nos animais, resultando em queda do pH da urina e do leite, predispondo o leite a maior instabilidade no teste do álcool (MARQUES *et al.* 2011).

1.5.5 Fatores genéticos

A κ -CN apresenta uma sequência de 169 aminoácidos (Rijnkels, 2002) e possui duas principais variantes genéticas que diferem nas posições dos aminoácidos 136 (Treonina por Isoleucina) e 148 (Aspartato por Alanina), sendo as variantes A e B, respectivamente (Alexander *et al.*, 1988).

Botaro *et al.* (2009) observaram maior predominância do alelo AA do gene da κ -CN nas raças Holandesa e Girolanda e não encontraram associação significativa entre a ocorrência de amostras instáveis ao teste do álcool e as variantes genéticas da κ -CN. No entanto, Robitaille *et al.* (2001) constataram que o leite das vacas que apresentaram uma expressão do alelo B maior do que do alelo A do gene da κ -CN necessitou de maior concentração de etanol para a precipitação do que o grupo com a mesma expressão dos dois alelos.

Mendes *et al.* (2018) constataram maior incidência de casos de LINA em vacas leiteiras mestiças em comparação aos animais da raça Holandesa. Portanto, é possível que as diferenças genéticas associadas aos tipos de κ -CN e outras proteínas lácteas podem alterar a estabilidade do leite ao teste do álcool.

1.5.6 Saúde da glândula mamária

A ocorrência de mastite está associada a alterações nos componentes do leite, se observa a redução nos teores de lactose e proteína, e aumento nas concentrações de íons (LEITNER *et al.*, 2006) devido à redução da capacidade de síntese dos componentes do leite nos alvéolos e aumento da permeabilidade das TJ das células mamárias (OGOLA *et al.*, 2007).

Alguns estudos indicam que o leite ordenhado de vacas com mastite subclínica não influencia diretamente na estabilidade do leite no teste do álcool (FISCHER *et al.*, 2012). Martins *et al.* (2019) avaliaram o efeito da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite e os autores não observaram efeito quando compararam quartos mamários sadios *versus* infectados e de quartos contralaterais. No mesmo estudo, a estabilidade não foi alterada quando os quartos mamários infectados foram classificados de acordo com os agentes patogênicos.

No entanto, outros trabalhos mostram uma relação entre mastite e instabilidade do leite. Oliveira *et al.* (2013) constataram menor estabilidade ao teste do álcool em amostras com alta CCS ($CCS > 500 \times 10^3$ cel/mL). De acordo com Stumpf *et al.* (2013) a mastite pode ocasionar o aumento da permeabilidade das TJ e, conseqüentemente, influenciar na estabilidade do leite. Moussaoui *et al.* (2004) associaram esse aumento da permeabilidade com a inflamação causada pela bactéria *Escherichia coli* e observaram o aumento da passagem de proteínas do soro como a lactoferrina, albumina do soro e IgG para o leite.

1.5.6 Metodológicos

Segundo Zanela e Ribeiro (2017) os primeiros desafios no controle da qualidade do leite são os procedimentos, geralmente, realizados pelos motoristas das transportadoras que são a agitação do tanque de resfriamento e a coleta de amostras.

De acordo com os autores a metodologia de coleta é a seguinte: após o término da ordenha de todas as vacas, ligar o dispositivo de agitação do tanque de refrigeração, ou agitar os tarros de leite, por cinco a dez minutos, dependendo do volume de leite armazenado.

A mensuração da temperatura do tanque de refrigeração também é importante e preconizada pela legislação. De acordo com a legislação vigente, a temperatura do tanque de refrigeração deve ser igual ou inferior a 4,0 °C até três horas após a ordenha, independentemente de sua capacidade em litros (BRASIL, 2018).

Além dos fatores nutricionais e não nutricionais que podem estar influenciando a ocorrência de LINA, pequenas variações na realização do teste do álcool também podem interferir nos resultados (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015).

Entre os fatores metodológicos pode-se citar a correta diluição do álcool (volume/volume) e a manutenção da concentração até a utilização (MARTINS *et al.*, 2018), a temperatura do teste, em que se recomenda a realização do teste do álcool em amostras de leite refrigeradas e não logo após a ordenha, além do pH da solução alcoólica, que deve ser ajustado para próximo da neutralidade (6,9 a 7,1) (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015). Ressalta-se ainda a importância de utilizar volumes iguais de leite e de solução alcoólica conforme recomendação da IN nº 77 (BRASIL, 2018).

1.6 PRODUÇÃO DE DERIVADOS LÁCTEOS

A qualidade do leite influencia diretamente no rendimento dos derivados lácteos (FURTADO, 2016). Segundo Sales *et al.* (2017) vários fatores influenciam no rendimento industrial, como aqueles ligados diretamente ao animal (genética, nutrição e saúde), ou ligados ao processamento da matéria prima na planta industrial (condições de higiene e técnica utilizadas).

O LINA com estabilidade ao teste do álcool/alizarol, igual ou superior a 72 °GL, é estável no teste da fervura, podendo ser submetido ao processo de pasteurização e destinado para a fabricação de derivados lácteos pasteurizados (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015). Estudos mostram que nesta concentração de álcool, o leite também apresentou estabilidade térmica para produção de iogurte batido, sendo que não foram observadas diferenças no tempo de fermentação, pH e viscosidade (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Estudos foram realizados utilizando leites estáveis a 72 °GL e 80 °GL em que se observaram poucas diferenças quanto à composição e rendimento na fabricação de queijos de massas firmes (COSTABEL *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Abreu (2015) produziu queijo prato a partir de leites de diferentes estabilidades e concluiu que o leite cru com estabilidade alcoólica igual ou superior a 72 °GL pode ser utilizado para a produção de queijo prato.

Apesar do LINA possuir estabilidade térmica satisfatória para ser submetido a pasteurização e produção de derivados, as consequências na eficiência de produção na indústria ainda não possuem comprovações científicas.

REFERÊNCIAS

- ABRALEITE. Associação Brasileira de Produtores de Leite. **25° Ranking das maiores empresas de laticínios do Brasil em 2021**. 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/ranking-leite-brasil-2021-captacao-das-maiores-empresas-cai-35-em-2021-230022/#:~:text=Ap%C3%B3s%20assumir%20a%20lideran%C3%A7a%20no,5%25%20no%20seu%20volume%20captado>. Acesso em: 13 jun. 2022.
- ABREU, A. S. **Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a composição do leite bovino**. 2015. Tese (Doutorado em Zootécnica) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- ABREU, A. S. *et al.* Natural tree shade increases milk stability of lactating dairy cows during the summer in the subtropics. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 4, p. 444–447, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0022029920000916>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- ALEXANDER, L. J. *et al.* Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **European Journal Biochemistry**, v. 178, n. 2, p. 395-401, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14463.x>. Acesso em: 10 out. 2021.
- BARBOSA, R. S. *et al.* Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 621–628, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000400019>. Acesso em: 14 set. 2021.
- BARROS, L. *et al.* Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v.9, p.315, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018**. 2018. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/11/2018&jornal=515&pagina=9>. Acesso em: 16 set. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Valor Bruto da Produção Agropecuária**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/vbp-e-estimado-em-r-689-97-bilhoes-para-2020/202003VBPelaspeyresagropecuariapdf.pdf>. Acesso em: 15 set. 2021.

BIJL, E. et al. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 135–141, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.001>. Acesso em: 16 maio 2021.

BOTARO, B. G. et al. Efeito do polimorfismo do gene da kappa-caseína, da raça e da sazonalidade sobre as características físico-químicas, de composição e de estabilidade do leite bovino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2447–2454, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001200022>. Acesso em 14 maio 2021.

CECATO, U. et al. Pastagens para produção de leite. **Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**, v. 2, p. 59–97, 2002.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 2, p. 201–206, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0022029904000172>. Acesso em: 07 maio 2021.

COSTABEL, L. M. Estudio de la relación entre aptitud a la coagulación por cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL. 1., 2009, Pelotas. **Anais [...]** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

FAGNANI, R. et al. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000500002>. Acesso em: 19 maio 2021.

FAGNANI, R. et al. Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável? **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 386–394, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i331848>. Acesso em: 13 out. 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO STAT**. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 15 set. 2021.

FISCHER, V. et al. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1519-99402012000300021>. Acesso em: 24 set. 2021.

FELTON, Courtney. **Evaluation of a pedometer system for prediction of estrus and parturition in dairy cows housed in a tie-stall barn**. 2011. Tese (Master of Science) – University of Alberta, Canadá, 2011.

FURTADO, M. M. **Mussarela fabricação e funcionalidade**. 1 ed. São Paulo: Setembro Editora, 2016.

GLANTZ, M. et al. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1444–1451, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2856>. Acesso em: 10 maio 2021.

HETTINGA, K. A. **Lactose in the dairy production chain**. The Netherland: Elsevier Inc., 2019.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 5, p. 421–434, 2004.

HORNE, D. S. **Ethanol Stability and Milk Composition**. In: MCSWEENEY, P., O'MAHONY, J. (eds) *Advanced dairy chemistry*. New York: Springer, p. 225–246, 2016.

HU, H. et al. The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 1, p. 84–91, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.12375>. Acesso em: 04 nov. 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal. 2020**. Disponível em: http://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/Comunicado-Tecnico-CNA-ed-30_2021.pdf. Acesso em: 14 set. 2021.

IDR-PARANÁ. Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - **IAPAR - EMATER. Bovinocultura de leite**. Disponível em: <https://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Bovinocultura-de-Leite>. Acesso em: 12 jun. 2022.

KOEPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. 1948.

KRUIF, C. G. K.; HUPPERTZ, T. Casein Micelles: Size distribution in milks from individual cows. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4649–4655, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf301397w>. Acesso em: 04 set. 2021.

LEITNER, G. et al. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648-654, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.020>. Acesso em: 17 nov. 2021.

LEVANTAMENTO TOP 100 2022. **Os 100 maiores produtores de leite do Brasil. 2022**. Disponível em: https://www.milkpoint.com.br/top100/top100-2021.pdf?utm_source=top100&utm_medium=download&utm_campaign=marco-2022. Acesso em: 8 jun. 2022.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>. Acesso em: 01 out. 2021.

MARQUES, L. T. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista brasileira de agrociência**, 2007. v. 13, n. 1, p. 91–97. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/28228062_Ocorrencia_do_leite_instavel_a_o_alcool_76_e_nao_acido_lina_e_efeito_sobre_os_aspectos_fisico-quimicos_do_leite. Acesso em: 24 set. 2021.

MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000500021>. Acesso em: 01 nov. 2021.

MARTINS, P. R. G. et al. Produção e qualidade do leite em sistemas de produção da região leiteira de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 212–217, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000100034>. Acesso em: 25 out. 2021.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2650–2661, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8926>. Acesso em: 03 maio 2021.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Principais causas e processamento de leite instável não ácido. **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**. ed. 2018, p. 201-218, 2018.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance and milk protein composition and stability. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4165–4178, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15553>. Acesso em: 07 maio 2021.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Subclinical intramammary infection does not affect bovine milk ethanol stability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135173>. Acesso em: 09 jun. 2022.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary non-fiber carbohydrate source and inclusion of buffering on lactation performance, feeding behavior and milk stability of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 278, n. 2021, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115000>. Acesso em: 25 out. 2021.

MARX, I. G. et al. Ocorrência de Leite Instável não Ácido na Região Oeste do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 1, p. 101–112, 2011. Disponível em:

<https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/1256/1499>. Acesso em: 01 jun. 2022.

MENDES, L. C. C. et al. Análise da ocorrência de leite instável não ácido (LINA) em um rebanho leiteiro e a sua relação com a raça e a fase da lactação. In: Simpósio Sul Leite: desafios e avanços da cadeia produtiva do leite, 8., 2018, Carambeí. **Anais [...]** Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.

MOUSSAOUI, F. et al. Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2923–2931, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73423-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73423-2). Acesso em: 12 nov. 2021.

NEGRI, L. M. **Estudios de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica**. 2002. Master thesis - Litoral National University, Santa Fe, Argentina, 2002.

O'CONNELL, J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 3, p. 312–317, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0022029906001737>. Acesso em: 30 set. 2021.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.237>. Acesso em: 25 jun. 2022.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Composição, contagem de células somáticas e frações de caseína em leites instáveis ao etanol. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 35, n. 1, p. 153–156, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.11481>. Acesso em: 10 set. 2021.

POOL LEITE. **Tabela de pagamento**. 2019.

POLSKY, L.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8645–8657, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>. Acesso em: 03 nov. 2021.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Ensaios preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 9., 2006, Goiânia. **Anais [...]** Goiânia: Gráfica e Editora Talento, 2006.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130022>. Acesso em: 12 out. 2021.

RIJNKELS, M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, v.7, n.3, p.327-345, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1022808918013>. Acesso em: 20 out. 2021.

ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; PETITCLERC, D. Effect of a differential allelic expression of kappa-casein gene on ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.145-149, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0022029900004659>. Acesso em: 13 set. 2021.

SALES, D. C. et al. Relationship between mozzarella yield and milk composition, processing factors, and recovery of whey constituents. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4308–4321, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12392>. Acesso em: 12 maio 2021.

SCHMIDT, F. A. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43–56, 2015.

SEAB. Secretaria de Agricultura e de Abastecimento. **Paraná é o segundo maior produtor de leite do país**. 2016. Disponível em: <https://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Parana-e-o-segundo-maior-produtor-de-leite-do-Pais>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 111–119, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x>. Acesso em: 24 set. 2021.

SILVA, L. C. C. et al. Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78%, em leite bovino. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 55-60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120008>. Acesso em: 15 nov. 2021.

STELWAGEN, K.; SINGH, K. The role of tight junctions in mammary gland function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 1, p. 131–138, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9309-1>. Acesso em: 26 out. 2021.

STUMPF, M. T. et al. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, n. 7, p. 1137–1142, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731113000128>. Acesso em: 14 maio 2021.

STUMPF, M. T. et al. Mammary gland cell's tight junction permeability from dairy cows producing stable or unstable milk in the ethanol test. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 11, p. 1981–1983, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01967-0>. Acesso em: 05 jun. 2022.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003. v.1.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 4. ed. Santa Maria:UFMS, 2010.

WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1965–1979, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3). Acesso em: 05 set. 2021.

WERNCKE, D. et al. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: Abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 506–516, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8396>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R. Desafios do controle da qualidade na coleta e recepção do leite. **VII Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, p. 49–66, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1078437/desafios-do-controle-da-qualidade-na-coleta-e-recepcao-do-leite>. Acesso em: 08 jun. 2021.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. Leite instável não ácido (LINA) do campo a indústria. **VI Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Minicurso-Universidade Federal do Paraná (UFPR), n. 1, p. 1–16, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285594217_LEITE_INSTAVEL_NAO_ACID_O_LINA_DO_CAMPO_A_INDUSTRIA. Acesso em: 08 jun. 2021.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE VARIÁVEIS RELACIONADAS COM A ESTABILIDADE DO LEITE BOVINO

2.1 INTRODUÇÃO

O estado do Paraná é o segundo maior produtor de leite do Brasil, com produção de 4,4 bilhões de litros em 2020 (IBGE, 2020) e grande parte desta produção provém de cooperativas. Segundo o comunicado do Sistema Ocepar (2021) no estado há 58 cooperativas ligadas à agropecuária, sendo oito de laticínios e dentre elas destaca-se a Unium, marca institucional das cooperativas Frísia, Castrolanda e Capal, cooperativas presentes na região dos Campos Gerais.

A região sudoeste do Paraná é a maior produtora em volume, com aproximadamente 1,1 bilhão de litros anuais. No entanto, a região centro-oriental é a que apresenta os maiores índices de produtividade (litros/vaca/ano). A produtividade dos municípios de Castro e Carambeí em 2020 foram de 8.087 e 9.797 litros/vaca/ano (IBGE, 2020), tais produtividades foram superiores, em comparação, com Prudentópolis (localizada na região sudoeste), onde a produtividade foi de 1.922 litros/vaca/ano (IBGE, 2020). A crescente preocupação com o melhoramento genético das vacas leiteiras associada a um manejo adequado e à utilização de tecnologias contribuem para o aumento da produtividade da região, mas apesar do destaque nacional nesse quesito, problemas com a estabilidade do leite têm sido frequentes.

A estabilidade térmica do leite é de extrema importância para as indústrias do setor de lácteos, visto que um leite com alta estabilidade pode ser submetido a elevadas temperaturas sem sofrer o processo de coagulação (LOVEDAY *et al.*, 2021).

A utilização do leite instável por parte da indústria pode ocasionar menor rendimento no processamento industrial, uma vez que este tipo de leite pode apresentar menores teores de lactose, proteína e, em algumas situações, de gordura (FISCHER *et al.*, 2011). Outro problema causado pela instabilidade do leite é que ele pode sofrer precipitação durante o processamento do leite UHT, aderindo-se aos equipamentos e resultando na elevação dos custos de limpeza, aumento no descarte de leite (ROSA *et al.*, 2017), além da redução da qualidade do produto final.

A análise de estabilidade do leite, de acordo com a Legislação, é realizada por meio do teste do álcool/alizarol que é avaliado na propriedade, antes do

carregamento. O teste consiste na mistura de partes iguais de leite e álcool com no mínimo 72 °GL (STUMPF *et al.*, 2016), por meio do qual se avalia a formação de grumos, indicando se o leite sofre precipitação ou não. A precipitação ocorre principalmente pela desidratação das principais proteínas lácteas, as caseínas (MARQUES *et al.*, 2007), permitindo analisar a capacidade do leite em suportar elevadas temperaturas sem sofrer precipitação (coagulação) (SINGH, 2004).

Resultados positivos ao teste do álcool (precipitação) podem ocorrer devido à redução do pH pela fermentação da lactose por microrganismos mesófilos com a produção de ácido láctico, sendo considerado um leite ácido, ou seja, impróprio para o consumo, não devendo ser transportado para a indústria (FONSECA; SANTOS, 2000). No entanto, tem-se observado, em muitos casos, que a principal alteração é a perda da estabilidade da proteína (precipitação positiva) sem haver acidez elevada, sendo considerado neste caso como leite instável não ácido (LINA) (ZANELA *et al.*, 2009). A ocorrência do LINA é um fenômeno complexo, de causas múltiplas, que se caracteriza por alterações físico-químicas do leite, tornando-o instável ao álcool, com acidez titulável entre 14 e 18 °D, sendo, portanto, um leite não ácido (FISCHER *et al.*, 2012).

Existem vários fatores que interferem na estabilidade do leite, entre eles o fator genético (raça do animal, espécie) (DAVIS *et al.*, 2001), idade ou número de lactações, estágio de lactação (OMOARUKHE *et al.*, 2010), fatores nutricionais, fatores ambientais (estresse térmico, estação do ano, manejo), sanidade e contaminação bacteriana (ZANELA *et al.*, 2006). Fatores metodológicos podem interferir nos resultados da prova do álcool, por exemplo, a temperatura das amostras de leite, em que se recomenda a realização do teste em amostras refrigeradas; e o pH da solução alcoólica, que deve ser ajustado/monitorado com frequência para próximo da neutralidade (ZANELA; RIBEIRO, 2018). A estabilidade do leite também pode ser afetada pela concentração de cálcio iônico no leite, em que a estabilidade é reduzida quando o teor de cálcio iônico se eleva (AKKERMAN *et al.*, 2019).

A ocorrência de casos de instabilidade do leite no Paraná é um problema atual, no entanto são escassas as pesquisas sobre o assunto na região (MARX *et al.*, 2011; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2013; FAGNANI *et al.*, 2014; FAGNANI *et al.*, 2016; NEVES, 2021). O LINA já foi diagnosticado em vários estados do país, entre eles o Rio Grande do Sul (MARQUES *et al.*, 2007; ZANELA *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*,

2017), Santa Catarina (ABREU, 2015; THALER NETO *et al.*, 2012), São Paulo (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e Minas Gerais (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

O mapeamento da ocorrência de LINA é importante para avaliar a extensão do problema e buscar sua prevenção/solução, visto que as indústrias realizam penalizações com descontos significativos no preço pago por litro de leite e até mesmo a rejeição do leite instável na prova do álcool.

A indústria tem buscado alimentos *clean label*, conceito de rótulo limpo, a fim de oferecer produtos mais naturais e saudáveis aos consumidores. Prevendo essa mudança de hábitos alimentares, houve a produção pioneira no Brasil, proveniente de uma cooperativa da região, de uma marca de leite UHT sem a adição de estabilizantes, o Naturalle. Segundo o Superintendente de Operações Lácteas Edmilton Aguiar Lemos:

O Naturalle mantém todas as características do Leite UHT Castrolanda, em termos de composição de seus nutrientes, porém, sem aditivos. Esses aditivos são adicionados ao leite para que a proteína do leite seja "protegida", ou seja, não se desnature no processo térmico de ultra pasteurização. Somente matérias primas superiores em termos de qualidade podem ter esse tipo de tratamento industrial.

Para a fabricação deste produto, o leite utilizado deve ser estável a 82 °GL na prova do álcool, possuir baixa contagem bacteriana e de células somáticas, possibilitado pela redução do tempo entre a ordenha na propriedade e o envase na indústria (COMUNICAÇÃO PESSOAL).

Devido à importância do setor leiteiro para a região e sua representatividade em termos de volume e qualidade, a análise da incidência de casos de instabilidade do leite e suas causas merecem ser investigadas, uma vez que irá interferir na qualidade do produto, impactando nos custos de produção para o produtor e para a indústria. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi analisar a estabilidade do leite de produtores do Estado do Paraná, por meio da prova do álcool, e verificar possíveis fatores associados com a estabilidade.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), no período de fevereiro a agosto de 2021 e em parceria com a indústria Lactalis do Brasil, a qual possui uma das unidades industriais no município de Carambeí, localizada na região dos Campos Gerais do Paraná, nas coordenadas

24°55'04" de latitude sul e 50°05'50" de longitude oeste. O clima da região, segundo a classificação de Köppen-Geiger (1948) é o Cfb clima temperado, com verão ameno e com chuvas bem distribuídas durante o ano.

Para a realização das análises, foram coletadas 814 amostras de leite cru do tanque de resfriamento de 319 produtores. As coletas foram realizadas duas vezes no verão (fevereiro e março) e duas vezes no inverno (julho e agosto), totalizando 425 e 389 amostras, respectivamente. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente. A cada produtor foi entregue um questionário (APÊNDICE A), visando obter informações sobre o rebanho e o sistema de produção de leite. As propriedades leiteiras foram classificadas de acordo com o nível de intensificação dos sistemas de produção em: a pasto com suplementação (PS) e em confinamento (CO). Ambos os sistemas de produção forneciam concentrado comercial e forragem conservada (silagem de milho).

Foi abrangido um total de 38 municípios localizados nas principais bacias leiteiras paranaenses: da mesorregião sudoeste foram coletadas amostras de propriedades localizadas nos municípios de Irati, Prudentópolis, São Mateus do Sul, Imbituva, Rio Azul, Ipiranga, Rebouças, Mallet, Teixeira Soares, Guamiranga e Antônio Olinto. Na mesorregião centro-oriental foram coletadas amostras dos municípios de Ponta Grossa, Castro, Jaguariaíva, Palmeira, Arapoti, Reserva, Piraí do Sul, Carambeí e Tibagi. Do norte pioneiro foram Wenceslau Braz, Santo Antônio da Platina, Joaquim Távora, Ibaiti, Tomazina, Guapirama, São José da Boa Vista e Japira. Da mesorregião metropolitana de Curitiba foram os municípios de Campo Largo, Fazenda Rio Grande, Araucária, Lapa, Quitandinha, Balsa Nova e Campo Tenente. Da mesorregião centro-sul os municípios de Pitanga, Boa Ventura do São Roque e da mesorregião norte-central o município de Nova Tebas.

Foi determinada a distância da propriedade leiteira (km) até a unidade de beneficiamento do leite, assim como o tempo (horas) gasto para percorrer a distância e a condição das estradas até a propriedade. Outras variáveis analisadas foram o número de ordenhas realizadas no dia, o tempo de armazenamento do leite na propriedade leiteira, se o produtor tem a capacidade de armazenar, nos tanques resfriadores, por 24 ou 48 horas. A temperatura do tanque de resfriamento (°C) e o volume de leite (litros) foram mensuradas pelo motorista das transportadoras no

momento do transporte do leite na propriedade e, para caracterizar os rebanhos analisados, a raça das vacas leiteiras foi considerada.

As amostras foram armazenadas em frascos plásticos de 200 mL, devidamente identificadas e transportadas em caixas térmicas com gelo reciclável para o laboratório do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL), para a realização das análises laboratoriais. No laboratório, as amostras foram mantidas destampadas sob refrigeração para volatilização do gás carbônico, sendo refrigeradas a 4 °C, a fim de manter a temperatura ideal de resfriamento do leite, segundo a IN nº 77 (BRASIL, 2018). A temperatura do refrigerador foi constantemente monitorada por meio de um termômetro digital.

2.2.1 Análises de composição química do leite

As análises de composição do leite, contagem de células somáticas (CCS) e contagem padrão em placas (CPP) foram realizadas pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), localizada em Curitiba – PR e integrante da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite – RBQL.

As análises químicas do leite e de CCS foram realizadas no equipamento *NexGen (Bentley Instruments®)*, sendo divididas em dois módulos: o módulo FCM (citometria de fluxo), que analisa células somáticas, de acordo com a *International Organization for Standardization (ISO) 13366-2 (2008)*. E o módulo FTS (espectrômetro na região média por transformada de *Fourier*), para a análise dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico no leite, segundo a *ISO 9622 (2013)*. As análises de CPP foram realizadas no equipamento *BactoCount IBC (Bentley Instruments®)* que utiliza a citometria de fluxo para a enumeração da contagem bacteriana individual do leite cru, de acordo com a *ISO 4833-1 (2008)*.

2.2.2 Análises de estabilidade e de acidez titulável

A estabilidade do leite foi analisada de acordo com a metodologia descrita por Tronco (2010), por meio do teste do álcool, nas concentrações 72, 76, 78, 80, 82 e 86 °GL. As soluções alcoólicas foram preparadas/monitoradas da seguinte forma:

encheu-se a proveta com o álcool etílico absoluto 96° GL até atingir a graduação alcoólica desejada e colocou-se o alcoolômetro Gay-Lussac na proveta. Se o teor alcoólico estivesse abaixo do esperado, adicionou-se álcool etílico e se o teor alcoólico estivesse acima do esperado, adicionou-se água destilada até atingir a graduação alcoólica desejada. O pH da solução foi medido em pHmetro, que deve estar entre 6,90 - 7,10 e foi ajustado, conforme o pH, com algumas gotas de ácido clorídrico 0,1 N ou com solução Dornic.

Para a realização da análise de estabilidade, foram pipetados 2 mL de leite e em seguida 2 mL da solução de álcool nas concentrações mencionadas, em placas de Petri. Em seguida a amostra foi homogeneizada e então analisada visualmente, observando a formação ou não de grumos, sendo a presença de grumos classificada como leite instável. A estabilidade foi expressa pela menor concentração alcoólica que promoveu coagulação (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015). As amostras estáveis (sem formação de grumos) na concentração alcoólica de 86 °GL foram consideradas instáveis na concentração de 88 °GL.

A acidez titulável (gramas de ácido láctico/100 mL) foi determinada segundo a metodologia descrita por Tronco (2010), sendo pipetados 10 mL de leite em um erlenmeyer e adicionados de quatro a cinco gotas do indicador ácido-básico fenolftaleína. Em seguida realizou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,11 N (Solução Dornic) até o ponto de viragem, obtido pela coloração ligeiramente rósea. A acidez titulável foi primeiramente mensurada em graus Dornic e em seguida, transformada para gramas de ácido láctico/100 mL por meio da fórmula:

Acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL) = valor obtido da titulação * fator de correção da solução de NaOH/ 10

O leite foi classificado em: a) Leite normal: = acidez entre 0,14 – 0,18 g/100 mL, considerado com pH entre 6,6-6,8; b) Leite ácido: com acidez maior que 0,18 g/100 mL, com pH abaixo de 6,6 e c) Leite alcalino: com acidez menor que 0,14 g/100 mL, com pH acima de 7,0.

2.2.3 Análise da concentração de cálcio iônico

Para a determinação do cálcio iônico das amostras de leite foi utilizado um potenciômetro da marca *Thermo Scientific Orion*® (*Orion Star A214*). O potenciômetro

conta com um eletrodo de íon seletivo para cálcio (Ca) com leitura direta, em mg/L. Para a sensibilização do eletrodo, o mesmo foi mergulhado por no mínimo quatro horas em solução de cloreto de cálcio padronizada (1000 ppm) e com a solução de preenchimento dentro do eletrodo. Para calibração do eletrodo foi utilizada soluções padronizadas de cloreto de cálcio preparadas nas seguintes concentrações: 50 ppm e 500 ppm, em cada solução foram adicionados 1 mL de *ionic strenght adjustor* (ISA) - solução de ajuste iônico de cloreto de potássio na concentração de 4 mol/L. Para determinação do teor de cálcio iônico no leite bovino foram utilizados 50 mL de leite e 1 mL de ISA, sendo homogeneizadas com uma haste de plástico e, posteriormente, o eletrodo foi colocado imerso na amostra, para a leitura da concentração de cálcio iônico no leite (RIBEIRO *et al.*, 2010).

2.2.4 Análise Estatística

Os parâmetros foram analisados primeiramente de forma descritiva, usando o procedimento UNIVARIATE e FREQ do programa estatístico SAS[®] (*Statistical Analysis System*, versão 9.3) para o cálculo de média, desvio padrão e valores máximos e mínimos de cada variável.

A análise do Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis (estabilidade ao etanol, composição do leite, teores de cálcio iônico, temperatura do tanque de resfriamento, volume de leite, número de ordenhas, número de vacas ordenhadas, relação gordura/proteína, distância e tempo de viagem) foi realizada utilizando o procedimento PROC CORR (coeficiente de *Spearman*) do SAS[®]. Sendo consideradas fracas (0 – 0,29), moderada (0,30 – 0,59), fortes (0,60 – 0,89) e muito forte (0,90 – 1,00) (CALLEGARI-JACQUES, 2008).

Na análise de variância (ANOVA) foram avaliados separadamente a estação do ano (inverno ou verão) e sistema de produção (confinamento - CO ou pasto com suplementação - PS), com o procedimento GLM do SAS[®] e a opção *LS means* de Fisher para determinação das médias. Os valores P foram considerados significativos a 5%. Adicionalmente, nas análises de regressão logística foi utilizado o procedimento LOGISTIC do SAS[®] (opção *backward*) para avaliar a probabilidade de ocorrência de LINA₇₂ e LINA₇₈ considerando as seguintes variáveis: cálcio iônico, acidez titulável, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, CCS, CPP, nitrogênio uréico

no leite, temperatura do tanque de resfriamento, volume, número de vacas, distância percorrida e tempo de viagem. Foram retidas no modelo apenas as variáveis que influenciam na ocorrência de LINA e o modelo usado na regressão logística foi:

$$\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_{i1}$$

Onde:

p: é a probabilidade de ocorrência de LINA;

x: é a variável independente;

β : é o coeficiente de regressão.

A análise de regressão linear múltipla foi realizada por meio do pacote estatístico SAS[®] utilizando o procedimento REG (opção de seleção de variáveis *stepwise*), a fim de determinar quais variáveis que afetam a estabilidade do leite, a variável dependente do modelo.

Os dados de CCS e CPP foram transformados em Log₁₀ para as análises estatísticas, porém para facilitar a interpretação foram utilizados os valores originais na apresentação dos resultados.

2.3 RESULTADOS

Os resultados referentes à análise descritiva da composição química e de parâmetros físico-químicos do leite dos rebanhos avaliados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise descritiva da composição química e características físico-químicas do leite dos rebanhos analisados no Estado do Paraná

Variável	N	Média ± desvio padrão	Amplitude
Estabilidade ao etanol (°GL)	814	80±4,94	72 – 88
Cálcio iônico (mg/L)	813	111,81±40,35	29 – 540
Acidez titulável (g/100mL)	813	0,1582±0,0176	0,11 – 0,28
Gordura (g/100g)	751	3,77±0,38	2,11- 5,81
Proteína (g/100g)	756	3,23±0,20	2,56 – 4,06
Relação Gordura/Proteína	749	1,17±0,09	0,59 – 1,80
Lactose (g/100g)	756	4,43±0,19	2,76 – 5,46
Sólidos totais (g/100g)	756	12,37±0,61	9,07 – 14,41
ESD (g/100g)	756	8,62±0,30	6,53 – 10,34
CCS (mil céls/mL)	756	528±410	17 – 3808
CPP (mil UFC/mL)	757	114±489	2 – 9999
NUL (mg/dL)	684	12,23±4,05	4,10 – 30,20

N: número de observações; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas; CPP: contagem padrão em placas; NUL: nitrogênio uréico no leite.

Fonte: A autora.

A estabilidade média do leite das propriedades ao teste do etanol foi obtida na concentração alcoólica de 80 °GL, apresentando grande amplitude, com amostras instáveis no álcool a 72 °GL (12,19%) e outras instáveis no álcool 88 °GL (12,44%). A concentração média de cálcio iônico nas propriedades analisadas foi de 111,81 mg/L e da mesma forma, apresentou grande variação.

Os resultados de acidez titulável variaram de 0,11 a 0,28 g/100 mL, no entanto 89,28% das amostras apresentaram acidez titulável dentro do padrão estabelecido pela IN nº 77 que preconiza o recebimento de amostras de leite cru com acidez titulável de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL (BRASIL, 2018).

Os teores médios de gordura e de proteína foram de 3,77 g/100g e 3,23 g/100g, respectivamente. Considerando esses resultados, foi calculada a relação gordura/proteína (G/P) através da divisão dos teores de gordura pela proteína. O resultado é um indicativo do *status* energético e da saúde dos animais avaliados. A relação G/P média foi de $1,17 \pm 0,09$ e encontra-se próximo da faixa da relação G/P recomendada, de 1,2 a 1,3.

Os teores de lactose em aproximadamente 83% das amostras de leite ficaram acima de 4,3g/100g e o percentual de observações com ST acima de 11,4g/100g foi de 96,2%. Com relação à CCS, a média foi de 528 mil células/mL e a CPP foi de 114 mil UFC/mL. Os valores médios de CCS ficaram acima do preconizado pela IN nº77 (500 mil células/mL) e os de CPP abaixo do preconizado pela Legislação (300 mil UFC/mL).

O nitrogênio uréico no leite (NUL) teve grande variação entre as amostras, com valores de 4,10 a 30,20 mg/dL. Os valores de NUL considerados aceitáveis devem estar entre 10 e 14 mg/dL (ALMEIDA, 2012).

O número de observações da composição química e parâmetros físico-químicos estão descritos na Tabela 2. Os resultados das análises foram separados em intervalos, de acordo com os parâmetros exigidos pela Legislação vigente, a IN nº 77 (BRASIL, 2018).

Tabela 2 – Percentual de observações (%) (produtores x número de dias avaliados) dos teores de composição química e parâmetros físico-químicos de amostras de leite de tanques resfriadores e níveis recomendados pela IN nº 77 do MAPA (2018)

Variável	Intervalos de cada variável e percentual de observações		
Gordura (g/100g)	< 3,0 1,87	-	≥ 3,0* 98,13
Proteína (g/100g)	< 2,9 2,91	-	≥ 2,9* 97,09
Lactose (g/100g)	< 4,3 17,0	-	≥ 4,3* 82,9
Sólidos totais (g/100g)	< 11,4 3,84	-	≥ 11,4* 96,16
Extrato seco desengordurado (g/100g)	< 8,4 20,79	-	≥ 8,4* 79,21
Contagem de células somáticas (mil céls/mL)	< 200 14,83	200 – 500* 40,98	> 500 43,0
Contagem padrão em placas (mil UFC/mL)	< 100 81,7	100 – 300* 11,36	> 300 6,63
Acidez titulável (g de ácido láctico/100mL)	<0,14 7,28	0,14 – 0,18* 89,28	> 0,18 3,44
Estabilidade ao etanol (° GL)	<72 12,19	74 – 78 22,41	≥ 80 65,4
Cálcio iônico. (mg/L)	<80 14,55	80-100 28,48	≥ 100 56,96

* Valores de referência segundo a IN nº 77 (BRASIL, 2018).

Fonte: A autora.

Observa-se que menos de 5% das observações tiveram abaixo dos limites mínimos de gordura, proteína e ST, em concordância com os padrões estabelecidos pela IN nº 77.

Em relação aos valores de CCS, 55,81% das observações tiveram CCS inferior a 500.000 células/mL, sendo compatível com o recomendado pela legislação vigente. Para a CPP o percentual de observações que atenderam a Legislação foi maior, ou seja, 81,7% das amostras apresentaram CPP abaixo de 100.000 UFC/mL.

A grande maioria das observações (89,28%) apresentou valores de acidez titulável de 0,14 a 0,18 g/100mL. Houve maior percentual de amostras de leite consideradas alcalinas (7,28%) em relação às amostras de leite ácidas (3,44%). Observa-se elevada estabilidade do leite no teste do álcool, pois 65,4% das amostras apresentaram estabilidade ao etanol na concentração igual ou superior a 80 °GL. Com

relação ao cálcio iônico, 14,55% das observações apresentaram concentrações inferiores a 80 mg/L e 56,96% tiveram concentrações iguais ou superiores a 100 mg/L.

A média da temperatura do leite dos tanques de resfriamento foi de 3,31 °C (Tabela 3). Preconiza-se que o leite deve ser refrigerado à temperatura máxima de 4,00 °C em até três horas após a ordenha (BRASIL, 2018).

Tabela 3 – Análise descritiva da temperatura do leite dos tanques de resfriamento (TempTR), do volume de leite de cada propriedade, do número de ordenhas, do número de vacas ordenhadas, da distância e do tempo de transporte do leite das propriedades até a indústria dos rebanhos leiteiros no Estado do Paraná

Variável	N	Média ± desvio padrão	Amplitude
TempTR (°C)	806	3,31±0,44	1,40 – 4,00
Volume (L/mês)	801	18484±34802	270 – 336797
Nº ordenhas	783	2±0,25	1 – 3
Nº vacas ordenhadas	764	34,70±52,98	2 – 500
Distância (Km)	522	102,21±48,97	3 – 255
Tempo de transporte (min)	524	327,98±145,28	60 - 720

N: número de observações.

Fonte: A autora.

Com relação ao tipo de ordenha realizada, 5,86% das propriedades utilizam o sistema manual; 40,45% das propriedades trabalham com a ordenha mecânica canalizada e 53,68% utilizam o sistema de ordenha mecânica com balde ao pé. O número de ordenhas diárias nas propriedades foi de duas ordenhas (em 93,74% das propriedades) e apenas 3,96% e 2,30% realizavam uma e três ordenhas, respectivamente.

Quanto ao volume de leite captado houve grande variação, pois a indústria faz a captação do leite de pequenos e grandes produtores, com volumes variando de 270 a 336.797 litros mensais, respectivamente. O número de vacas ordenhadas variou de 2 a 500 vacas leiteiras, sendo que os rebanhos foram compostos das seguintes raças leiteiras: Holandesa (60,26%), Jersey (16,10%), cruzamento da raça Jersey e Holandesa (14,53%) e Girolanda (9,12%).

A distância média das propriedades até a unidade de beneficiamento do leite (UBL), localizada no município de Carambeí-PR, foi de 102,21 km, havendo propriedades com distância de até 255 km. Dessa forma, o tempo de transporte do caminhão foi em média 327,98 minutos (5 horas e 28 minutos) e houve variação de 60 a 720 minutos, uma hora a 12 horas, respectivamente.

No total foram coletadas amostras de 27 rotas distintas e os municípios que compreenderam cada rota podem ser observados na Tabela 4. A frequência de

carregamento do leite pelas transportadoras foi de 24 ou 48 horas, sendo que apenas 10,15% dos produtores possuíam tanques de resfriamento com capacidade de armazenamento de 24 horas e 89,85% transportavam o leite a cada 48 horas.

Tabela 4 – Rotas realizadas pelos caminhões isotérmicos com o número (n) de observações (produtores), frequência (%) e os municípios compreendidos por cada rota

Rota	N	Frequência (%)	Municípios
3	54	6,67	Lapa
6	40	4,94	Carambeí
7	6	0,74	Castro
22	21	2,59	Imbituva, Guamiranga e Prudentópolis
23	21	2,59	Guamiranga, Pitanga e Boa Ventura de São Roque
2450	25	3,09	Arapoti
3106	59	7,28	Guapirama, Arapoti, Santo Antônio da Platina, Japira e Joaquim Távora
3283	4	0,49	Pitanga e Nova Tebas
3669	32	3,95	Castro, Piraí do Sul e Carambeí
3973	41	5,06	Lapa
4114	54	6,67	Araucária, Quitandinha, Lapa, Campo do Tenente, Fazenda Rio Grande, Palmeira e Campo Largo
4785	25	3,09	Palmeira
4874	16	1,98	Palmeira
4887	14	1,73	Carambeí e Castro
5176	1	0,12	Carambeí
5188	31	3,83	Palmeira, Campo Largo, Araucária e Bolsa Nova
5231	17	2,10	Castro
5437	54	6,67	Prudentópolis, Imbituva, Irati, Tibagi, Ipiranga e Guamiranga
5438	41	5,06	Ponta Grossa e Teixeira Soares
5528	55	6,79	Rio Azul, Rebouças, Ponta Grossa, Mallet e São Mateus do Sul
5582	56	6,91	Lapa, Antônio Olinto, São Mateus do Sul e Palmeira
5709	24	2,96	Castro e Carambeí
6074	40	4,94	Reserva, Ipiranga, Tibagi, Guamiranga, Imbituva, Ponta Grossa e Teixeira Soares
6205	30	3,70	Arapoti, Castro e São José da Boa Vista
6281	6	0,74	Palmeira
6324	31	3,83	Jaguariaiva, Arapoti, Tomazina e Wenceslau Braz
7212	12	1,48	Piraí do Sul e Castro

Rota: rota de transporte do leite

Fonte: A autora.

As correlações lineares entre as variáveis apresentaram valores positivos e negativos e são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Coeficientes de correlações lineares entre as variáveis de estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (Ca_i), acidez titulável (AT), gordura (G), proteína (P), lactose (Lac), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), nitrogênio uréico no leite (NUL), temperatura do leite no tanque de resfriamento (TempTR), relação gordura/proteína (G/P), distância da propriedade até a indústria (Dist) e tempo de transporte (TT)

	EST	Ca _i	AT	G	P	Lac	ST	CCS	CPP	NUL	TempTR	G/P	Dist	TT
EST	100	-0,26**	0,23**	0,00	0,11*	0,35**	0,15**	-0,04	-0,11*	0,11*	0,05	-0,08*	0,04	0,05
Ca _i		100	-0,07*	-0,06	-0,09*	-0,12*	-0,11*	0,02	0,05	0,02	-0,05	-0,00	0,17**	0,08
AT			100	0,22**	0,31**	0,28**	0,31**	-0,14*	0,04	0,19**	-0,00	-0,08*	-0,16*	-0,03
G				100	0,59**	0,03	0,89**	-0,03	-0,01	0,19**	-0,10*	-0,01	-0,09*	0,01
P					100	0,11*	0,75**	-0,00	-0,01	0,20**	-0,02	-0,03	-0,09*	-0,04
Lac						100	0,36**	-0,50**	-0,18**	0,10*	0,04	-0,04	0,03	-0,06
ST							100	-0,20**	-0,06	0,21**	-0,04	0,49**	-0,07	-0,02
CCS								100	0,19**	0,02	0,01	-0,03	-0,02	0,04
CPP									100	-0,05	-0,02	-0,01	-0,02	0,02
NUL										100	0,00	0,09*	-0,08	0,07
TempTR											100	-0,11*	-0,15*	-0,09*
G/P												100	-	-
Dist													100	0,47**
TT														100

** Variáveis com correlações significativas <0,01

* Variáveis com correlações significativas <0,05

Valores em vermelho: correlações fracas; azul: correlações moderadas e verde: correlações fortes.

Fonte: A autora

Houve correlação negativa fraca ($P < 0,01$), entre a estabilidade ao etanol e o nível de cálcio iônico no leite (-0,26), indicando que quanto maior o teor de cálcio iônico, menor a estabilidade do leite quando submetido ao teste do álcool. A estabilidade ao etanol também apresentou correlação positiva fraca (0,23) e significativa com a acidez titulável.

A acidez titulável teve correlação positiva fraca (0,22) com o teor de gordura. Quanto a proteína, verificou-se correlações positivas moderadas com a acidez titulável e com o teor de gordura (0,31 e 0,59, respectivamente). A lactose apresentou correlação positiva moderada (0,35) com a estabilidade do leite e positiva fraca (0,28) com a acidez titulável.

Os ST do leite apresentaram correlações positivas moderadas com a acidez titulável (0,31) e com a lactose (0,36) e a correlação foi positiva forte com a gordura (0,89) e proteína (0,75).

A CCS teve correlação negativa moderada com a lactose (-0,50), indicando que a maior CCS no leite pode interferir negativamente no teor de lactose. Quanto a CPP, verificou-se correlação negativa fraca com a lactose (-0,18), no entanto, a correlação da referida variável com a CCS foi positiva fraca (0,19).

O NUL apresentou correlações fracas com o teor de proteína e ST (0,20 e 0,21, respectivamente). Na relação G/P houve correlação positiva moderada com os ST (0,49).

A distância percorrida teve correlação positiva moderada com o tempo de transporte (0,47), ou seja, quanto maior a distância (km) da propriedade até a UBL, maior o tempo de transporte. Houve correlação fraca entre a distância percorrida e o teor de cálcio iônico (0,17). Não houve correlação entre a distância percorrida e o tempo de transporte com a estabilidade e nem com a CCP.

Considerando-se as estações do ano verificou-se que no inverno a estabilidade do leite foi maior ($P < 0,01$) em comparação com o verão, sendo estável nas concentrações médias de etanol de 83,56 °GL e 79,16 °GL, respectivamente (Tabela 6). Por outro lado, as amostras analisadas durante o inverno apresentaram menores concentrações de cálcio iônico comparadas às coletadas no verão, com concentrações médias de cálcio de 92,78 mg/L e 126,07 mg/L, respectivamente.

Tabela 6 – Valores médios das variáveis físico-químicas do leite, de composição, temperatura do leite no tanque de resfriamento (TempTR), volume de leite, número de vacas ordenhadas, número de ordenhas diárias em função da estação do ano (inverno ou verão) e do sistema de produção: confinado (CO) ou pastejo com suplementação (PS)

Variável	Estação do ano			Sistema de produção		
	Inverno	Verão	P	CO	PS*	P
Estabilidade ao etanol (°GL)	83,56	79,16	<0,01	81,97	80,75	<0,05
Cálcio iônico (mg/L)	92,78	126,07	<0,01	107,06	111,78	0,2467
Acidez titulável (g de ácido láctico/100mL)	0,1680	0,1503	<0,01	0,1598	0,1586	0,4666
Gordura (g/100g)	3,83	3,68	<0,01	3,73	3,77	0,3142
Proteína (g/100g)	3,28	3,21	<0,01	3,25	3,23	0,3294
Relação Gordura/Proteína	1,17	1,15	<0,05	1,15	1,17	<0,05
Lactose (g/100g)	4,50	4,43	<0,01	4,51	4,42	<0,01
Sólidos Totais (g/100g)	12,56	12,25	<0,01	12,44	12,37	0,2584
ESD (g/100g)	8,73	8,59	<0,01	8,71	8,61	<0,01
Log ₁₀ (CCS)	12,81	12,90	0,0961	12,76	12,96	<0,05
Log ₁₀ (CPP)	10,31	10,16	0,1487	10,080	10,39	<0,05
NUL (mg/dL)	12,88	12,13	<0,05	12,96	12,06	0,0690
TempTR (°C)	3,36	3,34	0,6420	3,38	3,31	0,1560
Volume (L/mês)	39587	33956	<0,05	60119	13424	<0,01
Nº vacas ordenhadas	70	66	0,1945	112	25	<0,01
Nº ordenhas diárias	2,03	2,04	0,8006	2,11	1,96	<0,01

P: nível de significância. PS*: pastejo com suplementação com silagem de milho e concentrado comercial.

Fonte: A autora.

Durante o inverno, as amostras de leite analisadas tiveram maiores valores de acidez titulável, gordura, proteína, lactose, ST, ESD e relação G/P em relação ao verão. Da mesma forma, o volume de leite produzido foi maior no inverno em comparação com a estação do verão.

Com relação ao sistema de produção, as vacas mantidas no sistema em confinamento produziram leite com maior estabilidade (estável no etanol a 81,97 °GL) comparado com as vacas no sistema a pasto com suplementação (estável no etanol a 80,75 °GL) (P<0,05).

Os teores de lactose e ESD, bem como o volume de leite produzido, foram maiores (P<0,01) no sistema de confinamento, enquanto a CCS e a CPP apresentaram menores valores em comparação com o leite das vacas criadas no sistema a pasto com suplementação.

Na análise de regressão logística de LINA₇₂ (leite instável ao etanol a 72 °GL e não ácido) foram retidas no modelo as variáveis Ca_i e lactose. A equação de regressão foi a seguinte: LINA₇₂= 22,782 + 0,014Ca_i - 6,089Lactose. Portanto, a cada unidade a mais de Ca_i aumentam as chances de ocorrência de LINA₇₂ em 1,014 vezes e a cada unidade a mais de lactose diminuem as chances de ocorrência em 0,002 vezes (P<0,05).

Considerando o LINA₇₈ (leite instável ao etanol a 78 °GL) foram retidas no modelo o Ca_i, a acidez titulável, a lactose e o NUL. A equação foi a seguinte: LINA₇₈ = 16,773 + 0,01Ca_i – 0,155Acidez titulável – 3,439Lactose – 0,092NUL. Portanto, a cada unidade de aumento de Ca_i aumentam as chances de ocorrência de LINA₇₈ em 1,01 vezes e a cada unidade de aumento de acidez titulável, lactose ou NUL, diminuem as chances de ocorrência de LINA₇₈ em 0,856, 0,032 e 0,912 vezes, respectivamente (P<0,05).

A análise de regressão linear múltipla apresentou o seguinte modelo preditivo para a estabilidade do leite: EST = 10,856 – 0,031Ca_i + 0,327Acidez titulável + 9,475Lactose + 0,870CCS – 0,294CPP + 0,106NUL + 0,003Tempo de transporte com um grau de ajuste igual a 26,6% para a variação total (r² total = 0,266). Observou-se que a lactose (r² parcial = 0,13) e o Ca_i (r² parcial = 0,06) foram as variáveis que apresentaram incremento linear significativo para a estabilidade do leite (P<0,01).

2.4 DISCUSSÃO

As amostras de leite avaliadas no presente trabalho são provenientes de propriedades localizadas na maior bacia leiteira do Brasil, possuindo animais especializados para a produção de leite, de alto valor genético e alojadas em instalações de alta tecnologia que proporcionam o bem-estar aos animais, além do acompanhamento constante de técnicos, possibilitando uma alta produtividade e um leite de alta qualidade. Além dos produtores especializados, houve a coleta de amostras de leite provenientes de pequenos produtores, que utilizam o sistema de ordenha manual, com um pequeno número de vacas em lactação e com baixa produção de leite mensal.

Com relação ao leite cru na planta da indústria, um dos parâmetros de qualidade mais importantes é a estabilidade térmica do leite. O alto percentual de amostras de leite estáveis em concentração de etanol ≥80 °GL (Tabela 4) indicam que as condições de nutrição, manejo, ambiência e bem-estar dos rebanhos foram satisfatórias.

As correlações de Pearson observadas na presente pesquisa, em sua maioria, foram consideradas fracas (0 – 0,29) e moderadas (0,30 – 0,59) (Tabela 5). O efeito dos níveis de Ca_i no leite sobre a estabilidade do leite foi verificado neste

trabalho, evidenciando a relação dos íons cálcio sobre as micelas de caseína, conforme descrito por Akkerman *et al.* (2021), onde se verificou que a maior instabilidade das micelas de caseína foi associada aos maiores níveis de Ca_i do leite. Segundo Marques *et al.* (2011) a estabilidade do leite reduz linearmente com o aumento das concentrações de Ca_i e, de acordo com os autores, quanto maior a concentração de Ca_i , menores são o pH da urina e do leite, reduzindo a graduação de álcool necessária para induzir a sua coagulação.

Ao contrário do esperado, a acidez titulável apresentou correlação positiva fraca com a lactose ($P < 0,01$). A lactose atua no equilíbrio osmótico do leite, exercendo impacto no volume de leite produzido (HETTINGA, 2019). De acordo com Marques *et al.* (2007), o teor de lactose no leite está intimamente associado à energia da dieta e à sanidade da glândula mamária. A maioria das amostras apresentaram CPP abaixo de 100.000 UFC/mL (Tabela 4) e esta variável apresentou correlação negativa fraca com o teor de lactose. Portanto, a correlação positiva observada entre a acidez titulável com a lactose indica que não houve a degradação da lactose pelas bactérias mesófilas e, assim, a acidez titulável se manteve na faixa preconizada pela legislação.

A correlação positiva moderada observada entre a estabilidade ao etanol e a lactose, indicam que em amostras instáveis há uma diminuição deste componente do leite. Segundo Stumpf *et al.* (2013), a maior permeabilidade das *tights junctions* da glândula mamária, provoca a saída da lactose para o plasma sanguíneo e assim, ocorre a redução deste componente no leite e aumento dos teores de sódio. Este aumento da permeabilidade, resulta em instabilidade ao etanol devido ao desbalanceamento salino. Martins *et al.* (2019) ao avaliarem o efeito da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite ao etanol, encontraram que a única variável da composição do leite que apresentou correlação positiva com a estabilidade foi a lactose ($r = 0,18$; $P < 0,01$).

Houve uma correlação negativa moderada entre a CCS e a lactose. Cinar *et al.* (2015) observaram que em vacas de segunda lactação, os teores de lactose no leite diminuíram quando a CCS foi alta (> 500.000 células/mL) e segundo Moussaoui *et al.* (2004) a elevação da CCS pode aumentar a permeabilidade das zonas de oclusão entre as células alveolares. Tem sido relatado que alterações na permeabilidade relacionadas a reações inflamatórias nos alvéolos mamários podem

causar alterações nos componentes do leite, como nos teores de proteína, gordura e de lactose (PALES *et al.*, 2005).

Ao contrário do esperado, a estabilidade do leite apresentou correlação positiva fraca ($P < 0,01$) com a acidez titulável. Foi observada pouca incidência de leite ácido nas amostras de leite analisadas (Tabela 4), portanto, a correlação positiva com a estabilidade pode ser devido aos níveis elevados de proteína e fosfatos, que confere acidez natural do leite mais elevada.

O NUL também apresentou correlação positiva fraca ($P < 0,01$) com o teor de proteína do leite. O NUL é um parâmetro indicativo do sincronismo do metabolismo proteico e de carboidratos no rúmen. Valores altos de NUL podem indicar excessos de proteína bruta na dieta, tanto de proteína degradável no rúmen como da proteína não degradável no rúmen, baixa taxa de fermentação ruminal dos carboidratos não fibrosos e aumento da relação G/P do leite (PONCHEKI; CARNEIRO; ALMEIDA, 2021). Apesar da correlação positiva observada, os teores médios de NUL estavam dentro da faixa ideal recomendada (Tabela 6).

A logística de transporte também pode interferir na qualidade do leite que chega na indústria, de modo que, com o aumento da distância percorrida e do tempo de transporte, os parâmetros de qualidade são prejudicados, entre eles, a estabilidade do leite. Uma vez que o caminhão de transporte é isotérmico, ou seja, apenas mantém a temperatura de leite, a qualidade das estradas é fator determinante na manutenção das características do leite, sendo este quesito reconhecido por algumas cooperativas na forma de remuneração ao preço pago por litro ao produtor. Neste sentido, esperava-se correlação entre distância e tempo de transporte com a instabilidade do leite, a acidez titulável e com a CPP (Tabela 5). No entanto, isso não ocorreu, indicando, provavelmente, que a distância percorrida (máximo de 255 km), o tempo de transporte (máximo de 12 horas) e a temperatura do leite na propriedade (máximo de 4 °C) foram suficientes para manter a qualidade do leite transportado com relação aos parâmetros de estabilidade e CPP.

Oliveira *et al.* (2020) observaram maior número de amostras em desconformidade e ocorrência de LINA em determinadas rotas de transporte do leite e, segundo os autores, as alterações nas características físico-químicas das amostras podem estar associadas à distância do laticínio. Czerniewicz; Kruk e Kieczewska (2006) estudaram o efeito do transporte do leite, da propriedade até a indústria,

através de uma simulação de vibração vertical em várias frequências. Os autores constataram que quando se aplicou uma vibração de 60 Hz nas amostras de leite houve aumento de aproximadamente 7% nas concentrações de Ca_i comparadas com o grupo controle que não recebeu a vibração. De acordo com os autores quando o leite está sob influência da vibração, parte do fosfato de cálcio coloidal passa para a fase solúvel, aumentando assim a concentração de Ca_i , desestabilizando a micela de caseína e, resultando em menor estabilidade do leite.

A menor estabilidade do leite na prova do álcool durante o verão em comparação ao inverno (Tabela 6) pode estar relacionada, entre outros fatores, com o maior teor de Ca_i no leite verificado no verão. O cálcio é encontrado no leite sob três fases, sendo que o equilíbrio entre elas muito importante para a estabilidade. Cerca de 65 a 70% do cálcio apresenta-se na forma coloidal, associado ao fósforo formando o fosfato de cálcio coloidal. A dissolução do fosfato de cálcio coloidal acompanhado com um aumento da força iônica e da atividade do cálcio iônico contribui para o aumento da força de atração entre as micelas de caseína (DUMPLER *et al.*, 2017). De acordo com Philippe *et al.* (2003) o aumento de Ca_i no leite causa uma desestruturação micelar e aumento da hidrofobicidade, o que determina maior agregação das micelas e, conseqüentemente, aumento da instabilidade. Além disso, o Ca_i livre é o responsável por diminuir a repulsão eletrostática das submicelas de caseína, tornando-as mais propensas à desestabilização e à coagulação quando expostas a ação desidratante do álcool (MARQUES *et al.*, 2011).

A acidez titulável obtida nas estações verão e inverno atenderam o padrão preconizado pela legislação vigente, porém, a maior acidez observada no inverno em relação ao verão pode ser justificada em função da composição do leite. Segundo Durr; Fontaneli e Moro (2001), os componentes que contribuem para a acidez natural do leite são o dióxido de carbono, a proteína, os fosfatos e os citratos. Segundo Velloso (1998) a acidez do leite é dividida em acidez natural e adquirida, sendo que a acidez natural ou aparente do leite, é causada pela albumina (1 °D), pelos citratos (1 °D), pelo dióxido de carbono (1 °D), pelas caseínas (5 a 6 °D) e pelos fosfatos (5 °D). Portanto, a constituição normal do leite compreende a uma acidez de 13 a 14 °D. Já a acidez adquirida ou real, resulta da soma da acidez natural com os ácidos produzidos na fermentação do açúcar do leite, a lactose (VELLOSO, 1998). Portanto, quanto maior os teores destes componentes, como observado com a proteína no

inverno (Tabela 6), maior é a acidez natural do leite. Foi observado que uma grande porcentagem das amostras apresentou CPP abaixo de 100.000 UFC/mL (Tabela 4). Logo, os valores de acidez titulável não foram devido à fermentação da lactose pelas bactérias mesófilas e sim à composição do leite, possivelmente devido aos níveis elevados de proteína e fosfatos, embora este último não tenha sido avaliado.

A baixa incidência de LINA a 72 °GL (12,16%) encontrada nos rebanhos avaliados no Paraná foi inferior à obtida por Marx *et al.* (2011), no verão de 2010-2011, ao analisarem 69 amostras de leite cru da região oeste do Paraná, com 33% de casos. Já Fagnani *et al.* (2016) verificaram uma ocorrência de LINA, de 42,8% em um estudo realizado no norte do Paraná, que analisaram 322 amostras de leite de maio a julho de 2012. Sendo assim, mesmo considerando LINA com álcool na concentração de 78 °GL, o percentual de casos foi baixo (34,64%). A escolha do teste do álcool na concentração alcoólica de 78 °GL e não 72 °GL foi pelo fato de ser o nível exigido pela indústria, na captação do leite cru, e a concentração alcoólica de 72 °GL é a mínima exigida pela IN nº 77 (BRASIL, 2018). No entanto, pela legislação, não há limites para a concentração alcoólica máxima utilizada.

Segundo Marques *et al.* (2007) essas diferenças são devido à variação no número de amostras utilizadas na pesquisa e às particularidades das regiões analisadas. Além disso, a utilização de uma concentração alcoólica mais baixa no teste do álcool influencia o número de amostras com instabilidade ao teste. O presente estudo abrangeu grande parte do estado, sendo coletados leites de tanques resfriadores de 38 municípios, totalizando 389 e 425 amostras no inverno e no verão, respectivamente.

A maior instabilidade do leite das vacas a pasto em relação às confinadas (Tabela 6) pode ser devido à problemas de balanceamento nutricional, subnutrição dos animais ou mesmo fatores relacionados com o ambiente.

Na análise de acidez titulável em função do sistema de produção, ambos mantiveram a acidez dentro dos níveis recomendados pela legislação, mostrando que tanto o sistema a pasto quanto o confinamento foram eficientes nos processos de higiene e manutenção da temperatura do leite, fatores estes que são primordiais para garantir os níveis normais de acidez do leite. Por outro lado, os menores valores de lactose, ESD e maiores valores de CCS e CPP dos rebanhos a pasto em relação aos confinados (Tabela 6), pode indicar problemas no balanceamento das dietas, falta de

suplementação durante os períodos de escassez de forragem, além da possibilidade de maior exposição dos animais a microrganismos causadores da mastite (piquetes, lama em períodos chuvosos), levando ao aumento da CCS. Apesar da maior CPP obtida no sistema a pasto, esta variável foi baixa nos rebanhos avaliados (Tabela 4).

Segundo Fruscalso *et al.* (2013) vacas leiteiras que são submetidas a períodos de restrição alimentar, como ocorre em épocas de vazio forrageiro, apresentam redução tanto na produção de leite quanto nos teores de lactose, gordura e proteína, devido ao menor suprimento sanguíneo de nutrientes para a glândula mamária.

Com relação aos resultados obtidos da regressão logística, a variável que apresentou maior probabilidade de aumentar a ocorrência de instabilidade foi o Ca_i e a variável que possuiu a maior probabilidade de diminuir a ocorrência de instabilidade foi a lactose.

Em estudos realizados por Loveday *et al.* (2021) os autores encontraram que o Ca_i é o principal preditor do tempo de coagulação do leite pelo calor. Segundo os autores, a estabilidade eletrostática seria mais fraca em pH mais baixo devido ao menor potencial ζ , mais próximo do ponto isoelétrico. Com isso, o leite fica mais suscetível à ponte salina induzida pelo Ca_i e há coagulação das micelas de caseínas. O aumento do Ca_i no leite pode ser devido a deficiência nutricional (STUMPF *et al.*, 2013) observada em épocas de vazio forrageiro e por doenças metabólicas como a acidose ruminal (FAGNANI *et al.*, 2014). Além disso, modificações físico-químicas também podem alterar os teores de Ca_i no leite como a acidificação, o tratamento térmico, o resfriamento, a adição de quelantes, de cloreto de sódio ou cátions divalentes (GAUCHERON, 2005).

O NUL também apresentou uma estimativa negativa na probabilidade de ocorrência de instabilidade, indicado também pela correlação positiva fraca com a estabilidade (Tabela 5). Segundo Huppertz (2016) quando o leite é submetido a elevadas temperaturas, a uréia decompõe-se lentamente em amônia e dióxido de carbono, sendo que a amônia pode estabilizar o leite contra a acidificação induzida pelo calor. Portanto, se por um lado a elevação dos teores de NUL não é desejável em função das características do leite (proporção das caseínas e proteínas do soro), por outro, esta variável pode contribuir para melhorar a estabilidade do leite.

2.5 CONCLUSÕES

A maioria das amostras de leite dos municípios localizados no estado do Paraná apresentaram estabilidade ao etanol 80 °GL.

Apesar de se observar correlação negativa do cálcio iônico com a estabilidade do leite, esta foi considerada fraca, indicando que outros fatores podem causar a instabilidade do leite como a deficiência nutricional, doenças metabólicas, a genética e fatores ambientais. Os resultados de acidez titulável e a correlação positiva da estabilidade com a acidez indicaram que a elevação da acidez não ocorreu em função da contagem bacteriana, mas sim em razão dos constituintes do leite que influenciaram na acidez natural, não comprometendo sua estabilidade. E foi encontrada uma correlação positiva da estabilidade com o teor de lactose do leite.

Na estação do verão foram verificados maior número de casos de instabilidade do leite em relação ao inverno, havendo também maiores níveis de cálcio iônico em comparação com o inverno. Vacas mantidas no sistema a pasto com suplementação apresentaram menor estabilidade do leite e maiores valores de CCS e CPP em comparação com as vacas confinadas, indicando maior susceptibilidade à variações de ambiente (estresse térmico, restrição alimentar, entre outros) em relação ao sistema confinado. As variáveis mais determinantes e comuns ao LINA₇₂ e LINA₇₈ foram as concentrações de Cai e lactose.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. S. **Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a composição do leite bovino**. 2015. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2015. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/132810>. Acesso em: 24 jun. 2022.

ALMEIDA, R. Nitrogênio ureico no leite como ferramenta para ajuste de dietas - Parte I. 2012. Disponível em: <https://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/nitrogenio-ureico-noleite-como-ferramenta-para-ajuste-de-dietas---parte-i> Acesso em: 18 abri. 2022.

AKKERMAN, M. *et al.* Natural variations of citrate and calcium in milk and their effects on milk processing properties. **Journal of Dairy Science**, 2019. v. 102, n. 8, p. 6830–6841. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16195>. Acesso em: 14 jun. 2022.

AKKERMAN, M. *et al.* Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 112, p. 104856, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104856>. Acesso em: 14 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018**. 2018. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=30/11/2018&jornal=515&pagina=9>. Acesso em: 16 set. 2021.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 255 p.

CINAR, M. *et al.* Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 1, p. 105–108, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3646>. Acesso em: 27 jun. 2022.

CZERNIEWICZ, M.; KRUK, A.; KIECZEWSKA, K. Storage stability of raw milk subjected to vibration. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 15, n. 1, p. 65–70, 2006. Disponível em: <http://journal.pan.olsztyn.pl/STORAGE-STABILITY-OF-RAW-MILK-SUBJECTED-TO-VIBRATION,98675,0,2.html>. Acesso em: 15 maio 2022.

DAVIS, S. *et al.* Sources of variation in milk calcium content. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 156, 2001.

DUMPLER, J.; WOHLSCHLÄGER, H.; KULOZIK, U. Dissociation and coagulation of caseins and whey proteins in concentrated skim milk heated by direct steam injection. **Dairy Science and Technology**, v. 96, n. 6, p. 807–826, 2017. Disponível em: [10.1007/s13594-016-0304-3](https://doi.org/10.1007/s13594-016-0304-3). Acesso em: 03 jun. 2022.

DURR, J. W.; FONTANELI, R. S.; MORO, D. V. **Determinação laboratorial dos componentes do leite**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. In: GONZÁLEZ, F. H. D., DURR, J. W., FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, Porto Alegre, 2001. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26656/000308502.pdf>. Acesso em: 01 maio 2022.

FAGNANI, R. *et al.* Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014.

FAGNANI, R. *et al.* Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável? **Ciencia Animal Brasileira**, 2016. v. 17, n. 3, p. 386–394. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i331848>. Acesso em: 19 maio 2022.

FISCHER, V. *et al.* Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. **III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I**

Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira - SIMLEITE, v. 1, n. 3, p. 45–66, 2011.

FISCHER, V. *et al.* Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012.

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

FRUSCALSO, V. *et al.* Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 237–241, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400003>. Acesso em: 15 abri 2022.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**. v. 45, n. 4, p. 473–483, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>. Acesso em: 20 jun. 2022.

HETTINGA, K. A. **Lactose in the dairy production chain**. The Netherlands: Elsevier Inc., 2019.

HUPPERTZ, T. Heat Stability of Milk. In: MCSWEENEY, P., O'MAHONY, J. (eds) **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer, p. 1–498, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2020. Disponível em: https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/Comunicado-Tecnico-CNA-ed-30_2021.pdf. Acesso em: 14 set. 2021.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 13366-2/IDF 148-2: Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. Genève. Switzerland. 2006. 2 ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 4833-1: Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique**. Genève. Switzerland. 2013. 1 ed. 9p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 9622-IDF 141: Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry**. Genève. Switzerland. 2013. 2 ed. 14p.

LEMOS, Edmilton Aguiar. Naturalle: linha de leites UHT livre de aditivos é lançada pela Castrolanda. [Entrevista cedida a MilkPoint]. MilkPoint, dez. 2016. Disponível em: Naturalle: linha de leites UHT livre de aditivos é lançada pela Castrolanda | MilkPoint. Acesso em: 15 maio 2022.

LOVEDAY, S. M. *et al.* Type A and B bovine milks: Heat stability is driven by different physicochemical parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20201>. Acesso em: 18 out. 2022.

MACHADO, S. C. *et al.* Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 4, p. 340–347, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000400010>. Acesso em: 24 jun. 2022.

MARQUES, L. *et al.* Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista brasileira de agrociência**, v. 13, n. 1, p. 91–97, 2007.

MARQUES, L. T. *et al.* Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000500021>. Acesso em: 10 maio. 2022.

MARTINS, C. M. M. R. *et al.* Subclinical intramammary infection does not affect bovine milk ethanol stability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135173>. Acesso em: 09 jun. 2022.

MARX, I. G. *et al.* Ocorrência de Leite Instável não Ácido na Região Oeste do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 1, p. 101–112, 2011.

MOUSSAOUI, F. *et al.* Proteolysis in milk during experimental Escherichia coli mastitis. **Journal of Dairy Science**, 2004. v. 87, n. 9, p. 2923–2931. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73423-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73423-2). Acesso em: 17 fev. 2022.

NEVES, T. F. F. **Estabilidade do leite: características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças holandesa e jersey**. 2021. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/browse?type=author&value=Neves%2C+Tha%C3%ADs+F%C3%A1tima+Ferreira>. Acesso em: 03 fev. 2022.

OLIVEIRA, C. A. F. *et al.* Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 508-515, 2011. Disponível em: <https://pt.engormix.com/pecuaria-leite/artigos/composicao-caracteristicas-fisico-quimicas-t37783.htm>. Acesso em: 19 maio 2022.

OLIVEIRA, L. R. *et al.* Sazonalidade e rotas de coleta influenciam a ocorrência de leite instável não ácido, a densidade e a crioscopia do leite fornecido a um laticínio no Norte de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1522–1534, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11341>. Acesso em: 27 maio 2022.

OMOARUKHE, E. D. *et al.* Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, p. 504–511, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00613.x>. Acesso em: 14 maio 2021.

PALES, A.P. *et al.* A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n.2, p. 162-173, 2005.

PHILIPPE, M. *et al.* Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Lait**, v. 83, n. 1, p. 45–59, 2003. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895357/document>. Acesso em: 02 maio 2022.

PONCHEKI, J. K.; CARNEIRO, J. H.; ALMEIDA, R. Manejo nutricional da vaca leiteira para otimizar a composição do leite. **A vaca leiteira do século 21: lições de metabolismo e nutrição**, p. 348, 2021. Acesso em: 20 jun. 2022.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130022>. Acesso em: 15 jan. 2022.

RIBEIRO, M. E. R. *et al.* **Método de Determinação de Cálcio Iônico no Leite Bovino**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44002/1/documento-321.pdf>. Acesso em: 10 set. 2021.

ROSA, P. P. *et al.* Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 12, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63654640009>. Acesso em: 15 maio 2022.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 111–119, 2004.

Sistema Ocepar. **Consultar cooperativas do PR**. 2021. Disponível em: <http://ocepar.sistemaocepar.coop.br/ocepar/cooperativasPR/consultaPorRegiao.html>. Acesso em: 15 jun. 2022.

STUMPF, M. T. *et al.* Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, n. 7, p. 1137–1142, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731113000128>. Acesso em: 26 out. 2021.

STUMPF, M. T. *et al.* Behaviors associated with cows more prone to produce milk with reduced stability to ethanol test due to feeding restriction. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1662–1667, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151246>. Acesso em: 13 out. 2021.

THALER NETO, A. *et al.* Perfil das propriedades e ocorrência de leite instável não ácido na região do vale do braço do norte, sul do estado de Santa Catarina. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UDESC, 22., 2012, Florianópolis. **Anais** [...] Florianópolis: Universidade do Estado de Santa Catarina, 2012. Acesso em: 02 jun. 2022.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 4. ed. Santa Maria:UFMS, 2010.

VELLOSO, C. R. V. Noções básicas da acidez. In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. (Ed.). **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL; São Paulo: Tortuga, 1998. p. 37-45.

ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; VON HAUSEN, L. J. O. Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 9., 2006, Goiânia. **Anais** [...] Goiânia: Gráfica e Editora Talento, 2006.

ZANELA, M. B. *et al.* Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1009–1013, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000400035>. Acesso em: 06 abri 2022.

ZANELA, M. B; RIBEIRO, M. E. R; FISCHER, V. Leite instável não ácido (LINA) do campo a indústria. **VI Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Minicurso- Universidade Federal do Paraná (UFPR)**, n. 1, p. 1–16, 2015.

ZANELA, M. B; RIBEIRO, M. E. R. LINA - Leite Instável Não Ácido. **Comunicado técnico Embrapa**, n. 356, p. 1-19, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/184058/1/COMUNICADO-TECNICO-356.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2022.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS

- Nome do Produtor: _____
- Nome da Propriedade: _____
- Data da coleta: _____
- Município: _____
- Produção de litros/dia: _____
- Número de animais em lactação: _____
 - Raça: _____
 - Dias em leite médio (DEL): _____
- Ordem de Parto:
 - Primíparas (número): _____
 - Multíparas (número): _____
- Número de ordenhas: _____
 - Horário das ordenhas: _____
- Sistema de criação das vacas em lactação:
 - () Confinamento () Semi-confinamento () Em pastagem
- Alimentação das vacas em lactação:
 - Fonte de volumoso: _____
 - Relação volumoso/concentrado: _____
- Água: () Tratada () Poço () Outros – Qual? _____
- Coleta de leite: () 24h () 48h
- CCS: _____
- CBT: _____

Favor enviar o questionário para: (42)99965-2653 Fernanda Antunes Martins